

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 551**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2013 PCT/IB2013/059183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2013 E 13786535 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021 EP 2909307**

54 Título: **Composiciones y procedimientos relativos a una toxina mutante de *Clostridium difficile***

30 Prioridad:

21.10.2012 US 201261716605 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.11.2021

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**JANSEN, KATHRIN UTE;
ANDERSON, ANNALIESA SYBIL;
DONALD, ROBERT G.K.;
FLINT, MICHAEL JAMES;
KALYAN, NARENDER KUMAR;
LOTVIN, JASON ARNOLD;
SIDHU, MANINDER K;
MORAN, JUSTIN KEITH;
RUPPEN, MARK EDWARD y
SUN, WEIQIANG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 878 551 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos relativos a una toxina mutante de *Clostridium difficile*

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 61/716.605, presentada el 21 de octubre de 2012.

10 **Campo técnico**

La presente invención está dirigida a composiciones y procedimientos relacionados con toxinas mutantes de *Clostridium difficile*.

15 **Antecedentes de la Invención**

Clostridium difficile (*C. difficile*) es una bacteria anaerobia Gram positiva que se asocia con enfermedades gastrointestinales en humanos. La colonización de *C. difficile* generalmente ocurre en el colon si la flora intestinal natural disminuye por el tratamiento con antibióticos. Una infección puede provocar diarrea asociada a antibióticos y, a veces, colitis pseudomembranosa a través de la secreción de las toxinas glucosilantes, la toxina A y la toxina B (308 y 270 kDa, respectivamente), que son los principales factores de virulencia de *C. difficile*.

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

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

En la última década, el número y la gravedad de los brotes de *C. difficile* en hospitales, residencias de ancianos y otras instalaciones de cuidados a largo plazo aumentaron drásticamente. Los factores clave en este escalamiento incluyen la aparición de cepas patógenas hipervirulentas, un mayor uso de antibióticos, procedimientos de detección mejorados y una mayor exposición a esporas en el aire en las instalaciones de atención médica.

El metronidazol y la vancomicina representan el estándar de atención actualmente aceptado para el tratamiento con antibióticos de la enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD). Sin embargo, aproximadamente el 20% de los pacientes que reciben dicho tratamiento experimentan una recurrencia de la infección después de un primer episodio de CDI, y hasta aproximadamente el 50% de esos pacientes sufren recurrencias adicionales. El tratamiento de las recurrencias representa un desafío muy importante y la mayoría de las recurrencias suelen ocurrir en el plazo de un mes desde el episodio anterior. Fang A. et al. (PNAS, vol. 106, No. 32, páginas 13225-13229, 2009), divulga un medio de fermentación para *Clostridium difficile* que no contiene carne ni productos lácteos. En el medio de fermentación se han utilizado preparaciones de proteínas de soja hidrolizadas, especialmente Peptona de soja A3 y NZ-Soy BL4.

Heap J et al. (J. of Microbial Methods, vol. 80, # 1, páginas 49-55, 2010), divulga la herramienta de mutagénesis dirigida por intrones ClosTron Grupo II para *Clostridium* para el suministro de transgenes al cromosoma de *Clostridium sporogenes*, construyendo mutantes en *Clostridium beijerinckii* y en una cepa 'epidémica' B1/NAP1/027 de *Clostridium difficile*.

Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones inmunogénicas y/o terapéuticas y procedimientos de las mismas dirigidas a *C. difficile*.

55 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a un medio de cultivo que comprende hidrolizado de soja, extracto de levadura, un protector celular y glucosa como fuente de carbono, en el que el medio comprende una bacteria *Clostridium difficile*, en el que la bacteria carece del polinucleótido endógeno que codifica una toxina, en el que la bacteria comprende un polinucleótido que codifica una toxina A o B mutante de *C. difficile* que es inmunogénica y presenta citotoxicidad reducida en comparación con su forma de tipo silvestre y en la que la bacteria comprende además un promotor de ferredoxina (*fdx*) de *Clostridium sporogenes* que dirige la expresión de dicha toxina mutante.

La invención también se refiere a un procedimiento de cultivo de *Clostridium difficile* que comprende cultivar *C. difficile* en un medio, en el que el medio comprende hidrolizado de soja, extracto de levadura, un protector celular y glucosa como fuente de carbono, y en el que el medio comprende una bacteria de *Clostridium difficile*. derivado de

VPI 11186, en el que la bacteria carece del polinucleótido endógeno que codifica una toxina, en el que la bacteria comprende un polinucleótido que codifica una toxina A o B mutante de *C. difficile* que es inmunogénica y presenta citotoxicidad reducida en comparación con su forma de tipo silvestre, en la que la bacteria además comprende un promotor de ferredoxina (fdx) de *Clostridium sporogenes* que dirige la expresión de dicha toxina mutante.

La invención se refiere además a un procedimiento para producir una toxina de *Clostridium difficile* que comprende cultivar *C. difficile* en un medio en condiciones adecuadas para producir una toxina y aislar la toxina del medio; en el que el medio comprende hidrolizado de soja, extracto de levadura, un protector celular y glucosa como fuente de carbono, y en el que el medio comprende una bacteria *Clostridium difficile* derivada de VPI 11186, en el que la bacteria carece del polinucleótido endógeno que codifica una toxina, en el que la bacteria comprende un polinucleótido que codifica una toxina A o B mutante de *C. difficile* que es inmunogénico y presenta citotoxicidad reducida en comparación con su forma de tipo silvestre, en el que la bacteria comprende además un promotor de ferredoxina (fdx) de *Clostridium sporogenes* que dirige la expresión de dicha toxina mutante.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 A-H: Alineación de secuencia de la toxina A de tipo silvestre de *C. difficile* de las cepas 630, VPI10463, R20291, CD196 y de la toxina A mutante que tiene la SEQ ID NO: 4, usando alineación CLUSTALW, parámetros predeterminados.

Figura 2 A-F: Alineación de secuencia de la toxina B de tipo silvestre de *C. difficile* de las cepas 630, VPI10463, R20291, CD196 y de la toxina B mutante que tiene la SEQ ID NO: 6, usando alineación CLUSTALW, parámetros predeterminados.

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

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

Figura 5: Transferencia Western que indica la anulación de la actividad de cisteína proteasa en las toxinas A y B mutantes (SEQ ID NO: 4 y 6, respectivamente), en comparación con la observación de fragmentos escindidos de las toxinas A y B de tipo silvestre (SEQ ID NOs : 1 y 2, respectivamente). Véase el Ejemplo 13.

Figura 6: Gráficos que muestran que las toxinas A y B de triple mutantes (SEQ ID NO: 4 y 6, respectivamente) exhiben citotoxicidad residual cuando se prueban a altas concentraciones (por ejemplo, aproximadamente de 100 µg/ml) mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células IMR-90 .

Figura 7: Gráfico que muestra que los valores de CE₅₀ son similares para la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) y la toxina B hepta mutante (SEQ ID NO: 8).

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

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

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

Figura 11A-B: Gráfico que muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes como se describe en el Ejemplo 26 (estudio muCdiff2010-07).

Figura 12: Gráfico que muestra las respuestas de anticuerpos neutralizantes contra las toxinas A y B en hámsteres después de cuatro inmunizaciones como se describe en el Ejemplo 27 (estudio hamC. Difficile2010-02).

Figura 13A-B: Gráfico que muestra las respuestas de anticuerpos neutralizantes en hámsteres después de la vacunación con toxinas mutantes genéticas químicamente inactivadas y toxoides List Biological, como se describe en el Ejemplo 27 (estudio hamC. Difficile2010-02).

Figura 14: Curvas de supervivencia para tres grupos de hámsteres inmunizados en comparación con los controles no inmunizados, descritos en el Ejemplo 28 (estudio hamC. Difficile2010-02, continuación).

Figura 15: Gráfico que muestra la respuesta relativa de anticuerpos neutralizantes contra diferentes formulaciones de toxinas mutantes de *C. difficile* en hámsteres (estudio hamC. Difficile2010-03), como se describe en el Ejemplo 29.

Figura 16A-B: Gráficos que muestran una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes relativa contra las toxinas A y B mutantes genéticas inactivadas químicamente (SEQ ID NO: 4 y 6, respectivamente) en *macacos Cynomolgus*, como se describe en el Ejemplo 30.

Figura 17: Secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadenas ligeras (VL) y pesadas (HL) de mAb IgE A3-25. Péptido señal: resaltado; CDR: en cursiva y subrayado; Región constante: en negrita y subrayada (no se muestra la secuencia completa).

Figura 18: Gráfico que muestra la titulación de anticuerpos monoclonales de toxina A individuales en el ensayo de neutralización de toxina usando niveles de ATP (cuantificados por unidades de luz relativas - URL) como indicador de la viabilidad celular. En comparación con el control de toxina ($4 \times \text{CE}_{50}$), los mAb A80-29, A65-33, A60-22 y A3-25 tuvieron efectos neutralizantes crecientes sobre la toxina A con la concentración pero no con el nivel del control positivo antitoxina A de conejo. Los mAb A50-10, A56-33 y A58-46 no neutralizaron la toxina A. El único control de las células fue $1 - 1,5 \times 10^6$ URL.

Figura 19: Mapeo de 8 grupos de epítomos de mAb de toxina B por BiaCore

Figura 20A-C: Actividades neutralizantes sinérgicas de combinaciones de mAb de la toxina A: La adición de diferentes diluciones de los anticuerpos neutralizantes A60-22, A65-33 y A80-29 para aumentar las concentraciones de mAb A3-25 aumentó sinérgicamente la neutralización de la toxina A independientemente de la dilución. Se ilustran las URL del control de toxina A solamente ($4 \times \text{CE}_{50}$) ($< 0,3 \times 10^6$) y los únicos controles de células fueron $2 - 2,5 \times 10^6$ URL como se muestra en los gráficos mostrados en la Figura 20B y la Figura 20C.

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

Figura 22: Transferencia Western que muestra que la expresión de la GTPasa Rac1 está reducida en extractos de toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6) de 24 a 96 horas, pero no en extractos tratados con toxina B de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2). La transferencia también muestra que Rac1 está glucosilada en extractos tratados con toxina B, pero no en extractos tratados con toxina B genéticamente mutante.

Figura 23A-K: Gráfico que representa los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* en las que se representan gráficamente los niveles de ATP (URL) frente a concentraciones crecientes de medios de cultivo de *C. difficile* y el conjunto de suero de hámster (■); toxina cruda (cosecha de cultivo) de la respectiva cepa y la reserva de suero de hámster (●); toxina purificada (toxina comercial obtenida de List Biologicals) y la reserva de suero de hámster (▲); toxina cruda (▼), control; y toxina purificada (◆), control. Las toxinas de las respectivas cepas se añadieron a las células a valores $4 \times \text{CE}_{50}$. La Figura 23 muestra que una composición inmunogénica que incluye TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) y TcdB mutante (SEQ ID NO: 6), en la que las toxinas mutantes se inactivaron con EDC, de acuerdo con, por ejemplo, el Ejemplo 29, Tabla 15, descrito en el presente documento, indujeron anticuerpos neutralizantes que exhibieron actividad neutralizante contra toxinas de al menos las siguientes 16 cepas CDC diferentes de *C. difficile*, en comparación con el respectivo control de solo toxina: 2007886 (Figura 23A); 2006017 (Figura 23B); 2007070 (Figura 23C); 2007302 (Figura 23D); 2007838 (Figura 23E); 2007886 (Figura 23F); 2009292 (Figura 23G); 2004013 (Figura 23H); 2009141 (Figura 23I); 2005022 (Figura 23J); 2006376 (Figura 23K).

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

Figura 25: Ilustración de una inactivación ejemplar de EDC/NHS de toxinas mutantes de *C. difficile*, que da como resultado al menos uno de los siguientes tipos de modificaciones: (A) entrecruzamientos, (B) aductos de glicina y (C) aductos de beta-alanina.

Figura 26: Gráfico que representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en el que los niveles de ATP (URL) (ATP de 72 horas) se representan frente a concentraciones crecientes de TcdB de tipo silvestre, obtenida comercialmente de List Biologicals (□), TcdB triple mutante (SEQ ID NO: 86) (●) y TcdB penta mutante (SEQ ID NO: 184) (■). Células IMR-90 (*) se utilizaron como control.

Figura 27: Gráfico que muestra la inhibición competitiva de la citotoxicidad mediada por la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 86) por la toxina B penta mutante (SEQ ID NO: 184) en células IMR-90, (ensayo de ATP de 72 h). -●- representa la toxina B penta mutante (SEQ ID NO: 184) ("PM-B"); -▲- representa triple mutante (TM) a 200 ng/ml.

Figura 28: Gráfico que muestra la DO final y el título de toxina B triple mutante (mg/l) después de una fermentación por perfusión (CDF-5126). -●- representa $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$; -▲- representa el caudal de perfusión (volúmenes del fermentador/2,0 h); -■- representa glucosa (g/l); -●- representa el toxoide B (triple mutante, SEQ ID NO: 86).

Figura 29: Gráfico que muestra los resultados de la DO final y el título de toxina B triple mutante (mg/l) de otro cultivo de perfusión (CDF-5127). -●- representa $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$; -▲- representa la tasa de flujo de perfusión (volúmenes del fermentador/2,0 h); -■- representa glucosa (g/l); -●- representa el toxoide B (triple mutante, SEQ ID NO: 86).

Breve descripción de las secuencias

- La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de aminoácidos para la toxina A de *C. difficile* 630 (TcdA) de tipo silvestre.
- 5 La SEQ ID NO: 2 establece la secuencia de aminoácidos para la toxina B de *C. difficile* 630 (TcdB) de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante que tiene una mutación en las posiciones 285 y 287, en comparación con la SEQ ID NO: 1.
- 10 La SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante que tiene una mutación en las posiciones 285, 287 y 700, en comparación con la SEQ ID NO: 1.
- La SEQ ID NO: 5 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante que tiene una mutación en las posiciones 286 y 288, en comparación con la SEQ ID NO: 2.
- La SEQ ID NO: 6 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante que tiene una mutación en las posiciones 286, 288 y 698, en comparación con la SEQ ID NO: 2.
- 15 La SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante que tiene una mutación en las posiciones 269, 272, 285, 287, 460, 462 y 700, en comparación con la SEQ ID NO: 1.
- La SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante que tiene una mutación en las posiciones 270, 273, 286, 288, 461, 463 y 698, en comparación con la SEQ ID NO: 2.
- 20 La SEQ ID NO: 9 establece una secuencia de ADN que codifica una toxina A de *C. difficile* 630 (TcdA) de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 10 establece una secuencia de ADN que codifica una toxina B de *C. difficile* 630 (TcdB) de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 11 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 3.
- 25 La SEQ ID NO: 12 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 4.
- La SEQ ID NO: 13 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 5.
- La SEQ ID NO: 14 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 6.
- La SEQ ID NO: 15 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* R20291 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 16 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 15.
- 30 La SEQ ID NO: 17 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* CD196 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 18 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 17.
- La SEQ ID NO: 19 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* VPI10463 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 20 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 19.
- La SEQ ID NO: 21 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* R20291 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 22 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 21.
- 35 La SEQ ID NO: 23 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* CD196 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 24 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 23.
- La SEQ ID NO: 25 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* VPI10463 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 26 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 25.
- 40 La SEQ ID NO: 27 expone una secuencia de ADN de un locus de patogenicidad de *C. difficile* VPI10463 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 28 establece la secuencia de aminoácidos para los residuos 101 a 293 de la SEQ ID NO: 1.
- La SEQ ID NO: 29 establece la secuencia de aminoácidos para los residuos 1 a 542 de la SEQ ID NO: 1.
- La SEQ ID NO: 30 establece la secuencia de aminoácidos para los residuos 101 a 293 de la SEQ ID NO: 2.
- 45 La SEQ ID NO: 31 establece la secuencia de aminoácidos para los residuos 1 a 543 de la SEQ ID NO: 2.
- La SEQ ID NO: 32 establece la secuencia de aminoácidos para los residuos 543 a 809 de la SEQ ID NO: 1.
- La SEQ ID NO: 33 establece la secuencia de aminoácidos para los residuos 544 a 767 de la SEQ ID NO: 2.
- La SEQ ID NO: 34 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante, en la que los residuos 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655 y 700 pueden ser cualquier aminoácido.
- 50 La SEQ ID NO: 35 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante, en la que 102, 270, 273, 286, 288, 384, 461, 463, 520, 543, 544, 587, 600, 653, 698 y 751 pueden ser cualquier aminoácido.
- La SEQ ID NO: 36 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).
- La SEQ ID NO: 37 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).
- 55 La SEQ ID NO: 38 establece la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena ligera variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).
- La SEQ ID NO: 39 establece la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena ligera variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).
- La SEQ ID NO: 40 establece la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena ligera variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).
- 60 La SEQ ID NO: 41 expone la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena pesada variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).
- La SEQ ID NO: 42 expone la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena pesada variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).
- 65 La SEQ ID NO: 43 establece la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena pesada variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (mAb A3-25).

- La SEQ ID NO: 44 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 3.
 La SEQ ID NO: 45 expone una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 4.
 La SEQ ID NO: 46 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 5.
 La SEQ ID NO: 47 establece una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 6.
 5 La SEQ ID NO: 48 expone la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido inmunoestimulador ODN de CpG 24555.
 La SEQ ID NO: 49 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 50 establece la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena pesada variable de
 10 un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 51 establece la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 52 expone la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 15 La SEQ ID NO: 53 expone la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 54 establece la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 55 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena ligera variable de un anticuerpo
 20 neutralizante TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 56 establece la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 57 establece la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 25 La SEQ ID NO: 58 establece la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 59 expone la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B8-26).
 La SEQ ID NO: 60 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable de un anticuerpo
 30 neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 61 establece la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 62 establece la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 35 La SEQ ID NO: 63 establece la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 64 establece la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 65 establece la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada variable
 40 de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 66 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 67 establece la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 45 La SEQ ID NO: 68 establece la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 69 establece la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 La SEQ ID NO: 70 establece la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B59-3).
 50 La SEQ ID NO: 71 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
 La SEQ ID NO: 72 establece la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
 55 La SEQ ID NO: 73 establece la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
 La SEQ ID NO: 74 establece la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
 La SEQ ID NO: 75 establece la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
 60 La SEQ ID NO: 76 establece la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
 La SEQ ID NO: 77 establece la secuencia de aminoácidos para la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
 65 La SEQ ID NO: 78 establece la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).

- La SEQ ID NO: 79 establece la secuencia de aminoácidos para CDR1 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
- La SEQ ID NO: 80 establece la secuencia de aminoácidos para CDR2 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
- 5 La SEQ ID NO: 81 establece la secuencia de aminoácidos para CDR3 de la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30).
- La SEQ ID NO: 82 establece la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante, en la que un residuo en las posiciones 102, 270, 273, 286, 288, 384, 461, 463, 520, 543, 544, 587, 600, 653, 698 y 751 puede ser cualquier aminoácido.
- 10 La SEQ ID NO: 83 establece la secuencia de aminoácidos para un TcdA mutante que tiene una mutación en las posiciones 269, 272, 285, 287, 460, 462 y 700, en comparación con la SEQ ID NO: 1, en la que la metionina en la posición 1 está ausente.
- La SEQ ID NO: 84 establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante de *C. difficile* que tiene una mutación en las posiciones 285, 287 y 700, en comparación con la SEQ ID NO: 1, en la que la metionina en la
- 15 La SEQ ID NO: 85 establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante de *C. difficile* que tiene una mutación en las posiciones 270, 273, 286, 288, 461, 463 y 698, en comparación con la SEQ ID NO: 2, en la que la metionina en la posición 1 está ausente.
- La SEQ ID NO: 86 establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante de *C. difficile* que tiene una mutación en las posiciones 286, 288 y 698, en comparación con la SEQ ID NO: 2, en la que la metionina en la
- 20 La SEQ ID NO: 87 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004013 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 88 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004111 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 89 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004118 de tipo silvestre.
- 25 La SEQ ID NO: 90 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004205 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 91 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004206 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 92 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005022 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 93 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005088 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 94 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005283 de tipo silvestre.
- 30 La SEQ ID NO: 95 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005325 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 96 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005359 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 97 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2006017 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 98 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007070 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 99 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007217 de tipo silvestre.
- 35 La SEQ ID NO: 100 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007302 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 101 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007816 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 102 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007838 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 103 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007858 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 104 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007886 de tipo silvestre.
- 40 La SEQ ID NO: 105 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2008222 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 106 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2009078 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 107 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2009087 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 108 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2009141 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 109 establece la secuencia de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2009292 de tipo silvestre.
- 45 La SEQ ID NO: 110 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004013 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 111 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004111 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 112 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004118 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 113 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004205 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 114 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004206 de tipo silvestre.
- 50 La SEQ ID NO: 115 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005022 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 116 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005088 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 117 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005283 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 118 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005325 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 119 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005359 de tipo silvestre.
- 55 La SEQ ID NO: 120 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2006017 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 121 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2006376 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 122 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007070 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 123 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007217 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 124 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007302 de tipo silvestre.
- 60 La SEQ ID NO: 125 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007816 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 126 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007838 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 127 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007858 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 128 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007886 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 129 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2008222 de tipo silvestre.
- 65 La SEQ ID NO: 130 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2009078 de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 131 establece la secuencia de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2009087 de tipo silvestre.

[illegible]

La SEQ ID NO: 244 a la SEQ ID NO: 245, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 246 a la SEQ ID NO: 249, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 250 a la SEQ ID NO: 253, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 254 establece la secuencia de aminoácidos para una toxina mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 255 a la SEQ ID NO: 263, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 264 a la SEQ ID NO: 269, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 270 a la SEQ ID NO: 275, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 276 a la SEQ ID NO: 323, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 324 a la SEQ ID NO: 373, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 374 a la SEQ ID NO: 421, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 422 a la SEQ ID NO: 471, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 472 a la SEQ ID NO: 519, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 568 a la SEQ ID NO: 615, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 520 a la SEQ ID NO: 567, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 616 a la SEQ ID NO: 663, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 664 a la SEQ ID NO: 711, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina A mutante ejemplar.

La SEQ ID NO: 712 a la SEQ ID NO: 761, cada una establece la secuencia de aminoácidos para una toxina B mutante ejemplar.

Descripción detallada

Los inventores descubrieron sorprendentemente, entre otras cosas, una toxina A y una toxina B mutante de *C. difficile*, y procedimientos de las mismas. Los mutantes se caracterizan, en parte, por ser inmunogénicos y exhibir una citotoxicidad reducida en comparación con una forma de tipo silvestre de la toxina respectiva. La presente divulgación también se refiere a porciones inmunogénicas de la misma, equivalentes biológicos de la misma y polinucleótidos aislados que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los anteriores.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento demostraron inesperadamente la capacidad de provocar nuevos anticuerpos neutralizantes contra las toxinas de *C. difficile* y pueden tener la capacidad de conferir protección activa y/o pasiva contra una exposición a *C. difficile*. Los nuevos anticuerpos están dirigidos contra varios epítomos de la toxina A y la toxina B. Los inventores descubrieron además que una combinación de al menos dos de los anticuerpos monoclonales neutralizantes puede exhibir un efecto sinérgico inesperado en la neutralización *in vitro* respectiva de la toxina A y la toxina B.

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

Además, los inventores descubrieron una célula de *C. difficile* asporogénica recombinante que puede expresar de forma estable la toxina A y la toxina B mutante de *C. difficile*, y procedimientos novedosos para producir las mismas.

Composiciones inmunogénicas

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

El término "tipo silvestre", como se usa en este documento, se refiere a la forma que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido de tipo silvestre es una secuencia presente en un

organismo que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por manipulación humana. La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los anteriores. Además, la presente divulgación se refiere al uso de cualquiera de las composiciones anteriores para tratar, prevenir, disminuir el riesgo, disminuir la gravedad, disminuir las ocurrencias y/o retrasar el inicio de una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile* en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición, así como los procedimientos para preparar dichas composiciones. Como se usa en el presente documento, una "composición inmunogénica" o "inmunógeno" se refiere a una composición que provoca una respuesta inmune en un mamífero al que se administra la composición.

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

La respuesta inmune puede ser una respuesta activa inducida por la administración de una composición inmunogénica, un inmunógeno. Alternativamente, la respuesta inmune puede ser una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpos o células T cebadas.

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

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

En un aspecto, una composición inmunogénica es una composición de vacuna. Como se usa en el presente documento, una "composición de vacuna" es una composición que provoca una respuesta inmune en un mamífero al que se administra la composición. La composición de vacuna puede proteger al mamífero inmunizado contra la exposición posterior por un agente inmunizante o un agente inmunológicamente reactivo cruzado. La protección puede ser completa o parcial con respecto a la reducción de los síntomas o la infección en comparación con un mamífero no vacunado en las mismas condiciones.

Las composiciones inmunogénicas descritas en este documento son de reactividad cruzada, lo que se refiere a tener la característica de poder provocar una respuesta inmune eficaz (por ejemplo, respuesta inmune humoral) contra una toxina producida por otra cepa de *C. difficile* que es diferente de la cepa de la cual se deriva la composición. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, derivadas de *C. difficile* 630) descritas en este documento pueden provocar anticuerpos de reacción cruzada que pueden unirse a toxinas producidas por múltiples cepas de *C. difficile* ((por ejemplo, toxinas producidas por *C. difficile* R20291 y VPI10463). Véase, por ejemplo, el Ejemplo 37. La reactividad cruzada es indicativa del potencial de protección cruzada del inmunógeno bacteriano y viceversa.

El término "protector cruzado" como se usa en este documento se refiere a la capacidad de la respuesta inmune inducida por una composición inmunogénica para prevenir o atenuar la infección por una cepa bacteriana diferente o especies del mismo género. Por ejemplo, una composición inmunogénica (por ejemplo, derivada de *C. difficile* 630) descrita en el presente documento puede inducir una respuesta inmunitaria eficaz en un mamífero para atenuar una infección por *C. difficile* y/o para atenuar una enfermedad por *C. difficile* causada por una cepa distinta de 630 (por ejemplo, *C. difficile* R20291) en el mamífero.

Los mamíferos ejemplares en los que la composición inmunogénica o el inmunógeno provoca una respuesta inmune incluyen cualquier mamífero, tal como, por ejemplo, ratones, hámsteres, primates y seres humanos. En un aspecto preferido, la composición inmunogénica o inmunógeno provoca una respuesta inmune en un ser humano al que se administra la composición.

Como se describió anteriormente, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB) son glucosiltransferasas homólogas que inactivan pequeñas GTPasas de la familia Rho/Rac/Ras. La acción de TcdA y TcdB en células diana de mamíferos depende de un mecanismo de múltiples etapas de endocitosis mediada por receptores, translocación de membrana, procesamiento autoproteolítico y monoglucosilación de GTPasas. Muchas de estas actividades funcionales se han atribuido a regiones discretas dentro de la secuencia primaria de las toxinas, y se han obtenido imágenes de las toxinas para mostrar que estas moléculas son de estructura similar.

El gen de tipo silvestre para TcdA tiene aproximadamente 8.130 nucleótidos que codifican una proteína que tiene un peso molecular deducido de aproximadamente 308 kDa, que tiene aproximadamente 2.710 aminoácidos. Como se

usa en el presente documento, una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una TcdA de *C. difficile* de cualquier cepa de *C. difficile* de tipo silvestre. Una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* puede incluir una secuencia de aminoácidos de TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1 (longitud completa) cuando se alinea de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderación de espacios predeterminados.

En un aspecto preferido, la TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, que describe la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para TcdA de la cepa 630 de *C. difficile* (también divulgada en el GenBank acceso número YP_001087137.1 y/o CAJ67494.1). La cepa 630 de *C. difficile* se conoce en la técnica por ser una cepa PCR-ribotipo 012. La SEQ ID NO: 9 describe el gen de tipo silvestre para TcdA de la cepa 630 de *C. difficile*, que también se divulga en el GenBank acceso número NC_009089.1.

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

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

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

Ejemplos adicionales de un TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* incluyen TcdA de cepas de *C. difficile* de tipo silvestre que se pueden obtener de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta, GA). Los inventores descubrieron que la secuencia de aminoácidos de TcdA de cepas de *C. difficile* de tipo silvestre que se pueden obtener de los CDC incluyen al menos aproximadamente 99,3% a 100% de identidad, cuando se alinea de manera óptima, con los residuos de aminoácidos 1 a 821 de la SEQ ID NO: 1 (TcdA de *C. difficile* 630). Vease la Tabla 1.

Los inventores también descubrieron que la secuencia de aminoácidos de TcdA de cepas de *C. difficile* de tipo silvestre puede incluir al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hasta aproximadamente 100% de identidad, cuando se alinea de manera óptima (por ejemplo, cuando las secuencias de longitud completa están alineadas de manera óptima) con la SEQ ID NO: 1.

Tabla 1: Cepas de *C. difficile* de tipo silvestre obtenidas de CDC y el porcentaje de identidad de los residuos de aminoácidos 1-821 de TcdA de la respectiva cepa de *C. difficile* de tipo silvestre con los residuos de aminoácidos 1-821 de la SEQ ID NO: 1, cuando se alinean de manera óptima.

Tabla 1: Cepas de <i>C. difficile</i> de tipo silvestre de los CDC	
Identificación de la cepa de <i>C. difficile</i>	% aproximado de identidad de aminoácidos con los residuos 1-821 de la SEQ ID NO: 1
2004111	100
2004118	99,6
2004205	100
2004206	100
2005325	99,3
2005359	99,6
2006017	100
2007070	100

2007302	100
2007816	99,3
2007838	99,6
2007886	99,6
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100
2009292	99,6

Por consiguiente, en un aspecto, la secuencia de aminoácidos de TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una secuencia de al menos aproximadamente 500, 600, 700 u 800 residuos contiguos, que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99%, o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con una secuencia de igual longitud entre los residuos 1 a 900 de la SEQ ID NO : 1 cuando están alineadas de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderación de espacios predeterminados. Los ejemplos incluyen las cepas descritas anteriormente (por ejemplo, R20291, CD196, etc.) y las enumeradas en la Tabla 1.

En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos de TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una secuencia que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferiblemente aproximadamente 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con cualquier secuencia seleccionada de las SEQ ID NOs: 87-109 cuando se alinean de manera óptima. Véase la Tabla 1-a.

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

(continuación)

Tabla 1-a: Cepas de <i>C. difficile</i> de tipo silvestre	
Identificación de la cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina A, SEQ ID NO:
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	SEQ ID NO: 178
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	SEQ ID NO: 180
117	SEQ ID NO: 156
126	SEQ ID NO: 172
131	SEQ ID NO: 157
SE844	SEQ ID NO: 196
12087	SEQ ID NO: 197
K14	SEQ ID NO: 198
BI6	SEQ ID NO: 199
BI17	SEQ ID NO: 200
CH6230	SEQ ID NO: 201
SE881	SEQ ID NO: 202

El gen de tipo silvestre para TcdB tiene aproximadamente 7.098 nucleótidos que codifican una proteína con un peso molecular deducido de aproximadamente 270 kDa, que tiene aproximadamente 2.366 aminoácidos. Como se usa en el presente documento, una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una TcdB de cualquier cepa de *C. difficile* de tipo silvestre. Una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* puede incluir una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente un 99% o lo más preferiblemente aproximadamente un 100% de identidad con la SEQ ID NO: 2 cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de espacios predeterminados. En un aspecto preferido, la TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2, que describe la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para TcdB de la cepa 630 de *C. difficile* (también divulgada en el GenBank acceso número YP_001087135.1 y/o CAJ67492). La SEQ ID NO: 10 describe el gen de tipo silvestre para TcdB de la cepa 630 de *C. difficile*, que también se divulga en el GenBank acceso número NC_009089.1.

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

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

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

Ejemplos adicionales de una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* incluyen TcdB de cepas de *C. difficile* de tipo silvestre que se pueden obtener de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta, GA). Los inventores descubrieron que la secuencia de aminoácidos de TcdB de cepas de *C. difficile* de tipo silvestre que se pueden obtener de los CDC incluyen al menos aproximadamente 96% a 100% de identidad, cuando se alinean de manera óptima, con el residuo de aminoácido 1 a 821 de la SEQ ID NO: 2 (TcdB de *C. difficile* 630). Véase la Tabla 2.

Tabla 2: Cepas de *C. difficile* de tipo silvestre obtenidas de los CDC y el % de identidad de los residuos de aminoácidos 1-821 de TcdB de la respectiva cepa de *C. difficile* de tipo silvestre con los residuos de aminoácidos 1-821 de la SEQ ID NO: 2, cuando se alinean de manera óptima.

Tabla 2: Cepas de <i>C. difficile</i> de tipo silvestre de los CDC	
Identificación de la cepa de <i>C. difficile</i>	% Aproximado de identidad de aminoácidos con los residuos 1-821 de la SEQ ID NO: 2
2004013	96,0
2004111	100
2004118	96,0
2004206	100
2005022	100
2005325	96,7
2007302	100
2007816	96,7
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100

Por consiguiente, en un aspecto, una secuencia de aminoácidos de TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una secuencia de al menos aproximadamente 500, 600, 700 u 800 residuos contiguos, que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, preferiblemente aproximadamente 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con una secuencia de igual longitud entre los residuos 1 a 900 de la SEQ ID NO: 2 cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderación de espacios predeterminados. Los ejemplos incluyen las cepas descritas anteriormente (por ejemplo, R20291, CD196, etc.) y las enumeradas en la Tabla 2.

En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos de TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* incluye una secuencia que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferiblemente aproximadamente 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con cualquier secuencia seleccionada de las SEQ ID NOs: 110-133 cuando se alinean de manera óptima. Véase la Tabla 2-a.

Tabla 2-a: Cepas de <i>C. difficile</i> de tipo silvestre	
Identificación de la 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

(continuación)

Tabla 2-a: Cepas de <i>C. difficile</i> de tipo silvestre	
Identificación de la cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina B, SEQ ID NO:
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
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	SEQ ID NO: 182
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	SEQ ID NO: 179
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	SEQ ID NO: 181
117	SEQ ID NO: 166
126	SEQ ID NO: 177
131	SEQ ID NO: 167

Los genes de las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*) son parte de un locus genético de 19,6 kb (el locus de patogenicidad, PaLoc) que incluye 3 marcos de lectura abierta (ORF) pequeños adicionales, *tcdD*, *tcdE* y *tcdC*, y pueden considerarse útiles para la virulencia. Se sabe que PaLoc es estable y se conserva en cepas toxigénicas. Está presente en el mismo sitio de integración cromosómica en todas las cepas toxigénicas que se han analizado hasta la fecha. En las cepas no toxigénicas, el locus de patogenicidad (PaLoc) no está presente. Por consiguiente, una característica de las cepas de *C. difficile* de tipo silvestre descritas en el presente documento es la presencia de un locus de patogenicidad. Otra característica preferida de las cepas de *C. difficile* de tipo silvestre descritas en el presente documento es la producción tanto de TcdA como de TcdB.

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

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

Los algoritmos de alineación global (por ejemplo, programas de análisis de secuencia) son conocidos en la técnica y pueden usarse para alinear de manera óptima dos o más secuencias de toxina de aminoácidos para determinar si la toxina incluye un motivo distintivo particular (por ejemplo, DXD en el dominio de glucosiltransferasa, DHC en el dominio de cisteína proteasa descrito a continuación, etc.). La secuencia o secuencias alineadas de forma óptima se comparan con una secuencia de referencia respectiva (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 para TcdA o la SEQ ID NO: 2 para TcdB) para determinar la existencia del motivo de firma. "Alineación óptima" se refiere a una alineación que proporciona la puntuación de identidad porcentual más alta. Tal alineación se puede realizar usando programas de análisis de secuencia conocidos. En un aspecto, se usa una alineación CLUSTAL (tal como CLUSTALW) bajo parámetros predeterminados para identificar toxinas de tipo silvestre adecuadas comparando la secuencia de consulta con la secuencia de referencia. La numeración relativa de los residuos de aminoácidos conservados se basa en la numeración de residuos de la secuencia de aminoácidos de referencia para dar cuenta de pequeñas inserciones o eliminaciones (por ejemplo, cinco aminoácidos o menos) dentro de la secuencia alineada.

Como se usa en este documento, el término "de acuerdo con la numeración de" se refiere a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia cuando la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada se compara con la secuencia de referencia. En otras palabras, el número o la posición del residuo de un polímero dado se designa con respecto a la secuencia de referencia en lugar de mediante la posición numérica real del residuo dentro de la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada.

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos dada, tal como la de una cepa de *C. difficile* de tipo silvestre hipervirulenta, puede alinearse con una secuencia de referencia (por ejemplo, tal como la de una cepa histórica de *C. difficile* de tipo silvestre, por ejemplo, 630) introduciendo espacios, si es necesario, para optimizar las coincidencias de residuos entre las dos secuencias. En estos casos, aunque los espacios están presentes, la numeración del residuo en la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada se realiza con respecto a la secuencia de referencia con la cual se ha alineado. Como se usa en este documento, una "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias.

A menos que se indique lo contrario, todas las referencias en este documento a posiciones de aminoácidos de una TcdA se refieren a la numeración de la SEQ ID NO: 1. A menos que se indique lo contrario, todas las referencias en este documento a posiciones de aminoácidos de una TcdB se refieren a la numeración de la SEQ ID NO: 2.

El dominio de glucosiltransferasa de TcdA, como se usa en este documento, puede comenzar en el residuo ejemplar 1, 101 o 102, y puede terminar en el residuo ejemplar 542, 516 o 293 de una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. Cualquier posición de residuo mínimo puede combinarse con una posición de residuo máxima entre los residuos 1 y 542 de TcdA para definir una secuencia para el dominio de glucosiltransferasa siempre que se incluya la región del motivo DXD. Por ejemplo, en un aspecto, el dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluye la SEQ ID NO: 27, que es idéntica a los residuos 101-293 de la SEQ ID NO: 1, e incluye la región del motivo DXD. En otro aspecto, el dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluye la SEQ ID NO: 28, que es idéntica a los residuos 1-542 de la SEQ ID NO: 1.

El dominio de glucosiltransferasa de TcdB, como se usa en este documento, puede comenzar en el residuo ejemplar 1, 101 o 102, y puede terminar en el residuo ejemplar 543, 516 o 293 de una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2. Cualquier posición de residuo mínimo puede combinarse con una posición de residuo máxima entre los residuos 1 y 543 de TcdB para definir una secuencia para el dominio de glucosiltransferasa

siempre que se incluya la región del motivo DXD. Por ejemplo, en un aspecto, el dominio de glucosiltransferasa de TcdB incluye la SEQ ID NO: 29, que es idéntica a los residuos 101-293 de la SEQ ID NO: 2, e incluye la región del motivo DXD. En otro aspecto, el dominio de glucosiltransferasa de TcdB incluye la SEQ ID NO: 30, que es idéntica a los residuos 1-543 de la SEQ ID NO: 2.

Sin estar ligado a una teoría o mecanismo, se cree que el extremo terminal N de TcdA y/o TcdB es escindido por un proceso autoproteolítico para que el dominio de glucosiltransferasa sea translocado y liberado en el citosol de la célula huésped, en el que puede interactuar con las GTPasas Rac/Ras/Rho. Se ha demostrado que la TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* se escinde entre L542 y S543. Se ha demostrado que TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* se escinde entre L543 y G544.

El dominio de cisteína proteasa está asociado con la actividad proteolítica autocatalítica de la toxina. El dominio de cisteína proteasa está ubicado secuencia abajo del dominio de glucosiltransferasa y puede caracterizarse por la tríada catalítica aspartato, histidina y cisteína (DHC), por ejemplo, D589, H655 y C700 de una TcdA de tipo silvestre y D587, H653 y C698 de una TcdB de tipo silvestre. Sin estar ligado a ningún mecanismo o teoría, se cree que la tríada catalítica se conserva entre una toxina de una cepa "histórica", tal como 630, y una TcdB de una cepa hipervirulenta, tal como R20291.

El dominio de cisteína proteasa de TcdA, como se usa en este documento, puede comenzar en el residuo ejemplar 543 y puede terminar en el residuo ejemplar 809, 769, 768 o 767 de una TcdA de tipo silvestre, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. Cualquier posición de residuo mínimo se puede combinar con una posición de residuo máximo entre 543 y 809 de una TcdA de tipo silvestre para definir una secuencia para el dominio de cisteína proteasa siempre que se incluya la región del motivo DHC de la tríada catalítica. Por ejemplo, en un aspecto, el dominio de cisteína proteasa de TcdA incluye la SEQ ID NO: 32, que tiene la región del motivo DHC localizada en los residuos 47, 113 y 158 de la SEQ ID NO: 32, que corresponde respectivamente a D589, H655 y C700 de una TcdA de tipo silvestre de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 32 es idéntica a los residuos 543 a 809 de la SEQ ID NO: 1, TcdA.

El dominio de cisteína proteasa de TcdB, como se usa en este documento, puede comenzar en el residuo ejemplar 544, y puede terminar en el residuo ejemplar 801, 767, 755 o 700 de una TcdB de tipo salvaje, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2. Cualquier posición de residuo mínimo puede combinarse con una posición de residuo máximo entre 544 y 801 de una TcdB de tipo silvestre para definir una secuencia para el dominio de cisteína proteasa siempre que se incluya la región del motivo DHC de la tríada catalítica. Por ejemplo, en un aspecto, el dominio de cisteína proteasa de TcdB incluye la SEQ ID NO: 33, que incluye la región del motivo DHC ubicada en los residuos 44, 110 y 115 de la SEQ ID NO: 33, que corresponden respectivamente a D587, H653 y C698 de una TcdB de tipo silvestre de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 33 es idéntica a los residuos 544 a 767 de la SEQ ID NO: 2, TcdB. En otro aspecto, el dominio de cisteína proteasa de TcdB incluye los residuos 544-801 de la SEQ ID NO: 2, TcdB.

Toxina mutante

En la presente divulgación, la composición inmunogénica incluye una toxina mutante de *C. difficile*. El término "mutante", como se usa en este documento, se refiere a una molécula que exhibe una estructura o secuencia que difiere de la estructura o secuencia de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, por que entrecruzamientos en comparación con la estructura de tipo silvestre correspondiente y/o que tiene al menos una mutación, en comparación con la secuencia de tipo silvestre correspondiente cuando está alineada de manera óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de espacios predeterminados. El término "mutante" como se usa en este documento incluye además una molécula que exhibe una propiedad funcional (por ejemplo, actividad de glucosiltransferasa anulada y/o de cisteína proteasa anulada) que difiere de la molécula de tipo silvestre correspondiente.

Se puede usar una toxina de *C. difficile* de cualquiera de las cepas de tipo silvestre descritas anteriormente como fuente a partir de la cual se produce una toxina mutante de *C. difficile*. Preferiblemente, *C. difficile* 630 es la fuente a partir de la cual se produce una toxina mutante de *C. difficile*.

La mutación puede implicar una sustitución, eliminación, truncamiento o modificación del residuo de aminoácido de tipo silvestre normalmente ubicado en esa posición. Preferiblemente, la mutación es una sustitución de aminoácidos no conservadora. La presente divulgación también contempla polinucleótidos aislados que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las toxinas mutantes descritas en el presente documento.

Una sustitución de aminoácidos "no conservadora", como se usa en este documento, se refiere a un intercambio de un aminoácido de una clase por un aminoácido de otra clase, de acuerdo con la siguiente Tabla 3:

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

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

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

Las toxinas mutantes de la divulgación se pueden preparar mediante técnicas conocidas en el arte para preparar mutaciones, tales como, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis usando un mutágeno (por ejemplo, luz UV), etc. Preferiblemente, se usa mutagénesis dirigida al sitio. Alternativamente, se puede sintetizar directamente una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia objetivo. Estos procedimientos de síntesis química son conocidos en la técnica.

En la presente divulgación, la toxina mutante de *C. difficile* incluye al menos una mutación en un dominio de glucosiltransferasa, en relación con la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*. En un aspecto, el dominio de glucosiltransferasa incluye al menos dos mutaciones. Preferiblemente, la mutación disminuye o anula la actividad de la enzima glucosiltransferasa de la toxina, en comparación con la actividad de la enzima glucosiltransferasa de la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*.

Los residuos de aminoácidos ejemplares en un dominio de glucosiltransferasa de TcdA que pueden sufrir una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de los mismos: W101, D269, R272, D285, D287, E460, R462, S541 y L542, en comparación con una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Otros residuos de aminoácidos ejemplares que pueden sufrir una mutación incluyen E514, S517 y W519, en comparación con una TcdA de *C. difficile*, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

Las mutaciones ejemplares en un dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de los mismos: W101A, D269A, R272A, D285A, D287A, E460A, R462A, S541A y L542G, en comparación con una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*. En un aspecto preferido, el dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluye una mutación L542G, en comparación con una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*. En otro aspecto preferido, el dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluye una mutación D285A y D287A, en comparación con una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*.

Los residuos de aminoácidos ejemplares en un dominio de glucosiltransferasa de TcdB que pueden sufrir una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de los mismos: W102, D270, R273, D286, D288, N384, D461, K463, W520 y L543, en comparación con una toxina B de tipo silvestre de *C. difficile*, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. Otros ejemplos de residuos de aminoácidos que pueden sufrir una mutación incluyen E515, S518 y W520, en comparación con una *C. difficile* toxina B, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2.

Las mutaciones ejemplares en un dominio de glucosiltransferasa de TcdB incluyen al menos una de las siguientes, o cualquier combinación de los mismos: W102A, D270A, D270N, R273A, D286A, D288A, N384A, D461A, D461R, K463A, K463E, W520A, L543AA, en comparación con una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*. En un aspecto preferido, el dominio de glucosiltransferasa de TcdB incluye una L543A, en comparación con una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*. En otro aspecto preferido, el dominio de glucosiltransferasa de TcdB incluye una mutación D286A y D288A, en comparación con una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*.

Cualquiera de las mutaciones descritas en el presente documento anteriormente puede combinarse con una mutación en un dominio de cisteína proteasa. En la presente divulgación, la toxina mutante de *C. difficile* incluye al menos una mutación en un dominio de cisteína proteasa, en relación con la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*. Preferiblemente, la mutación disminuye o anula la actividad cisteína proteasa de la toxina, en comparación con la actividad cisteína proteasa de la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*.

Los residuos de aminoácidos ejemplares en un dominio de cisteína proteasa de TcdA que pueden sufrir una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de los mismos: S543, D589, H655 y C700, en comparación con TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Las mutaciones ejemplares en un dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluyen al menos uno de las siguientes, o

cualquier combinación de las mismas: S543A, D589A, D589N, H655A, C700A, en comparación con TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*. En un aspecto preferido, el dominio de cisteína proteasa de TcdA incluye una mutación C700A, en comparación con una TcdA de tipo silvestre de *C. difficile*.

Los residuos de aminoácidos ejemplares en un dominio de cisteína proteasa de TcdB que pueden sufrir una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de los mismos: G544, D587, H653 y C698, en comparación con TcdB de *C. difficile*, de tipo silvestre de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. Las mutaciones ejemplares en un dominio glucosiltransferasa de TcdB incluyen al menos una de las siguientes, o cualquier combinación de las mismas: G544A, D587A, D587N, H653A, C698A, en comparación con TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*. En un aspecto preferido, el dominio de cisteína proteasa de TcdB incluye una mutación C698A, en comparación con TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*. Los residuos de aminoácidos adicionales en un dominio de cisteína proteasa de TcdB que pueden sufrir una mutación incluyen: K600 y/o R751, en comparación con TcdB de tipo silvestre. Las mutaciones ejemplares incluyen K600E y/o R751E.

Por consiguiente, la toxina mutante de *C. difficile* de la invención incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene una mutación, con respecto a la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*. En un aspecto, la toxina mutante incluye al menos una mutación en el dominio de glucosiltransferasa y al menos una mutación en el dominio de cisteína proteasa. En un aspecto preferido, una toxina A mutante incluye al menos una mutación D285, D287 y C700. En un aspecto preferido, una toxina B mutante incluye al menos una mutación D286, D288 y C698. Las toxinas mutantes pueden incluir cualquier mutación adicional, individualmente o en combinación, descritas en el presente documento.

Una TcdA mutante de *C. difficile* ejemplar incluye un dominio de glucosiltransferasa que incluye la SEQ ID NO: 29 que tiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones 285 y 287, y un dominio de cisteína proteasa que comprende la SEQ ID NO: 32 que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 158, con respecto a la correspondiente toxina A de tipo silvestre de *C. difficile*. Por ejemplo, tal TcdA mutante de *C. difficile* incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4, en la que la metionina inicial opcionalmente no está presente. En otro aspecto, la toxina A mutante de *C. difficile* incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 84.

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

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

En algunos aspectos, la toxina mutante de *C. difficile* exhibe procesamiento autoproteolítico disminuido o anulado en comparación con la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*. Por ejemplo, una TcdA mutante de *C. difficile* puede incluir una mutación en uno de los siguientes residuos, o cualquier combinación de los mismos: S541, L542 y/o S543, en comparación con la TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* correspondiente. Preferiblemente, la TcdA mutante de *C. difficile* incluye al menos una de las siguientes mutaciones, o cualquier combinación de las mismas: S541A, L542G y S543A, en comparación con la TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* correspondiente.

Otra TcdA mutante de *C. difficile* ejemplar incluye una mutación S541A, L542, S543 y C700, en comparación con la TcdA de tipo silvestre de *C. difficile* correspondiente.

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

Otros ejemplos de una TcdB mutante de *C. difficile* incluyen la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8, que tiene una mutación D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A y C698A, en comparación con la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 8 en la que la metionina inicial opcionalmente no está presente. En otro aspecto, la toxina A mutante de *C. difficile* incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 85.

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

Como otro ejemplo, una TcdB mutante de *C. difficile* puede incluir una mutación en las posiciones 543 y/o 544, en comparación con la TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* correspondiente. Preferiblemente, la TcdB mutante de *C.*

difficile incluye una mutación L543 y/o G544, en comparación con la TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* correspondiente. Más preferiblemente, la TcdB mutante de *C. difficile* incluye una mutación L543G y/o G544A, en comparación con la TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* correspondiente.

- 5 Otra TcdB mutante de *C. difficile* ejemplar incluye una mutación L543G, G544A y C698, en comparación con la TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* correspondiente.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que tiene una mutación en cualquier posición desde el residuo de aminoácido 1 a 1.500 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2, para definir una toxina B mutante de *C. difficile* ejemplar. Por ejemplo, en un aspecto, el polipéptido aislado incluye una mutación entre los
10 residuos de aminoácidos 830 y 990 de las SEQ ID NO: 2. Las posiciones ejemplares para mutaciones incluyen las posiciones 970 y 976 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la mutación entre los residuos 830 y 990 es una sustitución. En un aspecto, la mutación es una sustitución no conservadora en la que un residuo de aminoácido Asp (D) y/o Glu (E) se reemplaza por un residuo de aminoácido que no se neutraliza tras la
15 acidificación, tal como, por ejemplo, lisina (K), arginina (R) e histidina (H). Las mutaciones ejemplares incluyen: E970K, E970R, E970H, E976K, E976R, E976H de la SEQ ID NO: 2, para definir una toxina B mutante de *C. difficile*.

En un aspecto, el polipéptido aislado incluye las siguientes sustituciones D286A/D288A/C698A/E970K/E976K (SEQ ID NO: 184). E970 y E976 se conservan en la toxina B de todas las cepas de *C. difficile* observadas (véase Tabla 2-
20 a, las SEQ ID NOs: 110-133), excepto en las cepas de ribotipo 078 y ribotipo 126 (véase la Tabla 35 y la Tabla 37). En la toxina B de las cepas ribotipo 078 y ribotipo 126, hay una glicina 970 (G970) en lugar de glutamato 970. Por consiguiente, en un aspecto, el polipéptido aislado incluye una mutación en G970 y E976, tal como, por ejemplo, G970K y E976K. Las toxinas mutantes descritas anteriormente y en el presente documento pueden presentar una citotoxicidad reducida en comparación con la correspondiente toxina de tipo silvestre. Véanse los Ejemplos 8 y 15).

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que tiene una mutación en cualquier posición desde el residuo de aminoácido 1 a 1.500 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1, para definir una toxina A mutante de *C. difficile* ejemplar. Por ejemplo, en un aspecto, el polipéptido aislado incluye una mutación entre los
30 residuos de aminoácidos 832 y 992 de la SEQ ID NO: 1. Las posiciones ejemplares para mutaciones incluyen las posiciones 972 y 978 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la mutación entre los residuos 832 y 992 es una sustitución. En un aspecto, la mutación es una sustitución no conservadora en la que un residuo de aminoácido Asp (D) y/o Glu (E) se reemplaza por un residuo de aminoácido que no se neutraliza tras la acidificación, tal como, por ejemplo, lisina (K), arginina (R) e histidina (H). Las mutaciones ejemplares incluyen:
35 D972K, D972R, D972H, D978K, D978R, D978H de la SEQ ID NO: 1, para definir una toxina A mutante de *C. difficile*.

En un aspecto, el polipéptido aislado incluye las siguientes sustituciones D285A/D287A/C700A/D972K/D978K (SEQ ID NO: 183). Los residuos D972 y D978 se conservan en la toxina A de todas las cepas de *C. difficile* evaluadas (véase la Tabla 1-a, las SEQ ID NOs: 87-109). Las toxinas mutantes descritas anteriormente y en el presente documento pueden presentar una citotoxicidad reducida en comparación con la correspondiente toxina de tipo
40 silvestre.

A continuación se describen toxinas mutantes ejemplares adicionales. En un aspecto, la toxina mutante TcdA incluye (i) la SEQ ID NO: 185; (ii) un polipéptido de la SEQ ID NO: 185 que tiene al menos 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 185; o (iii) un fragmento de al menos 250, 280 o 300 aminoácidos de la
45 SEQ ID NO: 185. En otro aspecto, la toxina mutante TcdB incluye (iv) la SEQ ID NO: 186; (v) un polipéptido de la SEQ ID NO: 186 que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 186; o (vi) un fragmento de al menos 250, 280 o 300 aminoácidos de la SEQ ID NO: 186.

En un aspecto, la toxina mutante TcdA consta de menos de 600, 675, 650, 625, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, o 225 aminoácidos. En un aspecto, la toxina mutante consta de menos de
50 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625, 600, 575, 550 o 525 aminoácidos. En un aspecto, la toxina mutante incluye al menos 200, 225, 250, 270, 280, 300 o 310 aminoácidos de la SEQ ID NO: 185 o al menos 200, 225, 250, 270, 280, 300 o 310 aminoácidos de un polipéptido que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 185. En un aspecto, la toxina mutante incluye al menos 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 o 610 aminoácidos de la SEQ ID NO: 186 o al menos 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 o 610 aminoácidos de un polipéptido que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 186.

En un aspecto, la toxina mutante incluye una proteína de fusión que incluye A) (i) la SEQ ID NO: 185; (ii) un polipéptido de la SEQ ID NO: 185 que tiene al menos 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la
60 SEQ ID NO: 185; o (iii) un fragmento de al menos 250, 280 o 300 aminoácidos de la SEQ ID NO: 185 fusionado a B) (iv) la SEQ ID NO: 186; (v) un polipéptido de la SEQ ID NO: 186 que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 186; o (vi) un fragmento de al menos 250, 280 o 300 aminoácidos de la SEQ ID NO: 186. En un aspecto adicional, el extremo terminal N de la SEQ ID NO: 185 es
65 adyacente al extremo terminal C de la SEQ ID NO: 186. En un aspecto adicional, el extremo terminal N de la SEQ ID NO: 185 es adyacente al extremo terminal N de la SEQ ID NO: 186. En un aspecto adicional, el extremo terminal C

de la SEQ ID NO: 185 es adyacente extremo terminal C de la SEQ ID NO: 186. Otros ejemplos de una toxina mutante incluyen un polipéptido que tiene una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 195.

En otro aspecto, la toxina mutante incluye una fusión y/o polipéptido híbrido que incluye cualquier combinación de secuencias de aminoácidos seleccionadas de cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, y SEQ ID NO: 243. Por ejemplo, en un aspecto, la toxina mutante incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 274 o SEQ ID NO: 275.

Otro ejemplo de una toxina mutante incluye un fragmento de una toxina de tipo silvestre. Un "fragmento" de toxina mutante TcdA como se usa en este documento se refiere a una secuencia de péptidos que tiene menos aminoácidos consecutivos totales que la correspondiente secuencia de TcdA de toxina de tipo silvestre de *C. difficile*, por ejemplo, una secuencia que incluye menos de 2.710 aminoácidos consecutivos en total. El fragmento de toxina mutante TcdA puede incluir además una mutación de un residuo de aminoácido como se describe en el presente documento. Un "fragmento" de la toxina mutante TcdB como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de péptidos que tiene menos aminoácidos consecutivos totales que la correspondiente secuencia de TcdB de la toxina de tipo silvestre de *C. difficile*, por ejemplo, una secuencia que incluye menos de 2.366 aminoácidos consecutivos en total. El fragmento de toxina mutante TcdB puede incluir además una mutación de un residuo de aminoácido como se describe en el presente documento. Tales secuencias de toxina mutante ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33. En un aspecto, la toxina mutante TcdA incluye al menos 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900 o 2.000 aminoácidos consecutivos de una toxina A mutante de tipo silvestre, como se describe en el presente documento, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, una toxina mutante incluye un fragmento de una toxina A mutada genéticamente descrita en el presente documento. En un aspecto, la toxina mutante TcdB incluye al menos 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900 o 2.000 aminoácidos consecutivos de una toxina B mutante de tipo silvestre, como se describe en este documento, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, una toxina mutante incluye un fragmento de una toxina B mutada genéticamente descrita en este documento. En un aspecto, la toxina mutante incluye como máximo 3.000, 2.710, 2.500, 2.400, 2.366, 2.000, 1.900, 1.800, 1.700, 1.600, 1.500, 1.400, 1.300, 1.200, 1.100, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 o 300 aminoácidos consecutivos. Cualquier valor mínimo puede combinarse con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En otro aspecto, la toxina mutante se fusiona con al menos otro péptido o al menos otra toxina mutante de una manera que da como resultado la producción de una molécula híbrida.

El fragmento de toxina mutante TcdA ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 374 a la SEQ ID NO: 421. El fragmento de toxina mutante TcdA ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 472 a la SEQ ID NO: 519. La toxina mutante TcdB ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 422 a la SEQ ID NO: 471. El fragmento de toxina mutante TcdB ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 568 a la SEQ ID NO: 615.

A continuación se describen otras toxinas mutantes ejemplares. En un aspecto, la toxina mutante incluye TcdA que incluye o consiste en al menos 3, al menos 4 o al menos 5 mutaciones en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: W101, D287, E514, D285, S517, W519, y C700, por ejemplo, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. En aspectos adicionales; los mutantes de TcdA incluyen o consisten en al menos 3, al menos 4, o al menos 5 mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: sustituciones de W101A, D287A, E514Q, D285A, S517A, W519A y C700A y una eliminación de W101.

Otra toxina mutante TcdA ejemplar incluye las sustituciones de aminoácidos W101, D287A y E514Q, por ejemplo, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Un aspecto adicional proporciona una proteína de TcdA que incluye o consiste en las sustituciones de aminoácidos W101A, D287A, E514Q, y W519A. Otro aspecto específico de la divulgación es una proteína de TcdA que incluye o consiste en las sustituciones de aminoácidos W101A, D287A, E514Q, W519A y C700A.

En otro aspecto, la toxina mutante TcdA incluye las mutaciones W101A, D287A, E514Q y D285A, por ejemplo, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la toxina mutante TcdA incluye las mutaciones W101A, D287A, E514Q y S517A.

En otro aspecto, se puede añadir una mutación adicional a la TcdA mutante, por ejemplo, una mutación C700A. En aspectos adicionales, se pueden agregar hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mutaciones adicionales a cualquiera de los aspectos de la toxina TcdA mutante descritos en el presente documento.

Otros ejemplos de una toxina mutante TcdA incluyen la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 o SEQ ID NO: 211. En otro aspecto, la toxina mutante TcdA incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 210. En otro aspecto más, la toxina mutante TcdA incluye una mutación en las posiciones W101, D287, E514, W519 y C700; en las que W101 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto triptófano, D287 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto ácido aspártico, E514 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto ácido glutámico, W519 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto triptófano y C700 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto cisteína, como se establece en la SEQ ID NO: 212.

Los ejemplos adicionales de una toxina mutante TcdA incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de referencia original (por ejemplo, la SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 211 o SEQ ID NO: 212 o SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 o SEQ ID NO: 86).

En un aspecto adicional, la toxina mutante TcdA incluye mutaciones como máximo de 12 residuos de aminoácidos, como máximo de 11 residuos de aminoácidos, como máximo de 10 residuos de aminoácidos, como máximo de 9 residuos de aminoácidos, como máximo de 8 residuos de aminoácidos, como máximo 7 residuos de aminoácidos, como máximo 6 residuos de aminoácidos, como máximo 5 residuos de aminoácidos, como máximo 4 residuos de aminoácidos, como máximo 3 residuos de aminoácidos, como máximo 2 residuos de aminoácidos, o 1 residuo de aminoácido, por ejemplo, con respecto a la SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 211 y SEQ ID NO: 212 o SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 o SEQ ID NO: 86.

A continuación se describen toxinas mutantes ejemplares adicionales. En un aspecto, la toxina mutante es una TcdB mutante que incluye al menos 3, al menos 4 o al menos 5 mutaciones en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: W102, D288, E515, D286, S518, W520, y C698, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la toxina mutante TcdB incluye al menos 3, al menos 4, o al menos 5 mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: las sustituciones de W102A, D288A, E515Q, D286A, S518A, W520A y C698A y una eliminación de W102. En un aspecto, la toxina mutante TcdB incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220 o SEQ ID NO: 221. En otro aspecto más, la toxina mutante TcdB incluye una mutación en las posiciones W102, D288, E515, W520 y C698; en las que W102 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto triptófano, D288 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto ácido aspártico, E515 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto ácido glutámico, W520 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto triptófano y C698 se reemplaza con cualquier aminoácido excepto cisteína, como se establece en la SEQ ID NO: 222.

Los ejemplos adicionales de una toxina mutante TcdB incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de referencia original SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 o SEQ ID NO: 222.

En un aspecto adicional, la toxina mutante TcdB incluye mutaciones como máximo de 12 residuos de aminoácidos, como máximo de 11 residuos de aminoácidos, como máximo de 10 residuos de aminoácidos, como máximo de 9 residuos de aminoácidos, como máximo de 8 residuos de aminoácidos, como máximo 7 residuos de aminoácidos, como máximo 6 residuos de aminoácidos, como máximo 5 residuos de aminoácidos, como máximo 4 residuos de aminoácidos, como máximo 3 residuos de aminoácidos, como máximo 2 residuos de aminoácidos, o 1 residuo de aminoácido, por ejemplo, con respecto a la SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 y/o SEQ ID NO: 222.

La toxina mutante TcdA ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 276 a SEQ ID NO: 323. La toxina mutante TcdB ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 324 a SEQ ID NO: 373.

A continuación se describen toxinas mutantes ejemplares adicionales. En un aspecto, la toxina mutante TcdA incluye una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9% o 100%) con la SEQ ID NO: 224 o SEQ ID NO: 245; y/o b) que es un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 224 o la SEQ ID NO: 245, en los que "n" es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 250, 300, 400, 500, 540 o más) o de un polipéptido que tiene 80% o más identidad con la SEQ ID NO: 224 o la SEQ ID NO: 245 y que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 224 y/o la SEQ ID NO: 245.

- En un aspecto, la toxina mutante TcdA incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, o SEQ ID NO: 236.
- 5 Aspectos ejemplares adicionales de una toxina mutante TcdA incluyen la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 262 y/o SEQ ID NO: 263.
- 10 En un aspecto, la toxina mutante TcdB incluye una secuencia de aminoácidos (a) que tiene un 80% o más de identidad con la SEQ ID NO: 238 o SEQ ID NO: 247; y/o b) que es un fragmento de al menos 7 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 238 o la SEQ ID NO: 247, o de un polipéptido que tiene 80% o más de identidad con la SEQ ID NO: 238 o la SEQ ID NO: 247 y que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 238 o la SEQ ID NO: 247.
- 15 En un aspecto, la toxina mutante TcdB incluye una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9% o más) con la SEQ ID NO: 238 o la SEQ ID NO: 247; y/o (b) que es un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 238 o la SEQ ID NO: 247, o de un polipéptido que tiene 50% o más de identidad con la SEQ ID NO: 238 o la SEQ ID NO: 247, en la que "n" es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 250, 300, 400, 500, 540 o más).
- 20 En un aspecto, la toxina mutante TcdB incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, o SEQ ID NO: 243. Aspectos ejemplares adicionales de una toxina mutante TcdB incluye la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 268 y/o SEQ ID NO: 269.
- 25 La toxina mutante TcdA ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 520 a la SEQ ID NO: 567. La toxina mutante TcdB ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 616 a la SEQ ID NO: 663.
- 30 A continuación se describen toxinas mutantes ejemplares adicionales. En un aspecto, la toxina mutante TcdA incluye un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 664 a la SEQ ID NO: 711. La toxina mutante TcdB ejemplar adicional incluye un polipéptido que tiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ. ID NO: 712 a la SEQ ID NO: 761.
- 35 Los polipéptidos de la divulgación pueden incluir un residuo de metionina inicial, en algunos casos como resultado de un proceso mediado por una célula huésped. Dependiendo, por ejemplo, de la célula huésped utilizada en un procedimiento de producción recombinante y/o las condiciones de fermentación o crecimiento de la célula huésped, se sabe en la técnica que la metionina de extremo terminal N codificada por el codón de inicio de la traducción puede eliminarse de un polipéptido después de la traducción en células o la metionina del extremo terminal N puede permanecer presente en el polipéptido aislado.
- 40 Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4, en la que la metionina inicial (en la posición 1) opcionalmente no está presente. En un aspecto, la metionina inicial de la SEQ ID NO: 4 está ausente. En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 84, que es idéntica a la SEQ ID NO: 4, pero en ausencia de la metionina inicial.
- 45 En otro aspecto, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6, en la que la metionina inicial (en la posición 1) opcionalmente no está presente. En un aspecto, la metionina inicial de la SEQ ID NO: 6 está ausente. En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 86, que es idéntica a la SEQ ID NO: 6, pero en ausencia de la metionina inicial.
- 50 En un aspecto adicional, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 7, en la que la metionina inicial (en la posición 1) opcionalmente no está presente. En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 83, que es idéntica a la SEQ ID NO: 7, pero en ausencia de la metionina inicial. En otro aspecto más, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8, en la que la metionina inicial (en la posición 1) opcionalmente no está presente. En un aspecto, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 85, que es idéntica a la SEQ ID NO: 8, pero por la ausencia de la metionina inicial.
- 55 En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4, en la que la metionina inicial (en la posición 1) opcionalmente no está presente. En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6, en la que la metionina inicial (en la posición 1)
- 60
- 65

opcionalmente no está presente. En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 7, en la que la metionina inicial (en la posición 1) opcionalmente no está presente. En otro aspecto más, la divulgación se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 8, en la que la metionina inicial (en la posición 1) opcionalmente no está presente.

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

Citotoxicidad

Además de generar una respuesta inmune en un mamífero, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento también tienen una citotoxicidad reducida en comparación con la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*. Preferiblemente, las composiciones inmunogénicas son seguras y tienen una citotoxicidad mínima (por ejemplo, una reducción de aproximadamente 6-8 log₁₀) o ninguna, en relación con la citotoxicidad de una toxina de tipo silvestre respectiva, para la administración en mamíferos.

Como se usa en este documento, el término citotoxicidad es un término entendido en la técnica y se refiere a la muerte celular apoptótica y/o un estado en el que una o más funciones bioquímicas o biológicas habituales de una célula están comprometidas aberrantemente, en comparación con una célula idéntica celular en condiciones idénticas pero en ausencia del agente citotóxico. La toxicidad se puede cuantificar, por ejemplo, en células o en mamíferos como la cantidad de un agente necesario para inducir la muerte celular en un 50% (es decir, CE₅₀ o DE₅₀, respectivamente) o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica.

Los ensayos para indicar citotoxicidad son conocidos en la técnica, tales como ensayos de redondeo celular (véase, por ejemplo, Kuehne et al. Nature. 7 de octubre de 2010; 467 (7316): 711-3). La acción de TcdA y TcdB hace que las células se redondeen (por ejemplo, pérdida de morfología) y muerte, y tal fenómeno es visible por microscopía óptica. Véase, por ejemplo, la Figura 9.

Los ensayos de citotoxicidad ejemplares adicionales conocidos en la técnica incluyen ensayos de glucosilación relacionados con la obtención de imágenes de fósforo de Ras marcado con ensayos de [¹⁴C]glucosa (como se describe en Busch et al., J Biol Chem. 31 de julio de 1998; 273 (31)): 19566-72), y preferiblemente el ensayo de citotoxicidad *in vitro* descrito en los Ejemplos a continuación, en los que CE₅₀ puede referirse a una concentración de una composición inmunogénica que exhibe al menos aproximadamente 50% de efecto citopatogénico (ECP) en una célula, preferiblemente una célula de fibroblasto diploide humana (por ejemplo, célula IMR90 (ATCC CCL-186^{MR})), en comparación con una célula idéntica en condiciones idénticas en ausencia de la toxina. El ensayo de citotoxicidad *in vitro* también se puede utilizar para evaluar la concentración de una composición que inhibe en al menos aproximadamente el 50% de un efecto citopatogénico (ECP) inducido por la toxina de tipo silvestre de *C. difficile* en una célula, preferiblemente una célula de fibroblasto diploide humana (por ejemplo, célula IMR90 (ATCC CCL-186^{MR})), en comparación con una célula idéntica bajo idénticas condiciones en ausencia de la toxina. Los ensayos de citotoxicidad ejemplares adicionales incluyen los descritos en Doern et al., J Clin Microbiol. Agosto de 1992; 30 (8): 2042-6. La citotoxicidad también se puede determinar midiendo los niveles de ATP en células tratadas con toxina. Por ejemplo, puede usarse un sustrato basado en luciferasa tal como CELLTITERGLO® (Promega), que emite luminiscencia medida como una unidad relativa de luz (URL). En tal ensayo, la viabilidad celular puede ser directamente proporcional a la cantidad de ATP en las células o los valores de URL.

En un aspecto, la citotoxicidad de la composición inmunogénica se reduce en al menos aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000 veces o más, en comparación con la correspondiente toxina de tipo silvestre de *C. difficile*. Véase, por ejemplo, la Tabla 20.

En otro aspecto, la citotoxicidad de la composición inmunogénica se reduce en al menos aproximadamente 2-log₁₀, más preferiblemente en aproximadamente 3-log₁₀, y lo más preferiblemente en aproximadamente 4-log₁₀ o más, con respecto a la toxina de tipo silvestre correspondiente, en idénticas condiciones. Por ejemplo, una TcdB mutante de *C. difficile* puede tener un valor de CE₅₀ de aproximadamente 10⁻⁹ g/ml medido en un ensayo de efecto citopático estándar (ECP), en comparación con una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* ejemplar que puede tener un valor de CE₅₀ de al menos aproximadamente 10-12 g/ml. Véanse, por ejemplo, las Tablas 7A, 7B, 8A y 8B en la sección de Ejemplos a continuación.

En otro aspecto más, la citotoxicidad de la toxina mutante de *C. difficile* tiene una CE₅₀ de al menos aproximadamente 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1.000 µg/ml o más, medida, por ejemplo, mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro*, tal como se describe en el presente documento. Por consiguiente, en un aspecto preferido, las composiciones inmunogénicas y las toxinas mutantes son biológicamente seguras para la administración a mamíferos.

Sin estar ligado por un mecanismo o teoría, una TcdA que tiene una mutación D285 y D287, en comparación con una TcdA de tipo silvestre, y una TcdB que tiene una mutación D286 y D288, en comparación con una TcdB de tipo silvestre, se esperaba que fueran defectuosas en la actividad glucosiltransferasa y, por lo tanto, defectuosas en la inducción de un efecto citopático. Además, se esperaba que una toxina que tenía una mutación en el motivo DHC fuera defectuosa en el procesamiento autocatalítico y, por lo tanto, careciera de efectos citotóxicos.

Sin embargo, los inventores descubrieron sorprendentemente, entre otras cosas, que la TcdA mutante ejemplar que tiene la SEQ ID NO: 4 y la TcdB mutante ejemplar que tiene la SEQ ID NO: 6 exhibieron inesperadamente citotoxicidad (aunque reducida significativamente a partir de las toxinas de *C. difficile* 630 de tipo silvestre) a pesar de exhibir actividad glucosiltransferasa disfuncional y actividad cisteína proteasa disfuncional. Sin estar ligados a ningún mecanismo o teoría, se cree que las toxinas mutantes producen citotoxicidad a través de un mecanismo novedoso. No obstante, la TcdA mutante ejemplar que tiene la SEQ ID NO: 4 y la TcdB mutante ejemplar que tiene la SEQ ID NO: 6 fueron sorprendentemente inmunogénicas. Véanse los ejemplos a continuación.

Entrecruzamiento

Aunque el entrecruzamiento químico de una toxina de tipo silvestre tiene el potencial de fallar en la inactivación de la toxina, los inventores descubrieron además que el entrecruzamiento químico de al menos un aminoácido de una toxina mutante reducía aún más la citotoxicidad de la toxina mutante, en relación con una toxina mutante idéntica que carece de entrecruzamientos químicos, y relativa a la correspondiente toxina de tipo silvestre. Preferiblemente, la toxina mutante se purifica antes del contacto con el agente de entrecruzamiento químico.

Además, a pesar del potencial de los agentes de entrecruzamiento químicos para alterar epítomos útiles, los inventores descubrieron sorprendentemente que una toxina mutante de *C. difficile* modificada genéticamente que tiene al menos un aminoácido químicamente entrecruzado dio como resultado composiciones inmunogénicas que provocaron múltiples anticuerpos neutralizantes o fragmentos de unión de los mismos. Por consiguiente, los epítomos asociados con las moléculas de anticuerpos neutralizantes se retuvieron inesperadamente después del entrecruzamiento químico.

El entrecruzamiento (también denominado "inactivación química" o "inactivación" en el presente documento) es un proceso de unir químicamente dos o más moléculas mediante un enlace covalente. Los términos "reactivos de entrecruzamiento", "agentes de entrecruzamiento" y "entrecruzadores" se refieren a moléculas que son capaces de reaccionar y/o unirse químicamente a grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, carboxilos, carbonilos, etc.) en péptidos, polipéptidos y/o proteínas. En un aspecto, la molécula puede contener dos o más extremos reactivos que son capaces de reaccionar y/o unirse químicamente a grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, carboxilos, carbonilos, etc.) en péptidos, polipéptidos y/o proteínas. Preferiblemente, el agente de entrecruzamiento químico es soluble en agua. En otro aspecto preferido, el agente de entrecruzamiento químico es un entrecruzador heterobifuncional. En otro aspecto, el agente de entrecruzamiento químico no es un entrecruzador bifuncional. Los agentes de entrecruzamiento químicos son conocidos en la técnica.

En un aspecto preferido, el agente de entrecruzamiento es un agente de entrecruzamiento de longitud cero. Un entrecruzador de "longitud cero" se refiere a un agente de entrecruzamiento que mediará o producirá un entrecruzamiento directo entre grupos funcionales de dos moléculas. Por ejemplo, en el entrecruzamiento de dos polipéptidos, un entrecruzador de longitud cero dará como resultado la formación de un puente, o un entrecruzamiento entre un grupo carboxilo de una cadena lateral de aminoácidos de un polipéptido y un grupo amino de otro polipéptido, sin integrar materia extrínseca. Los agentes de entrecruzamiento de longitud cero pueden catalizar, por ejemplo, la formación de enlaces éster entre fracciones hidroxilo y carboxilo, y/o la formación de enlaces amida entre fracciones carboxilo y amino primarias.

Los agentes de entrecruzamiento químicos adecuados ejemplares incluyen formaldehído; formalina; acetaldehído; propionaldehído; carbodiimidas solubles en agua ($RN=C=NR'$), que incluyen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, meto-p-toluenosulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida (CMC), N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), y derivados de los mismos; y N-hidroxisuccinimida (NHS), fenilgloxal y/o UDP-dialdehído.

Preferiblemente, el agente de entrecruzamiento es EDC. Cuando un polipéptido de toxina mutante de *C. difficile* es modificado químicamente por EDC (por ejemplo, al poner en contacto el polipéptido con EDC), en un aspecto, el polipéptido incluye (a) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En un aspecto, el polipéptido incluye (b) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En un aspecto, el polipéptido incluye (c) al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo terminal C del polipéptido y el grupo amino del extremo terminal N del polipéptido. En un aspecto, el polipéptido incluye (d) al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo terminal C del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En un aspecto, el polipéptido incluye (e) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado. En un aspecto, el

polipéptido incluye **(f)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado. En un aspecto, el polipéptido incluye **(g)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo terminal C del polipéptido y el grupo amino del extremo terminal N de un segundo polipéptido aislado. En un aspecto, el polipéptido incluye **(h)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo terminal C del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado. Véase, por ejemplo, la Figura 24 y la Figura 25.

El "segundo polipéptido aislado" se refiere a cualquier polipéptido aislado que está presente durante la reacción con EDC. En un aspecto, el segundo polipéptido aislado es un polipéptido de toxina mutante de *C. difficile* que tiene una secuencia idéntica a la del primer polipéptido aislado. En otro aspecto, el segundo polipéptido aislado es un polipéptido de toxina mutante de *C. difficile* que tiene una secuencia diferente del primer polipéptido aislado.

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

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

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

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

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

En un aspecto preferido, el agente de entrecruzamiento químico incluye formaldehído, más preferiblemente, un agente que incluye formaldehído en ausencia de lisina. Puede usarse glicina u otro compuesto apropiado con una amina primaria como inhibidor en reacciones de entrecruzamiento. Por consiguiente, en otro aspecto preferido, el agente químico incluye formaldehído y uso de glicina.

En otro aspecto preferido más, el agente de entrecruzamiento químico incluye EDC y NHS. Como se conoce en la técnica, el NHS puede incluirse en los protocolos de acoplamiento de EDC. Sin embargo, los inventores descubrieron sorprendentemente que el NHS puede facilitar la disminución adicional de la citotoxicidad de la toxina mutante de *C. difficile*, en comparación con la toxina de tipo silvestre correspondiente, en comparación con una toxina mutada genéticamente, y en comparación con una toxina mutada genéticamente que ha sido químicamente entrecruzada por EDC. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 22. Por consiguiente, sin estar ligado por un mecanismo o teoría, un polipéptido de toxina mutante que tiene una fracción de beta-alanina unida a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido (por ejemplo, resultante de una reacción del polipéptido de toxina mutante, EDC, y NHS) puede facilitar la disminución adicional de la citotoxicidad de la toxina mutante, en

comparación con, por ejemplo, una toxina de *C. difficile* (de tipo silvestre o mutante) en la que está ausente una fracción de beta-alanina.

El uso de EDC y/o NHS también puede incluir el uso de glicina u otro compuesto apropiado con una amina primaria como inactivador. Se puede utilizar cualquier compuesto que tenga una amina primaria como inactivador, tal como, por ejemplo, éster metílico de glicina y alanina. En un aspecto preferido, el compuesto inactivador es una amina primaria hidrófila no polimérica. Los ejemplos de una amina primaria hidrófila no polimérica incluyen, por ejemplo, amino azúcares, aminoalcoholes y aminopolioles. Los ejemplos específicos de una amina primaria hidrófila no polimérica incluyen glicina, etanolamina, glucamina, polietilenglicol con la función amina y oligómeros de etilenglicol con la función amina.

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

En un aspecto, cuando un polipéptido de toxina mutante de *C. difficile* es modificado químicamente por EDC y glicina, el polipéptido incluye al menos una modificación cuando el polipéptido es modificado por EDC (por ejemplo, al menos uno de cualquiera de las modificaciones (a) - (h) descritas anteriormente), y al menos una de las siguientes modificaciones ejemplares: (i) una fracción de glicina unida al grupo carboxilo en el extremo terminal C del polipéptido; (j) una fracción de glicina unida a una cadena lateral de al menos un residuo de ácido aspártico del polipéptido; y (k) una fracción de glicina unida a una cadena lateral de al menos un residuo de ácido glutámico del polipéptido. Véase, por ejemplo, la Figura 24 y la Figura 25.

En un aspecto, al menos un aminoácido de la TcdA de TcdA de *C. difficile* está químicamente entrecruzado y/o al menos un aminoácido de la TcdB mutante de *C. difficile* está químicamente entrecruzado. Cualquiera de las toxinas mutantes descritas en el presente documento puede entrecruzarse químicamente. En otro aspecto, al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8 está químicamente entrecruzado. En un aspecto, al menos un residuo de aminoácido de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 761 está entrecruzado. En otro aspecto, al menos un residuo de aminoácido de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID NO: 183 a la SEQ ID NO: 761 incluye una modificación como se describió anteriormente, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones (a) - (k), tales como (a) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido.

Por ejemplo, al menos un aminoácido puede estar químicamente entrecruzado por un agente que incluye una carbodiimida, tal como EDC. Las carbodiimidas pueden formar un enlace covalente entre carboxilo libre (por ejemplo, de las cadenas laterales de ácido aspártico y/o ácido glutámico) y grupos amino (por ejemplo, en la cadena lateral de residuos de lisina) para formar enlaces amida estables.

Como otro ejemplo, al menos un aminoácido puede estar químicamente entrecruzado por un agente que incluye NHS. Los entrecruzadores activados por éster de NHS pueden reaccionar con aminas primarias (por ejemplo, en el extremo terminal N de cada cadena polipeptídica y/o en la cadena lateral de los residuos de lisina) para producir un enlace amida.

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

Cuando un polipéptido de la toxina mutante de *C. difficile* se modifica químicamente mediante (por ejemplo, al poner en contacto) EDC y NHS, en un aspecto, el polipéptido incluye al menos una modificación cuando el polipéptido es modificado por EDC (por ejemplo, al menos una de cualquiera de las modificaciones (a) - (h) descritas anteriormente) y (l) una fracción de beta-alanina unida a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido de toxina mutante de *C. difficile* en el que el polipéptido incluye al menos una cadena lateral de aminoácido modificada químicamente por EDC, NHS y una amina primaria hidrófila no polimérica, preferiblemente glicina. En un aspecto, el polipéptido incluye al menos una modificación

cuando el polipéptido es modificado por EDC (por ejemplo, al menos una de cualquiera de las modificaciones (a) - (h) descritas anteriormente), al menos una modificación cuando el polipéptido es modificado por glicina (por ejemplo, al menos una de cualquiera de las modificaciones (i) - (k) descritas anteriormente) y (l) una fracción de beta-alanina unida a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido. Véase, por ejemplo, la Figura 24 y la Figura 25.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido de toxina mutante de *C. difficile*, en el que una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido está unida a una fracción de beta-alanina. En un aspecto, una cadena lateral de un segundo residuo de lisina del polipéptido se une a una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico y/o a una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico. El "segundo" residuo de lisina del polipéptido incluye un residuo de lisina del polipéptido que no está unido a una fracción de beta-alanina. La cadena lateral de un ácido aspártico y/o la cadena lateral de un ácido glutámico a la que está unido el segundo residuo de lisina puede ser la del polipéptido para formar un entrecruzamiento intramolecular, o la de un segundo polipéptido para formar un entrecruzamiento inter-molecular. En otro aspecto, una cadena lateral de al menos un residuo de ácido aspártico y/o una cadena lateral de al menos un residuo de ácido glutámico del polipéptido está unido a una fracción de glicina. El residuo de ácido aspártico y/o el residuo de ácido glutámico que está unido a una fracción de glicina no está unido también a una fracción de lisina.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una toxina mutante de *C. difficile* en la que al menos una cadena lateral de aminoácidos de una toxina de tipo silvestre de *C. difficile* está químicamente modificada. En un aspecto, al menos una cadena lateral de aminoácidos de una toxina A de tipo silvestre de *C. difficile* y/o al menos una cadena lateral de aminoácidos de una toxina B de tipo silvestre de *C. difficile* está químicamente modificada por EDC. Por ejemplo, en un aspecto, TcdA (SEQ ID NO: 1) y/o TcdB (SEQ ID NO: 2) está químicamente modificada por EDC. En otro aspecto, la toxina de tipo silvestre está modificada químicamente por EDC y NHS. En un aspecto, la toxina mutante incluye una toxina A de tipo silvestre modificada químicamente, en la que la toxina A de tipo silvestre es cualquiera de las descritas en la Tabla 1-a. En otro aspecto, la toxina mutante incluye una toxina B de tipo silvestre químicamente modificada, en la que la toxina B de tipo silvestre es cualquiera de las descritas en la Tabla 2-a.

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

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

Preferiblemente, el agente de entrecruzamiento químico reduce la citotoxicidad de la toxina mutante de *C. difficile* en al menos aproximadamente una reducción de 2 log₁₀, más preferiblemente aproximadamente una reducción de 3 log₁₀ y lo más preferiblemente aproximadamente de 4 log₁₀ o más, con respecto a la toxina mutante en condiciones idénticas pero en ausencia del agente de entrecruzamiento químico. En comparación con la toxina de tipo silvestre, el agente de entrecruzamiento químico reduce preferiblemente la citotoxicidad de la toxina mutante en al menos aproximadamente una reducción de 5 log₁₀, aproximadamente una reducción de 6 log₁₀, aproximadamente una reducción de 7 log₁₀, aproximadamente una reducción de 8 log₁₀, o más.

En otro aspecto preferido, la toxina mutante de *C. difficile* químicamente inactivada exhibe un valor de CE₅₀ mayor que o al menos aproximadamente 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1.000 µg/ml o más, medido, por ejemplo, mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro*, tal como uno descrito en el presente documento.

Las condiciones de reacción para poner en contacto la toxina mutante con el agente de entrecruzamiento químico están dentro del alcance de la experiencia de un experto en la técnica, y las condiciones pueden variar dependiendo del agente utilizado. Sin embargo, los inventores descubrieron sorprendentemente condiciones de reacción óptimas para poner en contacto un polipéptido de toxina mutante de *C. difficile* con un agente de entrecruzamiento químico, mientras retienen los epítomos funcionales y disminuyen la citotoxicidad de la toxina mutante, en comparación con la correspondiente toxina de tipo silvestre.

Preferiblemente, las condiciones de reacción se seleccionan para poner en contacto una toxina mutante con el agente de entrecruzamiento, en las que la toxina mutante tiene una concentración mínima de aproximadamente 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0 mg/ml hasta un máximo de aproximadamente 3,0, 2,5, 2,0, 1,5 o 1,25 mg/ml. Cualquier valor mínimo puede combinarse con cualquier valor máximo para definir un intervalo de concentraciones adecuadas de una toxina mutante para la reacción. Lo más preferiblemente, la toxina mutante tiene una concentración de aproximadamente 1,0 - 1,25 mg/ml para la reacción.

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

En un aspecto preferido en el que el agente incluye formaldehído, la concentración usada es preferiblemente cualquier concentración entre aproximadamente 2 mM y 80 mM, lo más preferiblemente aproximadamente 40 mM. En otro aspecto preferido en el que el agente incluye EDC, la concentración utilizada es preferiblemente cualquier concentración entre aproximadamente 1,3 mM y aproximadamente 13 mM, más preferiblemente aproximadamente 2 mM a 3 mM, lo más preferiblemente aproximadamente 2,6 mM. En un aspecto, la concentración de EDC es como máximo 5 g/l, 4 g/l, 3 g/l, 2,5 g/l, 2 g/l, 1,5 g/l, 1,0 g/l, 0,5 g/l con base en el volumen de reacción total, preferiblemente como máximo 1 g/l, más preferiblemente como máximo 0,5 g/l

Los tiempos de reacción ejemplares en los que la toxina mutante se pone en contacto con el agente de entrecruzamiento químico incluyen un mínimo de aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48 o 60 horas, y un máximo de aproximadamente 14 días, 12 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día o 12 horas, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 hora. Cualquier valor mínimo puede combinarse con cualquier valor máximo para definir un intervalo de tiempos de reacción adecuados.

En un aspecto preferido, la etapa de poner en contacto la toxina mutante con el agente de entrecruzamiento químico ocurre durante un período de tiempo que es suficiente para reducir la citotoxicidad de la toxina mutante de *C. difficile* hasta un valor de CE_{50} de al menos aproximadamente 1.000 μ g/ml en una célula humana adecuada, por ejemplo, células IMR-90, en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* estándar, en comparación con una toxina mutante idéntica en ausencia del agente de entrecruzamiento. Más preferiblemente, la etapa de reacción se lleva a cabo durante un tiempo que es al menos dos veces más largo, y lo más preferiblemente al menos tres veces más largo o más, que el período de tiempo suficiente para reducir la citotoxicidad de la toxina mutante a un valor de CE_{50} de al menos aproximadamente 1.000 μ g/ml en una célula humana adecuada. En un aspecto, el tiempo de reacción no excede de aproximadamente 168 horas (o 7 días).

Por ejemplo, en un aspecto en el que el agente incluye formaldehído, la toxina mutante preferiblemente se pone en contacto con el agente durante aproximadamente 12 horas, lo que demostró ser un período de tiempo ejemplar que fue suficiente para reducir la citotoxicidad de la toxina mutante de *C. difficile* hasta un valor de CE_{50} de al menos aproximadamente 1.000 μ g/ml en una célula humana adecuada, por ejemplo, células IMR-90, en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* estándar, en comparación con una toxina mutante idéntica en ausencia del agente de entrecruzamiento. En un aspecto más preferido, la reacción se lleva a cabo durante aproximadamente 48 horas, que es al menos aproximadamente tres veces más largo que un período de tiempo suficiente para la reacción. En tal aspecto, el tiempo de reacción preferiblemente no es superior a aproximadamente 72 horas.

En otro aspecto en el que el agente incluye EDC, la toxina mutante preferiblemente se pone en contacto con el agente durante aproximadamente 0,5 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 hora, o lo más preferiblemente aproximadamente 2 horas. En un aspecto, la toxina mutante se pone en contacto con EDC durante como máximo aproximadamente 5 horas, preferiblemente como máximo aproximadamente 3 horas, más preferiblemente como máximo aproximadamente 2 horas. En tal aspecto, el tiempo de reacción preferiblemente no es superior a aproximadamente 6 horas.

El pH ejemplar al que la toxina mutante se pone en contacto con el agente de entrecruzamiento químico incluye un mínimo de aproximadamente pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 o 7,5, y un máximo de aproximadamente pH 8,5, 8,0, 7,5, 7,0 o 6,5. Cualquier valor mínimo puede combinarse con cualquier valor máximo para definir un intervalo de pH adecuado. Preferiblemente, la reacción se produce a un pH de 6,5 a 7,5, preferiblemente a un pH de 7,0.

Las temperaturas ejemplares a las que la toxina mutante se pone en contacto con el agente de entrecruzamiento químico incluyen un mínimo de aproximadamente 2 °C, 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C o 37 °C, y una temperatura máxima de aproximadamente 40 °C, 37 °C, 30 °C, 27 °C, 25 °C o 20 °C. Cualquier valor mínimo puede combinarse con cualquier valor máximo para definir un intervalo de temperatura de reacción adecuada. Preferiblemente, la reacción ocurre a aproximadamente 20 °C a 30 °C, lo más preferiblemente a aproximadamente 25 °C.

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

En otro aspecto, las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente pueden incluir ambas toxinas mutantes de *C. difficile* (A y B). Cualquier combinación de toxina A mutante de *C. difficile* y toxina B mutante de *C. difficile* descrita puede combinarse para obtener una composición inmunogénica. Por consiguiente, las composiciones

inmunogénicas se pueden combinar en un solo vial (por ejemplo, un solo vial que contiene tanto una composición que incluye TcdA mutante de *C. difficile* como una composición que incluye TcdB mutante de *C. difficile*). Preferiblemente, las composiciones inmunogénicas incluyen una TcdA mutante de *C. difficile* y una TcdB mutante de *C. difficile*.

Por ejemplo, en un aspecto, la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6, en la que al menos un aminoácido de cada SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 está químicamente entrecruzado. En otro aspecto, la composición inmunogénica incluye una toxina A mutante de *C. difficile*, que incluye la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, y una toxina B mutante de *C. difficile*, que comprende la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8, en la que al menos un aminoácido de cada una de las toxinas mutantes de *C. difficile* está químicamente entrecruzado.

En otro aspecto, la composición inmunogénica incluye cualquier secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 83, y cualquier secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 85. En otro aspecto, la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 84 y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86. En otro aspecto, la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 83 y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 85. En otro aspecto, la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 85.

En otro aspecto, la composición inmunogénica incluye un polipéptido que tiene cualquier secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 761, y un segundo polipéptido que tiene cualquier secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 761.

Se entiende que cualquiera de las composiciones de la invención, por ejemplo, composiciones inmunogénicas que incluyen una toxina A mutante y/o una toxina B mutante, se pueden combinar en diferentes proporciones o cantidades para obtener un efecto terapéutico. Por ejemplo, la TcdA mutante de *C. difficile* y TcdB de *C. difficile* mutante pueden estar presentes en una composición inmunogénica en una proporción en el intervalo de 0,1:10 a 10:0,1, A:B. En otro aspecto, por ejemplo, la TcdB mutante de *C. difficile* y la TcdA mutante de *C. difficile* pueden estar presentes en una composición inmunogénica en una proporción en el intervalo de 0,1:10 a 10:0,1, B:A. En un aspecto preferido, la proporción es tal que la composición incluye una mayor cantidad total de TcdB mutante que la cantidad total de TcdA mutante.

En un aspecto, una composición inmunogénica es capaz de unirse a un anticuerpo neutralizante o un fragmento de unión del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo neutralizante o fragmento de unión del mismo es uno de los descritos a continuación en el presente documento. En un aspecto ejemplar, una composición inmunogénica es capaz de unirse a un anticuerpo antitoxina A o fragmento de unión del mismo, en la que el anticuerpo antitoxina A o fragmento de unión del mismo incluye una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir una TcdA mutante de *C. difficile*, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 7. Como otro ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir la SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 83.

En otro aspecto ejemplar, una composición inmunogénica es capaz de unirse a un anticuerpo antitoxina B o fragmento de unión del mismo, en la que el anticuerpo antitoxina B o fragmento de unión del mismo incluye una cadena ligera variable de B8-26 y una cadena pesada variable de B8-26. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir una TcdB mutante de *C. difficile*, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8. Como otro ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 85.

Célula recombinante

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

En otro aspecto, la célula recombinante o su progenie incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, cuando se alinea de manera óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de espacio predeterminadas. En un aspecto, la célula recombinante o su progenie incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 761.

En otro aspecto, la célula recombinante o su progenie incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con cualquiera de la SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 83, o SEQ ID NO: 85, cuando

se alinea de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de espacio predeterminadas.

En un aspecto adicional, la célula recombinante o su progenie incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% de identidad con cualquiera de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, o SEQ ID NO: 47, cuando se alinea de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de espacios predeterminados. La célula recombinante puede derivar de cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente divulgación, por ejemplo, una procariota o eucariota. Preferiblemente, la célula recombinante se deriva de cualquier célula que sea adecuada para expresar secuencias de ácido nucleico heterólogas mayores de aproximadamente 5.000, 6.000, preferiblemente aproximadamente 7.000 y más preferiblemente aproximadamente 8.000 nucleótidos o más. La célula huésped procariota puede ser cualquier bacteria Gram negativa o Gram positiva. En aspectos ejemplares, la célula huésped procariota carece de un polinucleótido endógeno que codifique una toxina y/o una espora.

Las bacterias Gram negativas incluyen, pero no se limitan a, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*. Por ejemplo, la célula recombinante puede derivarse de una célula de *Pseudomonas fluorescens*, como se describe en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2010013762, párrafos [0201] - [0230].

Las bacterias Gram positivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula se deriva de una célula de *C. difficile*.

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

Por consiguiente, en un aspecto, la célula de *C. difficile* recombinante se deriva de una cepa descrita en el presente documento. Preferiblemente, la célula de *C. difficile* recombinante o su progenie se deriva del grupo que consiste en *C. difficile* 1351, *C. difficile* 5036 y *C. difficile* VPI 11186. Más preferiblemente, la célula de *C. difficile* recombinante o su progenie se deriva de una célula de *C. difficile* VPI 11186.

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

Los ejemplos de genes de esporulación para la inactivación dirigida incluyen, entre otros, *spo0A*, *spolIE*, σ^E , σ^G y σ^K . Preferiblemente, el gen *spo0A* está inactivado.

Se conocen en la técnica procedimientos para inactivar un gen de esporulación de *C. difficile*. Por ejemplo, un gen de esporulación puede inactivarse mediante la inserción dirigida de un marcador seleccionable, tal como un marcador de resistencia a antibióticos. Véase, por ejemplo, Heap et al., J. Microbiol. Methods. Enero de 2010; 80 (1): 49-55; Heap et al., J. Microbiol. Methods, septiembre de 2007; 70 (3): 452-464; y Underwood et al., J. Bacteriol. Diciembre de 2009; 191 (23): 7296-305. Véase también, por ejemplo, Minton et al., WO2007/148091, titulado "DNA Molecules and Methods", o la publicación estadounidense correspondiente US 20110124109 A1, párrafos [00137] - [0227].

Composiciones relacionadas con el cultivo de una célula de *C. difficile*

La invención se refiere además a composiciones y procedimientos para usar en el cultivo de *C. difficile* y producir toxinas de *C. difficile*. En un aspecto, la divulgación se refiere a un medio de cultivo que comprende una fuente de nitrógeno y una célula de *C. difficile*.

Las fuentes de nitrógeno del medio de cultivo adecuadas incluyen: HY-SOY (Quest), AMI-SOY (Quest), NZ-SOY (Quest), NZ-SOY BL4 (Quest), NZ-SOY BL7 (Quest), SHEFTONE D (Sheffield), SE50M (DMV), SE50 (DMV), SE% (DMV), PEPTONA DE SOJA (Gibco), BACTO-SOYTON (Difco), NUTRISOY 2207 (ADM), BAKES NUTRISOY (ADM), NUTRISOY FLOUR, Harina de soja, EXTRACTO DE BACTO-LEVADURA (Difco), EXTRACTO DE LEVADURA (Gibco), extracto de levadura HY-YEST 412 (Quest), extracto de levadura HY-YEST 441 (Quest),

extracto de levadura HY-YEST 444 (Quest), extracto de levadura HY-YEST 455 (Quest), EXTRACTO DE BACTO-MALTA (Difco), Corn Steep y PROFLO (Traders).

En un aspecto, la divulgación se refiere a un medio de cultivo que incluye un hidrolizado vegetal y una célula de *C. difficile*. Puede ser adecuado cualquier hidrolizado vegetal. Ejemplos de hidrolizados vegetales adecuados son hidrolizado de semilla de algodón, hidrolizado de guisante e hidrolizado de soja.

En una realización preferida, el hidrolizado vegetal es hidrolizado de soja. Preferiblemente, el hidrolizado de soja es SE50MK (Friesland-Campaigna). Otros ejemplos de productos de soja que pueden usarse en la invención, y sus fuentes, incluyen: Tekniscience: Peptona de soja A1, Peptona de soja A2, Peptona de soja A3, Peptona de planta E1, Peptona de planta ET1 y Peptona de trigo E1; Quest: HY-Soy, HY-Soy T, AMI-Soy, NZ-Soy, NZ-Soy BLA y NZ-Soy BL7; DMV: SE50M, SE70M, SE50MK, SE50MK-NK (Friesland-Campaigna), WGE80BT, WGE80M, CNE50M y SE70BT; Marcor: peptona de soja tipo AB, peptona de soja tipo AC, peptona de soja tipo SL, peptona de soja tipo II y peptona de soja tipo F; Oxoid: Peptona Vegetal y Peptona Vegetal No. 1; Gibco: peptona de soja; y Difco: Bacsoytone.

Las concentraciones del hidrolizado vegetal en el medio de cultivo pueden variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40 o 50 g/l hasta un valor máximo de 200, 150, 100 o 75 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de hidrolizado vegetal en el medio de cultivo está entre 10-50 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 30 g/l. La concentración de hidrolizado vegetal en el medio de cultivo descrito en este documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un medio de cultivo que incluye un extracto de levadura (por ejemplo, como fuente de nitrógeno) y una célula de *Clostridium difficile*. Lo más preferiblemente, el extracto de levadura es HY YEST 412 (Kerry Biosciences).

Las concentraciones del extracto de levadura en el medio de cultivo pueden variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40 o 50 g/l hasta un valor máximo de 200, 150, 100 o 75 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo está entre 10-50 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 20 g/l. La concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo descrito en este documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

Los inventores descubrieron que el crecimiento de *C. difficile* se puede soportar en un medio de cultivo que incluye un hidrolizado vegetal sin extracto de levadura y en un medio de cultivo que incluye extracto de levadura sin un hidrolizado vegetal. Sin embargo, se ha observado que el cultivo de células y/o la producción de toxina resultante de un medio de cultivo que incluye tanto un hidrolizado vegetal como un extracto de levadura es mayor que los rendimientos resultantes de un medio de cultivo que incluye un hidrolizado vegetal en ausencia de extracto levadura, y mayor que los rendimientos resultantes de un medio de cultivo que incluye extracto de levadura en ausencia de un hidrolizado vegetal.

Por consiguiente, los inventores descubrieron que una combinación de un hidrolizado vegetal y un extracto de levadura ayuda a mantener el crecimiento máximo de *C. difficile* y/o la producción de toxina. En un aspecto, la divulgación se refiere a un medio de cultivo que incluye un hidrolizado vegetal, extracto de levadura y una célula de *C. difficile*. El hidrolizado vegetal puede ser cualquier hidrolizado vegetal adecuado conocido en la técnica como se describió anteriormente. Preferiblemente, el hidrolizado es hidrolizado de soja. Más preferiblemente, el hidrolizado de soja es SE50MK (Friesland-Campaigna). En una realización preferida, el extracto de levadura es HY YEST 412.

En una divulgación, el medio no incluye una fuente de carbono. Los inventores observaron que el medio de cultivo que incluye hidrolizado de soja/extracto de levadura en ausencia de una fuente de carbono alcanza valores de DO₆₀₀ de 2-3 y rendimientos de producción de toxinas de 10-15 mg/l.

Sin embargo, se observó sorprendentemente que un medio de cultivo que incluye una fuente de carbono aumenta el cultivo de células de *C. difficile* y la producción de toxina, en comparación con un medio en ausencia de una fuente de carbono. Además, los inventores descubrieron sorprendentemente que la producción de la toxina mutante no se inhibía marcadamente cultivando la célula de *C. difficile* en condiciones anaeróbicas que incluían una fuente de carbono en presencia de un medio que incluía hidrolizado de soja. Por consiguiente, en una realización preferida, el medio incluye además una fuente de carbono. Más preferiblemente, en una realización, el medio de cultivo incluye una fuente de carbono, en la que el medio incluye además una célula de *C. difficile* recombinante. Incluso más preferiblemente, la célula de *C. difficile* recombinante incluye un promotor constitutivo. En una realización preferida, el promotor es un promotor de ferredoxina (fdx) de *Clostridium sporogenes*. En otra realización preferida, la célula de *C. difficile* recombinante no incluye un promotor cromosómico regulado que pueda regularse negativamente, por ejemplo, por represión de glucosa. En una realización más preferida, la célula de *C. difficile* es una célula recombinante o su progenie como se describió anteriormente. Puede usarse cualquier fuente de carbono en el medio de cultivo. Las fuentes de carbono adecuadas incluyen glucosa, dextrosa, manitol, fructosa y/o manosa.

Preferiblemente, la fuente de carbono en el medio de cultivo es glucosa. En una realización preferida, el medio de cultivo no incluye arabinosa, xilosa, sacarosa, lactosa, maltosa, glicerol, ramnosa y/o galactosa.

Las concentraciones de una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa, manitol, fructosa y/o manosa) en el medio de cultivo pueden oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 g/l hasta un valor máximo de 150, 100, 90, 80, 75, 70, 50, 40 o 30 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de una fuente de carbono en el medio de cultivo está entre 5-70 g/l. En una realización, la concentración de una fuente de carbono en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 g/l. En otra realización, la concentración de una fuente de carbono en el medio de cultivo es superior a 10 g/l. En otra realización, la concentración de una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa) en el medio de cultivo es de 45 a 75 g/l, preferiblemente de 55 a 65 g/l, más preferiblemente de 55 a 65 g/l. En otra realización, la concentración de una fuente de carbono en el medio de cultivo es de aproximadamente 60 g/l. La concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo descrito en el presente documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

En una realización, el medio de cultivo incluye además un derivado de cloranfenicol. Los derivados de cloranfenicol ejemplares incluyen cualquiera de tiamfenicol, florfenicol, succinato de cloranfenicol y fluoranfenicol. Preferiblemente, el medio de cultivo incluye tiamfenicol. Sin estar ligado a ningún mecanismo o teoría, se cree que el derivado de cloranfenicol ayuda a prevenir la pérdida de plásmido durante la fermentación y a aumentar la producción de células y/o toxina, en comparación con un medio de cultivo en ausencia de un derivado de cloranfenicol.

Las concentraciones de un derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo pueden variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 15, 20 o 30 mg/l hasta un valor máximo de 100, 75, 50 o 40 mg/l. En otra realización, la concentración de derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo puede oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l, 2 g/l, 2,5 g/l, 3 g/l, 3,5 g/l, 4 g/l, 4,5 g/l o 5 g/l hasta un valor máximo de 10 g/l, 9,5 g/l, 9 g/l, 8,5 g/l, 8 g/l, 7,5 g/l, 7 g/l, 6,5 g/l, 6 g/l, 5,5 g/l, o 5 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de un derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo está entre 5-20 mg/l, lo más preferiblemente alrededor de 15 mg/l. En otra realización preferida, la concentración de un derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo está entre 1 g/l-10 g/l, preferiblemente entre 1 g/l - 5 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 3 g/l. La concentración de derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo descrito en este documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

En una realización, el medio de cultivo incluye además un protector celular, tal como polietilenglicol, un alcohol polivinílico o un poliol plurónico. En una realización, el medio de cultivo incluye polietilenglicol, tal como polietilenglicol 2000 (PPG 2000).

Las concentraciones de un protector celular, tal como polietilenglicol, en el medio de cultivo pueden oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 o 1 ml/l hasta un valor máximo de 2, 1, 0,90, 0,80, 0,70, 0,60, 0,50, 0,40, 0,30, 0,20 ml/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de un protector celular, tal como polietilenglicol en el medio de cultivo, está entre 0,01 ml/l y 0,50, lo más preferiblemente alrededor de 0,25 ml/l. La concentración de protector celular en el medio de cultivo descrito en este documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

En una realización preferida, el medio de cultivo incluye un hidrolizado vegetal, extracto de levadura y una fuente de carbono, en el que el hidrolizado vegetal es hidrolizado de soja, en el que el extracto de levadura es HY YEST 412 (Kerry Biosciences) y en el que la fuente de carbono es glucosa, manitol, fructosa y/o manosa. En una realización más preferida, el medio de cultivo incluye hidrolizado de soja SE50MK, extracto de levadura HY YEST 412, glucosa y tiamfenicol, a pH 7.

En una realización preferida, el medio de cultivo incluye 30 g/l de hidrolizado de soja SE50MK, 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, 10 g/l de glucosa y 15 mg/l de tiamfenicol, a pH 7. En una realización preferida, el medio de cultivo incluye aproximadamente 30 g/l de hidrolizado de soja SE50MK, aproximadamente 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, aproximadamente 10 g/l de glucosa y aproximadamente 15 mg/l de tiamfenicol, a pH 7. El medio de cultivo puede además incluir aproximadamente 0,25 ml/l de PPG 2000. En otra realización, el medio de cultivo puede incluir además dextrosa.

En otra realización preferida, el medio de cultivo incluye 30 g/l de hidrolizado de soja SE50MK, 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, 60 g/l de glucosa y 15 mg/l de tiamfenicol, a pH 7. En otra realización preferida, el medio de cultivo incluye aproximadamente 30 g/l de hidrolizado de soja SE50MK, aproximadamente 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, aproximadamente 60 g/l de glucosa y aproximadamente 15 mg/l de tiamfenicol, a pH 7. El medio de cultivo puede además incluir aproximadamente 0,25 ml/l de PPG 2000. En otra realización, el medio de cultivo puede incluir además dextrosa.

En una realización, el medio de cultivo incluye además polipropilenglicol 2000 (PPG 2000). El medio de cultivo puede incluir aproximadamente 0,05 ml de PPG 2000 a aproximadamente 1 ml de medio PPG 2000/l, preferiblemente el medio de cultivo incluye aproximadamente 0,25 ml/l de PPG 2000/l de medio.

El medio de cultivo descrito en el presente documento puede ser adecuado para cultivar cualquier célula de *C. difficile*. En una realización, la célula no está modificada genéticamente. En otra realización, la célula está modificada genéticamente, tal como una célula recombinante o progenie de la misma, como se describió anteriormente. En una realización, la célula de *C. difficile* carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina. En una realización preferida, la célula de *C. difficile* se deriva de VPI 11186.

En otra realización, la célula incluye un promotor constitutivo. En una realización preferida, el promotor es un promotor de ferredoxina (*fdx*) de *Clostridium sporogenes*. En otra realización preferida, la célula no incluye un promotor cromosómico regulado que pueda regularse negativamente, por ejemplo, mediante represión de glucosa. En una realización más preferida, la célula de *C. difficile* es una célula recombinante o una progenie de la misma como se describió anteriormente.

Los inventores también descubrieron que un medio de anticuerpo monoclonal soporta el crecimiento de *C. difficile*. Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un medio de cultivo que incluye un medio de anticuerpo monoclonal. En una realización, el medio es medio SFM4Mab^{MR} (Thermo Scientific). Se demostró que el medio producía valores de DO₆₀₀ de aproximadamente 10 y el rendimiento de producción de toxina era de aproximadamente 40 mg/l.

En una realización, el pH del medio de cultivo puede oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0 hasta un valor máximo de 8,0, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2 o 7,1. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, el pH del medio de cultivo está entre 6,0 y 8,0, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. Lo más preferiblemente, el pH es 7,0.

Se conocen en la técnica titulantes de pH adecuados, que incluyen, por ejemplo, NH₄OH, Na₂CO₃ y NaOH. Preferiblemente, el titulante de pH es NaOH.

El medio de cultivo puede incluir ingredientes que contienen fosfato tales como Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Sin embargo, en una realización preferida, el medio de cultivo no incluye un ingrediente que contenga fosfato.

Procedimientos relacionados con el cultivo de una célula de *C. difficile*

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de cultivo de *C. difficile*. El procedimiento incluye cultivar una célula de *C. difficile* en un medio como se describió anteriormente.

En una realización, el crecimiento de *C. difficile* de acuerdo con los procedimientos de la invención procede en al menos dos fases: crecimiento de la semilla y fermentación. En primer lugar, se hace crecer un cultivo de semillas mediante la inoculación de un cultivo madre, por ejemplo, un banco de células de trabajo. La semilla se utiliza para inocular un segundo cultivo de semillas o para inocular un cultivo de fermentación relativamente grande. Como se entiende en la técnica, el número de cultivos de semillas usados puede depender, por ejemplo, del tamaño y volumen de la etapa de fermentación.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de cultivo de *C. difficile*. El procedimiento incluye cultivar una célula de *C. difficile* en un primer medio de cultivo en condiciones que faciliten el crecimiento de la célula; inocular un segundo medio de cultivo con todo o una parte de dicho primer medio después de dicho primer cultivo; cultivar dicho segundo medio inoculado en condiciones que faciliten el crecimiento de la célula. El procedimiento puede incluir además aislar una toxina de *C. difficile* de dicho segundo medio. En una realización, *C. difficile* se hace crecer en un primer medio de cultivo denominado cultivo de semillas. En una realización, el cultivo de semillas incluye un medio de cultivo como se describió anteriormente y una inoculación de un cultivo madre que se hizo crecer en el medio.

La fase (o fases) de crecimiento de la semilla se lleva a cabo generalmente para escalar la cantidad del microorganismo de un cultivo almacenado, de modo que pueda usarse como inoculante para la fase de fermentación. La fase de crecimiento de la semilla también se puede llevar a cabo para permitir que los microbios relativamente inactivos de los cultivos almacenados se rejuvenezcan y se conviertan en cultivos de crecimiento activo.

El volumen y la cantidad de células viables usados para inocular el cultivo de fermentación se pueden controlar con mayor precisión si se toman de un cultivo en crecimiento activo (por ejemplo, un cultivo de semillas), en lugar de si se toman de un cultivo almacenado.

Además, se pueden usar más de una (por ejemplo, dos o tres) fases de crecimiento de semillas para aumentar la cantidad de *C. difficile* para la inoculación del medio de fermentación. Alternativamente, el crecimiento de *C. difficile* en la fase de fermentación puede proceder directamente del cultivo almacenado mediante inoculación directa, si se desea.

El primer medio de cultivo incluye un medio de cultivo como se describió anteriormente. Por ejemplo, en una realización, el primer medio de cultivo incluye un hidrolizado vegetal y una célula de *C. difficile*. Preferiblemente, el hidrolizado vegetal es hidrolizado de soja, lo más preferiblemente hidrolizado de soja SE50MK. En otra realización, el primer medio de cultivo incluye un extracto de levadura y una célula de *C. difficile*. Preferiblemente, el extracto de levadura es HY YEST 412. En una realización adicional, el primer medio de cultivo incluye un hidrolizado vegetal y un extracto de levadura. En otra realización más, el primer medio de cultivo incluye además una fuente de carbono. Preferiblemente, la fuente de carbono es glucosa. En una realización, el medio de cultivo incluye una célula de *C. difficile* recombinante cuando se incluye una fuente de carbono, en la que la célula recombinante incluye un promotor constitutivo. En otra realización, el primer medio de cultivo incluye además un derivado de cloranfenicol. Preferiblemente, el medio de cultivo incluye tiamfenicol.

Las concentraciones del hidrolizado vegetal en el primer medio de cultivo (por ejemplo, medio de cultivo de semillas) pueden variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40 o 50 g/l hasta un valor máximo de 200, 150, 100 o 75 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de hidrolizado vegetal en el medio de cultivo está entre 10-50 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 30 g/l. La concentración de hidrolizado vegetal en el medio de cultivo descrito en el presente documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

Las concentraciones del extracto de levadura en el primer medio de cultivo (por ejemplo, medio de cultivo de semillas) pueden variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40 o 50 g/l hasta un valor máximo de 200, 150, 100 o 75 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo está entre 10-50 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 20 g/l. La concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo descrito en el presente documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

Las concentraciones de una fuente de carbono en el primer medio de cultivo (por ejemplo, medio de cultivo de semillas) pueden variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 1, 5, 10, 15 o 20 g/l hasta un valor máximo de 100, 75, 50, 40 o 30 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de una fuente de carbono en el medio de cultivo está entre 5-20 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 10 g/l.

En una realización, el medio de cultivo incluye además un derivado de cloranfenicol seleccionado del grupo que consiste en tiamfenicol, florfenicol, succinato de cloranfenicol y fluoranfenicol. Preferiblemente, el medio de cultivo incluye tiamfenicol. Las concentraciones de un derivado de cloranfenicol en el primer medio de cultivo (por ejemplo, medio de cultivo de semillas) pueden variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 15, 20 o 30 mg/l hasta un valor máximo de 100, 75, 50 o 40 mg/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de un derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo está entre 5-20 mg/l, lo más preferiblemente alrededor de 15 mg/l.

En una realización, el pH del primer medio de cultivo puede variar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0 hasta un valor máximo de 8,0, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2 o 7,1. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, el pH del primer medio de cultivo está entre 6,0 y 8,0, más preferiblemente, entre 6,5 y 7,5. Lo más preferiblemente, el pH es 7,0.

En una realización preferida, el primer medio de cultivo incluye hidrolizado de soja, extracto de levadura HY YEST 412, glucosa, tiamfenicol, a pH 7. Más preferiblemente, el medio de cultivo incluye 30 g/l de hidrolizado de soja SE50MK, 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, 10 g/l de glucosa, 15 mg/l de tiamfenicol, a pH 7.

Para iniciar la fase de fermentación, se puede usar una porción o la totalidad de un cultivo de semilla que contiene *C. difficile* para inocular el medio de cultivo de fermentación. Los expertos en esta técnica pueden determinar una concentración apropiada de cultivo de semillas para usar para inocular los medios de fermentación y puede oscilar, por ejemplo, entre el 0,1 y el 10%. Como ejemplos específicos, se pueden utilizar concentraciones de 0,5, 1, 5, 5,5, 6, 6,25, 6,5, 7, 8, 9, 10%.

La fermentación se puede utilizar para producir la máxima cantidad de células en un entorno anaeróbico a gran escala. En una realización, *C. difficile* se hace crecer como cultivo de fermentación. En una realización, el cultivo de fermentación se inoculó a partir de un cultivo de semillas que se hizo crecer en el medio.

El segundo medio de cultivo incluye un medio de cultivo como se describió anteriormente. Por ejemplo, en una realización, el segundo medio de cultivo incluye un hidrolizado vegetal y una célula de *C. difficile*. Preferiblemente, el

hidrolizado vegetal es hidrolizado de soja, lo más preferiblemente hidrolizado de soja SE50MK. En otra realización, el segundo medio de cultivo incluye un extracto de levadura y una célula de *C. difficile*. Preferiblemente, el extracto de levadura es HY YEST 412. En una realización adicional, el segundo medio de cultivo incluye un hidrolizado vegetal y un extracto de levadura. En otra realización más, el segundo medio de cultivo incluye además una fuente de carbono. Preferiblemente, la fuente de carbono es glucosa. En una realización, el medio de cultivo incluye una célula de *C. difficile* recombinante cuando se incluye una fuente de carbono, en la que la célula recombinante incluye un promotor constitutivo. En otra realización, el segundo medio de cultivo incluye además un derivado de cloranfenicol. Preferiblemente, el medio de cultivo incluye tiamfenicol.

Las concentraciones del hidrolizado vegetal en el segundo medio de cultivo pueden oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40 o 50 g/l hasta un valor máximo de 200, 150, 100, o 75 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de hidrolizado vegetal en el medio de cultivo está entre 10-50 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 30 g/l. La concentración de hidrolizado vegetal en el medio de cultivo descrito en el presente documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

Las concentraciones del extracto de levadura en el segundo medio de cultivo pueden oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40 o 50 g/l hasta un valor máximo de 200, 150, 100, o 75 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo está entre 10-50 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 20 g/l.

Las concentraciones de una fuente de carbono en el segundo medio de cultivo pueden oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 10, 20, 30, 40, 50 o 60 g/l hasta un valor máximo de 150, 100, 90, 80 o 70 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de una fuente de carbono en el medio de cultivo está entre 50-70 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 60 g/l. En una realización, la concentración de una fuente de carbono en el segundo medio de cultivo es mayor que la concentración de la fuente de carbono en el primer medio de cultivo. La concentración de fuente de carbono en el medio de cultivo descrito en el presente documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

En una realización, el medio de cultivo incluye además un derivado de cloranfenicol seleccionado del grupo que consiste en tiamfenicol, florfenicol, succinato de cloranfenicol y fluoranfenicol. Preferiblemente, el medio de cultivo incluye tiamfenicol. Las concentraciones de un derivado de cloranfenicol en el segundo medio de cultivo pueden oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 5, 10, 15, 20 o 30 mg/l hasta un valor máximo de 100, 75, 50 o 40 mg/l. En otra realización, la concentración de derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo puede oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l, 2 g/l, 2,5 g/l, 3 g/l, 3,5 g/l, 4 g/l, 4,5 g/l o 5 g/l hasta un valor máximo de 10 g/l, 9,5 g/l, 9 g/l, 8,5 g/l, 8 g/l, 7,5 g/l, 7 g/l, 6,5 g/l, 6 g/l, 5,5 g/l, 5 g/l. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de un derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo está entre 5-20 mg/l, lo más preferiblemente alrededor de 15 mg/l. En otra realización preferida, la concentración de un derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo está entre 1 g/l - 10 g/l, preferiblemente entre 1 g/l - 5 g/l, lo más preferiblemente alrededor de 3 g/l. La concentración de derivado de cloranfenicol en el medio de cultivo aquí descrito puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

En una realización, el medio de cultivo incluye además un protector celular, tal como polietilenglicol, un alcohol polivinílico o un poliol plurónico. En una realización, el medio de cultivo incluye polietilenglicol, tal como polietilenglicol 2000 (PPG 2000).

Las concentraciones de un protector celular, como polietilenglicol, en el medio de cultivo pueden oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 o 1 ml/L hasta un valor máximo de 2, 1, 0,90, 0,80, 0,70, 0,60, 0,50, 0,40, 0,30, 0,20 ml/L. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, la concentración de un protector celular, tal como polietilenglicol en el medio de cultivo, está entre 0,01 ml/l y 0,50, lo más preferiblemente alrededor de 0,25 ml/l. La concentración del protector celular en el medio de cultivo descrito en este documento puede basarse en el volumen total del medio de cultivo.

En una realización, el pH del segundo medio de cultivo puede oscilar, por ejemplo, entre un valor mínimo de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0 hasta un valor máximo de 8,0, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2 o 7,1. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, el pH del segundo medio de cultivo está entre 6,0 y 8,0, más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. Lo más preferiblemente, el pH es 7,0.

En una realización preferida, el segundo medio de cultivo incluye hidrolizado de soja, extracto de levadura HY YEST 412, glucosa, tiamfenicol, a pH 7. Más preferiblemente, el medio de cultivo incluye 30 g/l de hidrolizado de soja, 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, 60 g/l de glucosa, 15 mg/l de tiamfenicol, a pH 7.

En una realización, el cultivo se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas. En una realización, las etapas de cultivo de los procedimientos de la invención (tanto semillas como fermentación) se llevan a cabo bajo condiciones anaeróbicas, aunque también se pueden usar condiciones aeróbicas para cualquiera de estas fases.

Los enfoques para el cultivo anaeróbico de bacterias, tales como *C. difficile*, son conocidos en la técnica y pueden emplear, por ejemplo, gas nitrógeno o una mezcla de gases nitrógeno e hidrógeno. El gas se puede burbujear a través del medio (por ejemplo, burbujear) durante la fermentación o pasar a través del área por encima del líquido en una cámara de cultivo (por ejemplo, el espacio de cabeza de la cámara).

El cultivo de la célula de *C. difficile* se puede llevar a cabo en una cámara anaeróbica a aproximadamente $30 \pm 1^\circ\text{C}$, $31 \pm 1^\circ\text{C}$, $32 \pm 1^\circ\text{C}$, $33 \pm 1^\circ\text{C}$, $34 \pm 1^\circ\text{C}$, $35 \pm 1^\circ\text{C}$, $36 \pm 1^\circ\text{C}$, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, $38 \pm 1^\circ\text{C}$ o $39 \pm 1^\circ\text{C}$, preferiblemente alrededor de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. El cultivo se puede llevar a cabo para tiempos que varían, por ejemplo, entre un valor mínimo de 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas hasta un valor máximo de 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 48 horas o 36 horas o 24 horas. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En una realización preferida, el cultivo de la célula ocurre durante 11 a 48 horas, lo más preferiblemente alrededor de 24 horas. En otra realización, el cultivo de la célula ocurre durante 5 a 25 horas, 10 a 20 horas, preferiblemente alrededor de 15 horas. El crecimiento se puede controlar midiendo la densidad óptica (DO) del medio.

En una realización, el procedimiento incluye además aislar toxinas de *C. difficile* de dicho medio. Las toxinas de *C. difficile* pueden aislarse y/o purificarse a partir de cultivos usando procedimientos conocidos de purificación de proteínas. A continuación, las toxinas purificadas pueden, por ejemplo, inactivarse mediante un tratamiento de inactivación química.

En un aspecto alternativo, la invención se refiere a un procedimiento de cultivo de *C. difficile*. El procedimiento incluye cultivar una célula de *C. difficile* en un medio de anticuerpo monoclonal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de una toxina de *C. difficile*. El procedimiento incluye cultivar una bacteria de *C. difficile* en un medio, como se describió anteriormente, en condiciones que permitan la producción de la toxina. El procedimiento incluye además aislar la toxina de *C. difficile* del medio.

En una realización, el procedimiento incluye cultivar una célula de *C. difficile* en un primer medio en condiciones que facilitan el crecimiento de *C. difficile*; inocular un segundo medio con todo o una parte de dicho primer medio después de dicho cultivo; cultivar dicho segundo medio inoculado en condiciones que faciliten el crecimiento de *C. difficile* y la producción de toxinas; y aislar una toxina de *C. difficile* de dicho segundo medio. En una realización, el cultivo del primer o segundo medio que incluye *C. difficile* se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas.

En una realización, la célula de *C. difficile* se cultiva en un sistema de cultivo continuo. En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento de cultivo de *C. difficile* en un cultivo de perfusión. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que una célula de *C. difficile* recombinante que expresa una toxina mutante puede cultivarse con éxito en un cultivo continuo anaeróbico y en un cultivo de perfusión anaeróbico. Una ventaja de un sistema continuo y/o un sistema de perfusión es que se pueden añadir medios nuevos de forma continua. Además, los subproductos de toxinas de la producción pueden eliminarse durante la producción mientras se mantiene la viabilidad celular en el sistema.

El sistema de cultivo continuo puede incluir proporcionar medio fresco a las células mientras se eliminan simultáneamente el medio gastado y las células del biorreactor. El cultivo continuo puede incluir un cultivo de perfusión, en el que la salida de líquido contiene medio de cultivo que está sustancialmente libre de células o incluye una concentración de células sustancialmente más baja que la del biorreactor. En un cultivo de perfusión, las células se pueden retener mediante, por ejemplo, filtración, filtración ultrasónica, centrifugación o sedimentación.

En una realización, el medio gastado se elimina y se filtra, lo que evita que las células se eliminen del biorreactor. El filtro puede ser un filtro de flujo cruzado y/o un filtro de flujo tangencial. En una realización, dicho sistema de filtración comprende un filtro de fibra hueca. En otra realización, se evita que las células se retiren del biorreactor mediante una etapa de centrifugación. En otra realización, se evita que las células se retiren del biorreactor mediante una etapa de filtración ultrasónica. En otra realización, se evita que las células se eliminen del biorreactor mediante un sistema de sedimentación. En otra realización, dicho sistema de filtración comprende un casete de hoja plana.

En otra realización más, el sistema de perfusión comprende un filtro de fibra hueca que retendrá las células, pero no el producto deseado. Las células se reciclan de nuevo al biorreactor y el medio gastado que contiene el producto deseado se pasa a través de un filtro de corte de peso molecular deseado. El filtro retendrá el producto deseado. Los productos de desecho no retenidos por el filtro pueden eliminarse o reciclarse.

Procedimiento de producción de una toxina mutante de *C. difficile*

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una toxina mutante de *C. difficile*. En una realización, el procedimiento incluye cultivar cualquier célula recombinante o progenie de la misma descrita anteriormente, en condiciones adecuadas para expresar un polipéptido. El procedimiento incluye además una etapa de aislar la toxina del medio.

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

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

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una toxina mutante de *C. difficile*. El procedimiento incluye las etapas de: (a) poner en contacto una célula de *C. difficile* con una célula de *Escherichia coli* recombinante, en el que la célula de *C. difficile* carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina de *C. difficile* y la célula de *E. coli* incluye un polinucleótido que codifica una toxina mutante de *C. difficile*; (b) cultivar la célula de *C. difficile* y la célula de *E. coli* en condiciones adecuadas para la transferencia del polinucleótido desde la célula de *E. coli* a la célula de *C. difficile*; (c) seleccionar la célula de *C. difficile* que comprende el polinucleótido que codifica la toxina mutante de *C. difficile*; (d) cultivar la célula de *C. difficile* de la etapa (c) en condiciones adecuadas para expresar el polinucleótido; y (e) aislar la toxina mutante de *C. difficile*.

En el procedimiento de la invención, la célula de *E. coli* recombinante incluye un polinucleótido heterólogo que codifica la toxina mutante de *C. difficile*, descrita en el presente documento. El polinucleótido puede ser ADN o ARN. En una realización ejemplar, el polinucleótido que codifica la toxina mutante de *C. difficile* tiene un codón optimizado para el uso del codón de *E. coli*. Los procedimientos para optimizar codones de un polinucleótido se conocen en la técnica.

En una realización, el polinucleótido incluye una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a un polinucleótido que codifica una TcdA mutante de *C. difficile*, como se describió anteriormente. En una realización, el polinucleótido incluye una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene cualquier secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 761. Un polinucleótido ejemplar que codifica una toxina A mutante de *C. difficile* incluye la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45.

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

En una realización, la célula de *E. coli* que incluye el polinucleótido heterólogo es una célula de *E. coli* que aloja de forma estable el polinucleótido heterólogo, que codifica la toxina mutante de *C. difficile*. Las células de *E. coli* ejemplares incluyen una célula seleccionada del grupo que consiste en células competentes de *E. coli* MAX Efficiency® Stbl2^{MR} (Invitrogen, Carlsbad, CA), *E. coli* químicamente competente One Shot® Stbl3^{MR} (Invitrogen, Carlsbad, CA), células competentes *E. coli* ElectroMAX^{MR} Stbl4^{MR} (Invitrogen) y *E. coli* CA434. En una realización preferida, la célula huésped de clonación de *E. coli* no es DH5α. Más preferiblemente, la célula huésped de clonación de *E. coli* es una célula competente de *E. coli* MAX Efficiency® Stbl2^{MR}.

El procedimiento de la invención incluye además una etapa de cultivo de la célula de *C. difficile* y la célula de *E. coli* en condiciones adecuadas para la transferencia del polinucleótido de la célula de *E. coli* a la célula de *C. difficile*, dando como resultado una célula de *C. difficile* recombinante. En una realización preferida, las condiciones de cultivo son adecuadas para la transferencia del polinucleótido desde la célula de *E. coli* (la célula donante) a la célula de *C. difficile* (la célula receptora) y dando como resultado una herencia genéticamente estable.

Lo más preferiblemente, las condiciones de cultivo son adecuadas para la conjugación bacteriana, que son conocidas en la técnica. "Conjugación" se refiere a un proceso particular de transferencia de un polinucleótido en el que se produce una transferencia unidireccional de un polinucleótido (por ejemplo, de un plásmido bacteriano) de

una célula bacteriana (es decir, el "donante") a otra (es decir, el "receptor"). El proceso de conjugación implica el contacto entre la célula donante y la célula receptora. Preferiblemente, la célula de *E. coli* donante es una célula de *E. coli* CA434.

Las condiciones adecuadas (de conjugación) ejemplares para la transferencia del polinucleótido de la célula de *E. coli* a la célula de *C. difficile* incluyen cultivos líquidos en crecimiento de *C. difficile* en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI; Oxoid) o caldo anaeróbico de Schaedlers (SAB; Oxoid). En otra realización, los cultivos sólidos de *C. difficile* se pueden hacer crecer en agar sangre fresca (FBA) o agar BHI. Preferiblemente, *C. difficile* se cultiva a 37 °C en un entorno anaeróbico (por ejemplo, 80% de N₂, 10% de CO₂ y 10% de H₂ [vol/vol]). En una realización, la condición adecuada incluye cultivar *E. coli* aeróbicamente en caldo Luria-Bertani (LB) o en agar LB a 37 °C. Para la transferencia conjugativa a *C. difficile*, una condición adecuada ejemplar incluye cultivar *E. coli* anaeróbicamente en FBA. Se pueden incluir antibióticos en los medios líquidos y sólidos como se conoce en la técnica. Los ejemplos de tales antibióticos incluyen cicloserina (250 µg/ml), cefoxitina (8 µg/ml), cloranfenicol (12,5 µg/ml), tiamfenicol (15 µg/ml) y eritromicina (5 µg/ml).

El procedimiento de la invención incluye adicionalmente una etapa de selección de la célula de *C. difficile* recombinante resultante que incluye el polinucleótido que codifica la toxina mutante de *C. difficile*. En una realización ejemplar, la célula de *C. difficile* recombinante es un receptor del polinucleótido que codifica la toxina mutante de *C. difficile* de la célula de *E. coli* recombinante mediante conjugación.

El procedimiento de la invención incluye una etapa de cultivo de la célula recombinante o su progenie en condiciones adecuadas para expresar el polinucleótido que codifica la toxina mutante de *C. difficile*, dando como resultado la producción de una toxina mutante de *C. difficile*. Las condiciones adecuadas para que una célula recombinante exprese el polinucleótido incluyen condiciones de cultivo adecuadas para hacer crecer una célula de *C. difficile*, que son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las condiciones adecuadas pueden incluir el cultivo de transformantes de *C. difficile* en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI; Oxoid) o caldo anaeróbico de Schaedlers (SAB; Oxoid). En otra realización, los cultivos sólidos de *C. difficile* se pueden hacer crecer en agar FBA o BHI. Preferiblemente, *C. difficile* se cultiva a 37 °C en un entorno anaeróbico (por ejemplo, 80% de N₂, 10% de CO₂ y 10% de H₂ [vol/vol]).

En una realización, el procedimiento de la invención incluye una etapa de aislamiento de la toxina mutante de *C. difficile* resultante. Se conocen en la técnica procedimientos para aislar una proteína de *C. difficile*.

En otra realización, el procedimiento incluye una etapa de purificación de la toxina mutante de *C. difficile* resultante. Se conocen en la técnica procedimientos para purificar un polipéptido, tales como cromatografía.

En una realización ejemplar, el procedimiento incluye además una etapa de poner en contacto la toxina de *Clostridium difficile* mutante aislada con un agente de entrecruzamiento químico descrito anteriormente. Preferiblemente, el agente incluye formaldehído, etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida o una combinación de EDC y NHS. Las condiciones de reacción ejemplares se describieron anteriormente y en la sección de Ejemplos a continuación.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina mutante de *C. difficile* descrita en el presente documento, producida mediante cualquier procedimiento, preferiblemente mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

Anticuerpos

Sorprendentemente, las composiciones inmunogénicas de la invención descritas anteriormente provocaron nuevos anticuerpos *in vivo*, lo que sugiere que las composiciones inmunogénicas incluyen una estructura nativa conservada (por ejemplo, un epítipo antigénico conservado) de la respectiva toxina de tipo silvestre de *C. difficile* y que las composiciones inmunogénicas incluyen un epítipo. Los anticuerpos producidos contra una toxina de una cepa de *C. difficile* pueden ser capaces de unirse a una toxina correspondiente producida por otra cepa de *C. difficile*. Es decir, los anticuerpos y los fragmentos de unión de los mismos pueden tener "reactividad cruzada", que se refiere a la capacidad de reaccionar con sitios antigénicos similares en toxinas producidas a partir de múltiples cepas de *C. difficile*. La reactividad cruzada también incluye la capacidad de un anticuerpo para reaccionar o unirse a un antígeno que no estimuló su producción, es decir, la reacción entre un antígeno y un anticuerpo que se generó contra un antígeno diferente pero similar.

En un aspecto, los inventores descubrieron sorprendentemente anticuerpos monoclonales que tienen un efecto neutralizante sobre las toxinas de *C. difficile* y procedimientos para producir los mismos. Los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la citotoxicidad de la toxina de *C. difficile* *in vitro*, inhibir la unión de la toxina de *C. difficile* a células de mamífero y/o pueden neutralizar la enterotoxicidad de la toxina de *C. difficile* *in vivo*. La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los anteriores. Además, la presente divulgación se refiere al uso de cualquiera de las composiciones anteriores para tratar, prevenir, disminuir el riesgo, disminuir la gravedad, disminuir las ocurrencias y/o retrasar el

inicio de una infección por *C. difficile*, enfermedad asociada a *C. difficile*, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de las mismas en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se le administra la composición, así como los procedimientos para preparar dichas composiciones.

5 Los inventores descubrieron además que una combinación de al menos dos de los anticuerpos monoclonales neutralizantes puede exhibir un efecto sinérgico inesperado en la neutralización respectiva de TcdA o TcdB. Los anticuerpos antitoxina o los fragmentos de unión de los mismos pueden ser útiles en la inhibición de una infección por *C. difficile*.

10 Un "anticuerpo" es una proteína que incluye al menos una o dos regiones variables de cadena pesada (H) (abreviadas en el presente documento como VH) y al menos una o dos regiones variables de cadena ligera (L) (abreviadas en el presente documento como VL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de la región marco y las CDR se ha
15 definido con precisión (véase, Kabat, EA, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH No. 91-3242, 1991, y Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987). El término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas de tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas), en las que las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipos kappa o lambda.

20 Las moléculas de anticuerpo pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4). Los anticuerpos pueden ser de varios isotipos, que incluyen: IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE. En un aspecto preferido, el anticuerpo es un isotipo de IgG, por ejemplo, IgG1. En otro aspecto preferido, el anticuerpo es un anticuerpo IgE.

25 En otro aspecto, la molécula de anticuerpo incluye un "fragmento de unión al antígeno" o "fragmento de unión", como se usa en el presente documento, que se refiere a una porción de un anticuerpo que se une específicamente a una toxina de *C. difficile* (por ejemplo, toxina A). El fragmento de unión es, por ejemplo, una molécula en la que una o más cadenas de inmunoglobulina no son de longitud completa, pero que se une específicamente a una toxina.

30 Los ejemplos de porciones de unión englobadas dentro del término "fragmento de unión" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F (ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios
35 VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989), que consta de un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada que tiene un marco suficiente para unirse específicamente, por ejemplo, una porción de unión a antígeno de una región variable.

40 Un fragmento de unión de una región variable de cadena ligera y un fragmento de unión de una región variable de cadena pesada, por ejemplo, los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se incluyen dentro del término "fragmento
45 de unión" de un anticuerpo. Estas porciones de anticuerpos se obtienen usando técnicas conocidas en el arte, y las porciones se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Como se usa en este documento, un anticuerpo que "se une específicamente" o es "específico" para un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es un anticuerpo que se une a ese polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo polipeptídico. Por
50 ejemplo, cuando se hace referencia a una biomolécula (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, anticuerpo, etc.) que "se une específicamente" a una diana, la biomolécula se une a su molécula diana y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas en una población heterogénea de moléculas que incluyen la diana, medida en condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo en el caso de un anticuerpo). La reacción de
55 unión entre el anticuerpo y su diana es determinante de la presencia de la diana en la población heterogénea de moléculas. Por ejemplo, "unión específica" o "que se une específicamente" se refiere a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión del mismo para unirse a una toxina de tipo silvestre y/o mutante de *C. difficile* con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

60 En un aspecto ejemplar, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Puede producirse un anticuerpo quimérico mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en el arte. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal murino (u otra especie) se puede digerir con enzimas de restricción para eliminar la región que codifica el Fc murino, y se sustituye la porción equivalente de un gen que codifica una región constante de Fc humana. También se puede crear un anticuerpo quimérico mediante técnicas de ADN
65 recombinante en las que el ADN que codifica las regiones variables murinas se puede ligar al ADN que codifica las regiones constantes humanas.

En otro aspecto ejemplar, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se humaniza mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez que se obtienen los anticuerpos murinos, una CDR del anticuerpo puede reemplazarse con al menos una porción de una CDR humana. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar reemplazando secuencias de la región variable Fv murina que no están directamente implicadas en la unión de antígenos con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Se conocen en la técnica procedimientos generales para generar anticuerpos humanizados.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia TcdA de *C. difficile* o TcdB de *C. difficile* también pueden producirse mediante técnicas estándar, tales como una técnica de hibridoma (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497). Brevemente, una línea celular inmortal se fusiona con un linfocito de un mamífero inmunizado con TcdA de *C. difficile*, TcdB de *C. difficile* o una toxina mutante de *C. difficile* descrita en este documento, y los sobrenadantes del cultivo de las células de hibridoma resultantes se criban para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a TcdA de *C. difficile*, o TcdB de *C. difficile*. Normalmente, la línea celular inmortal se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la divulgación se detectan seleccionando los sobrenadantes del cultivo de hibridoma en busca de anticuerpos que se unan a TcdA de *C. difficile* o TcdB de *C. difficile* usando un ensayo, tal como ELISA. Los hibridomas humanos se pueden preparar de forma similar.

Como alternativa a la producción de anticuerpos mediante inmunización y selección, los anticuerpos de la divulgación también pueden identificarse mediante el cribado de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante con una TcdA de *C. difficile*, TcdB de *C. difficile* o una toxina mutante de *C. difficile* descrita en el presente documento. La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser una biblioteca de scFv o una biblioteca de Fab, por ejemplo. Además, los anticuerpos de la invención descritos en el presente documento pueden usarse en estudios de unión competitiva para identificar anticuerpos anti-TcdA o anti-TcdB adicionales y fragmentos de unión de los mismos. Por ejemplo, se pueden identificar anticuerpos anti-TcdA o anti-TcdB adicionales y fragmentos de unión de los mismos cribando una biblioteca de anticuerpos humanos e identificando moléculas dentro de la biblioteca que compiten con los anticuerpos de la invención descritos en este documento en un ensayo de unión competitiva.

Además, los anticuerpos abarcados por la presente divulgación incluyen anticuerpos recombinantes que pueden generarse mediante el uso de procedimientos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los procedimientos de presentación en fagos, los fagos pueden usarse para presentar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une a un inmunógeno descrito en el presente documento (por ejemplo, Una toxina mutante de *C. difficile*) puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado.

También dentro del alcance de la divulgación están los anticuerpos y los fragmentos de unión de los mismos en los que se han sustituido, eliminado o añadido aminoácidos específicos. En particular, los anticuerpos preferidos tienen sustituciones de aminoácidos en la región marco, para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, un pequeño número seleccionado de residuos marco aceptores de la cadena de inmunoglobulina se puede reemplazar por los correspondientes aminoácidos donantes. Las ubicaciones preferidas de las sustituciones incluyen residuos de aminoácidos adyacentes a la CDR, o que son capaces de interactuar con una CDR. Los criterios para seleccionar aminoácidos del donante se describen en la patente de los Estados Unidos No. 5.585.089 (por ejemplo, columnas 12-16). El marco aceptor puede ser una secuencia marco de un anticuerpo humano maduro o una secuencia de consenso.

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

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

Los anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos descritos en el presente documento pueden producirse en cualquier mamífero, de tipo silvestre y/o transgénico, incluidos, por ejemplo, ratones, seres humanos, conejos y cabras.

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

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

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

Anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que tienen una cadena pesada variable y regiones de cadena ligera variable que son al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% idénticas a las regiones de cadena pesada y ligera variables de A65-33; A60-22; A80-29 y/o, preferiblemente, A3-25 también pueden unirse a TcdA.

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

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

En otro aspecto más, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye una región de cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 37, y una región de cadena ligera variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 36.

En otro aspecto, anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que tienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadenas pesadas variables y/o cadenas ligeras variables de A65-33; A60-22; A80-29 y/o, preferiblemente, A3-25 también pueden unirse a TcdA. Las CDR de la región de cadena pesada variable de A3-25 se muestran en la Tabla 4, a continuación.

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

Las CDR de la región de cadena ligera variable de A3-25 se muestran en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5: Secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera variable				
Clon	Cadena	CDR	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
A3-25	Ligera	CDR1	RSSQSLIHSNGNTYLH	38
		CDR2	KVSNRFS	39
		CDR3	SQTTYFPYT	40

En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo incluye secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 41 (CDR H1), 42 (CDR H2) y 43 (CDR H3) y/o las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NO: 38 (CDR L1), 39 (CDR L2) y 40 (CDR L3).

5 En un aspecto ejemplar, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico de la toxina A de *C. difficile* se une específicamente a un epítipo dentro de la región del extremo terminal N de TcdA, por ejemplo, un epítipo entre los aminoácidos 1-1.256 de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

10 En un aspecto preferido, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico de la toxina A de *C. difficile* se une específicamente a un epítipo dentro de la región del extremo terminal C de la toxina A, por ejemplo, un epítipo entre los aminoácidos 1.832 a 2.710 de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Los ejemplos incluyen A3-25; A65-33; A60-22; A80-29.

15 En otro aspecto más, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para la toxina A de *C. difficile* se une específicamente a un epítipo dentro de la región de "translocación" de la toxina A de *C. difficile*, por ejemplo, un epítipo que preferiblemente incluye los residuos 956-1.128. de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1, tal como un epítipo entre los aminoácidos 659-1.832 de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

20 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico de TcdB de *C. difficile*. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo puede ser específico para una TcdB de cualquier cepa de *C. difficile* de tipo silvestre, como las descritas anteriormente, por ejemplo, para la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para una composición inmunogénica descrita anteriormente. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8.

25 En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8, en la que al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8 está entrecruzado por formaldehído, EDC, NHS o una combinación de EDC y NHS. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 85.

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

35 Los anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que también pueden unirse a TcdB incluyen aquellos que tienen una cadena pesada variable y regiones de cadena ligera variable que son al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% idénticas a las regiones de cadena pesada y ligera variables de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6, preferiblemente B8-26, B59-3 y/o B9-30.

40 En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye una región de cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable de A3-25 como se establece en la SEQ ID NO: 49.

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

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

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

60 En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye una región de cadena ligera variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región de cadena ligera variable de A3-25 como se establece en la SEQ ID NO: 66.

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

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

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

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

15

Tabla 25-b: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (κ)			
Clon	Región	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Péptido señal	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	56
	Cadena ligera variable	VQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLLY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLIISLEPEDSAMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEEFQ	55
	CDR1	RASKSISKYLA	57
	CDR2	SGSTLQS	58
	CDR3	QQHNEYPLT	59

En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo incluye secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOS: 51 (CDR H1), 52 (CDR H2) y 53 (CDR H3), y/o las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NOS: 57 (CDR L1), 58 (CDR L2) y 59 (CDR L3).

20

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

Tabla 26-a: Secuencias de aminoácidos de cadena pesada variable			
Clon	Región	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Péptido señal	MGWSYIILFLVATATDVHS	61
	Cadena pesada variable	QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKAS GYTFTSYWMH WVKQRPGQGLEWIG VINPSNGRSTYSEKF KTTATVTVDKSSSTAYMQL SILTSEDSAVYYCAR AAYSTSYAMDY WGQGTSVTVSS	60
	CDR1	GYTFTSYWMH	62
	CDR2	VINPSNGRSTYSEKF	63
	CDR3	AAYSTSYAMDY	64
	Región constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	65

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

5

Tabla 26-b: Secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable (κ)			
Clon	Región	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Péptido señal	MKLPVRLVLMFWIPASSSD	67
	Cadena ligera variable	VLMTQSPSLSPVSLGDQASIS C RSSQNIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHFPFT FGTGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEEFQ	66
	CDR1	RSSQNIVHSNGNTYLE	68
	CDR2	KVSNRFS	69
	CDR3	FQGSHFPFT	70

En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo incluye secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 62 (CDR H1), 63 (CDR H2) y 64 (CDR H3), y/o las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera como se muestran en las SEQ ID NOs: 68 (CDR L1), 69 (CDR L2) y 70 (CDR L3).

10

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

Tabla 27-a: Secuencias de aminoácidos de cadena pesada variable			
Clon	Región	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Péptido señal	MGWSCIIILFLVATATGVHS	72
	Cadena pesada variable	QVQLQQPGAELVKPGAPVKLS CKAS GYPFTNYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYY CAS GHYGSIFAY WGQGTTTLTVSS	71
	CDR1	GYPFTNYWMN	73
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	74
	CDR3	GHYGSIFAY	75
	Región constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	76

La secuencia de aminoácidos para la cadena ligera variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (mAb B9-30) se establece en la SEQ ID NO: 77. Véase la Tabla 27-b.

Tabla 27-b: Secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable (κ)			
Clon	Región	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Péptido señal	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	78
	Cadena ligera variable	VQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLIY SGSTLQS GIPS RFGSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAMYCY QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEEFQ	77
	CDR1	RASKSISKYLA	79
	CDR2	SGSTLQS	80
	CDR3	QQHNEYPLT	81

- 5 En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo incluye secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOS: 73 (CDR H1), 74 (CDR H2) y 75 (CDR H3), y/o las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NOS: 79 (CDR L1), 80 (CDR L2) y 81 (CDR L3).
- 10 En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile* de cualquier cepa de *C. difficile*, como las descritas anteriormente, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para una composición inmunogénica descrita anteriormente. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8.
- 15 En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8, en la que al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8 está entrecruzado por formaldehído, EDC, NHS o una combinación de EDC y NHS.
- 20 Anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que tienen una cadena pesada variable y regiones de cadena ligera variable que son al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferiblemente aproximadamente 98%, más preferiblemente aproximadamente 99% o lo más preferiblemente aproximadamente 100% idénticas a las regiones de cadena pesada y ligera variables de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; y/o, preferiblemente, B8-26 también pueden unirse a TcdB.
- 25 En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye una región de cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable de B8-26 (SEQ ID NO: 49).
- 30 En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye una región de cadena ligera variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácido de la región de cadena ligera variable de B8-26 (SEQ ID NO: 55).
- 35 En otro aspecto más, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo incluye una región de cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable de B8-26 (SEQ ID NO: 49), y una región de cadena ligera variable que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región de cadena ligera variable de B8-26 (SEQ ID NO: 55).
- 40 En otro aspecto, anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que tienen CDR de cadenas pesadas variables y/o cadenas ligeras variables de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; y/o, preferiblemente, B8-26 también pueden unirse a TcdB.
- 45 En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo incluye secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena pesada de B8-26, y/o las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de B8-26.

En un aspecto preferido, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico de la toxina B de *C. difficile* se une específicamente a un epítipo dentro de la región del extremo terminal N de la toxina B, por ejemplo, un epítipo entre los aminoácidos 1-1.256 de una TcdB, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos incluyen B2-31; B5-40; B8-26; B70-2; B6-30; y B9-30.

En un aspecto ejemplar, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico de la toxina B de *C. difficile* se une específicamente a un epítipo dentro de la región del extremo terminal C de la toxina B, por ejemplo, un epítipo entre los aminoácidos 1.832 a 2.710 de una TcdB, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto más, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para la toxina B de *C. difficile* se une específicamente a un epítipo dentro de la región de "translocación" de la toxina B de *C. difficile*, por ejemplo, un epítipo que preferiblemente incluye los residuos 956-1.128 de una TcdB, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2, tal como un epítipo entre los aminoácidos 659-1.832 de una TcdB. Los ejemplos incluyen B59-3; B60-2; y B56-6.

Combinaciones de anticuerpos

El anticuerpo antitoxina o fragmento de unión del mismo se puede administrar en combinación con otros anticuerpos antitoxina de *C. difficile* (por ejemplo, otros anticuerpos monoclonales, gammaglobulina policlonal) o un fragmento de unión del mismo. Las combinaciones que pueden usarse incluyen un anticuerpo antitoxina A o un fragmento de unión del mismo y un anticuerpo antitoxina B o un fragmento de unión del mismo.

En otro aspecto, una combinación incluye un anticuerpo antitoxina A o fragmento de unión del mismo y otro anticuerpo antitoxina A o fragmento de unión del mismo. Preferiblemente, la combinación incluye un anticuerpo monoclonal neutralizante antitoxina A o un fragmento de unión del mismo y otro anticuerpo monoclonal neutralizante antitoxina A o un fragmento de unión del mismo. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que tal combinación daba como resultado un efecto sinérgico en la neutralización de la citotoxicidad de la toxina A. Por ejemplo, la combinación incluye una combinación de al menos dos de los siguientes anticuerpos monoclonales neutralizantes antitoxina A: A3-25; A65-33; A60-22; y A80-29. Más preferiblemente, la combinación incluye el anticuerpo A3-25 y al menos uno de los siguientes anticuerpos monoclonales neutralizantes antitoxina A: A65-33; A60-22; y A80-29. Lo más preferiblemente, la combinación incluye los cuatro anticuerpos: A3-25; A65-33; A60-22; y A80-29.

En un aspecto adicional, una combinación incluye un anticuerpo antitoxina B o fragmento de unión del mismo y otro anticuerpo antitoxina B o fragmento de unión del mismo. Preferiblemente, la combinación incluye un anticuerpo monoclonal neutralizante antitoxina B o un fragmento de unión del mismo y otro anticuerpo monoclonal neutralizante antitoxina B o un fragmento de unión del mismo. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que tal combinación daba como resultado un efecto sinérgico en la neutralización de la citotoxicidad de la toxina B. Más preferiblemente, la combinación incluye una combinación de al menos dos de los siguientes anticuerpos monoclonales neutralizantes antitoxina B: B8-26; B9-30 y B59-3. Lo más preferiblemente, la combinación incluye los tres anticuerpos: B8-26; B9-30 y B59-3.

En otro aspecto más, una combinación incluye un anticuerpo antitoxina B o fragmento de unión del mismo y otro anticuerpo antitoxina B o fragmento de unión del mismo. Como se indicó anteriormente, los inventores descubrieron que una combinación de al menos dos de los anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden exhibir un efecto sinérgico inesperado en la neutralización respectiva de la toxina A y la toxina B.

En otro aspecto, los agentes de la divulgación pueden formularse como una mezcla, o unirse química o genéticamente usando técnicas reconocidas en el arte, dando como resultado anticuerpos unidos covalentemente (o fragmentos de anticuerpos unidos covalentemente), que tienen tanto propiedades de unión antitoxina A como anti-B. La formulación combinada puede estar guiada por la determinación de uno o más parámetros tales como la afinidad, la avidez o la eficacia biológica del agente solo o en combinación con otro agente.

Dichas terapias de combinación son preferiblemente aditivas y/o sinérgicas en su actividad terapéutica, por ejemplo, en la inhibición, prevención (por ejemplo, de recaídas) y/o tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con *C. difficile*. La administración de dichas terapias de combinación puede disminuir la dosis del agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo o mezcla de fragmentos de anticuerpos, o anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo entrecruzado o fusionado genéticamente) necesario para lograr el efecto deseado.

Se entiende que cualquiera de las composiciones de la invención, por ejemplo, un anticuerpo antitoxina A y/o antitoxina B o un fragmento de unión del mismo, puede combinarse en diferentes proporciones o cantidades para obtener un efecto terapéutico. Por ejemplo, el anticuerpo antitoxina A y antitoxina B o su respectivo fragmento de unión puede estar presente en una composición en una proporción en el intervalo de 0,1:10 a 10:0,1, A:B. En otro aspecto, el anticuerpo antitoxina A y antitoxina B o su respectivo fragmento de unión puede estar presente en una composición en una proporción en el intervalo de 0,1:10 a 10:0,1, B:A.

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

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

Formulaciones

Las composiciones de la presente divulgación (tales como, por ejemplo, composiciones que incluyen una toxina mutante de *C. difficile*, composiciones inmunogénicas, anticuerpos y/o fragmentos de unión de anticuerpos de las mismas descritas en el presente documento) pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación semisólidas y sólidas, supositorios, formas líquidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, liposomas y/o forma seca, tales como, por ejemplo, forma de polvo liofilizado, forma secada por congelación, forma secada por aspersión y/o forma secada con espuma. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen las composiciones de la invención. En un aspecto ejemplar, la composición está en una forma adecuada para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. En otro aspecto ejemplar, la composición se emulsiona o encapsula en liposomas o micropartículas, tales como polilactida, poliglicólido o copolímero.

En un aspecto preferido, la composición se liofiliza y se reconstituye extemporáneamente antes de su uso.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento (tales como, por ejemplo, composiciones que incluyen una toxina mutante de *C. difficile*, composiciones inmunogénicas, anticuerpos y/o fragmentos de unión de anticuerpos de los mismos descritos en el presente documento), formuladas junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquier disolvente, medio de dispersión, estabilizador, diluyente y/o tampón que sea fisiológicamente adecuado.

Los estabilizadores ejemplares incluyen carbohidratos, tales como sorbitol, manitol, almidón, dextrano, sacarosa, trehalosa, lactosa y/o glucosa; proteínas inertes, tales como albúmina y/o caseína; y/u otras macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como agarosa, SEPHAROSE^{MR} con función látex, agarosa, celulosa, etc.), aminoácidos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Además, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

Preferiblemente, la composición incluye trehalosa. Las cantidades preferidas de trehalosa (% en peso) incluyen desde un mínimo de aproximadamente 1%, 2%, 3% o 4% hasta un máximo de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6% o 5%. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En un aspecto, la composición incluye aproximadamente 3% - 6% de trehalosa, lo más preferiblemente, 4,5% de trehalosa, por ejemplo, por dosis de 0,5 ml.

Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen agua destilada, solución salina, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, glicerol, alcohol (tal como etanol), soluciones de Ringer, solución de dextrosa, soluciones de sal equilibrada de Hanks y/o un excipiente de liofilización.

Los tampones ejemplares incluyen tampones de fosfato (tal como fosfato de potasio, fosfato de sodio); acetato (tal como acetato de sodio); succinato (tal como succinato de sodio); glicina; histidina; tampones de carbonato, Tris (tris(hidroximetil) aminometano) y/o bicarbonato (tal como bicarbonato de amonio). Preferiblemente, la composición incluye tampón tris. Las cantidades preferidas de tampón tris incluyen desde un mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM hasta un 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 u 11 mM. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En un aspecto, la composición incluye tampón tris de aproximadamente 8 mM a 12 mM, lo más preferiblemente tampón tris 10 mM, por ejemplo, por dosis de 0,5 ml.

En otro aspecto preferido, la composición incluye tampón de histidina. Las cantidades preferidas de tampón de histidina incluyen desde un mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM hasta un 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 u 11 mM. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En un aspecto, la composición incluye tampón de histidina de aproximadamente 8 mM a 12 mM, lo más preferiblemente tampón de histidina 10 mM, por ejemplo, por dosis de 0,5 ml.

En otro aspecto preferido más, la composición incluye tampón de fosfato. Las cantidades preferidas de tampón de fosfato incluyen desde un mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM hasta un 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 u 11 mM. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En un aspecto, la composición incluye tampón de fosfato de aproximadamente 8 mM a 12 mM, lo más preferiblemente tampón de fosfato 10 mM, por ejemplo, por dosis de 0,5 ml.

El pH del tampón se elegirá generalmente para estabilizar el material activo de elección, y los expertos en la técnica pueden determinarlo mediante procedimientos conocidos. Preferiblemente, el pH del tampón estará en el intervalo de pH fisiológico. Por lo tanto, los intervalos de pH preferidos son de aproximadamente 3 a aproximadamente 8; más preferiblemente, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0; aún más preferiblemente, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5; y lo más preferiblemente, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un tensioactivo. Cualquier tensioactivo es adecuado, ya sea anfótero, no iónico, catiónico o aniónico. Los tensioactivos ejemplares incluyen los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (por ejemplo, TWEEN®), tales como polisorbato 20 y/o polisorbato 80; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); Triton X 100, o t-octilfenoxipoliétoxietanol; y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán, y combinaciones de los mismos. Los tensioactivos preferidos incluyen polisorbato 80 (monooleato de polioxietilensorbitán).

Las cantidades preferidas de polisorbato 80 (% en peso) incluyen desde un mínimo de aproximadamente 0,001%, 0,005% o 0,01%, hasta un máximo de aproximadamente 0,010%, 0,015%, 0,025% o 1,0%. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En un aspecto, la composición incluye aproximadamente 0,005% - 0,015% de polisorbato 80, más preferiblemente 0,01% de polisorbato 80.

En un aspecto ejemplar, la composición inmunogénica incluye trehalosa y fosfato 80. En otro aspecto ejemplar, la composición inmunogénica incluye tampón tris y polisorbato 80. En otro aspecto ejemplar, la composición inmunogénica incluye tampón de histidina y polisorbato 80. En aún otro aspecto ejemplar, la composición inmunogénica incluye tampón de fosfato y polisorbato 80.

En un aspecto ejemplar, la composición inmunogénica incluye trehalosa, tampón tris y polisorbato 80. En otro aspecto ejemplar, la composición inmunogénica incluye trehalosa, tampón de histidina y polisorbato 80. En aún otro aspecto ejemplar más, la composición inmunogénica incluye trehalosa, tampón de fosfato y polisorbato 80.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además componentes de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y/o aceite mineral. Los ejemplos incluyen glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica incluye además formaldehído. Por ejemplo, en un aspecto preferido, una composición farmacéutica que incluye además formaldehído tiene una composición inmunogénica, en la que la toxina mutante de *C. difficile* de la composición inmunogénica se ha puesto en contacto con un agente de entrecruzamiento químico que incluye formaldehído. La cantidad de formaldehído presente en la composición farmacéutica puede variar desde un mínimo de aproximadamente 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,010%, 0,013% o 0,015%, hasta un máximo de aproximadamente 0,020%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014%, 0,013%, 0,012%, 0,011% o 0,010%. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. En un aspecto, la composición farmacéutica incluye aproximadamente 0,010% de formaldehído.

En algunos aspectos alternativos, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento no incluyen formaldehído. Por ejemplo, en un aspecto preferido, una composición farmacéutica que no incluye formaldehído tiene una composición inmunogénica, en la que al menos un aminoácido de la toxina mutante de *C. difficile* está químicamente entrecruzado por un agente que incluye EDC. Más preferiblemente, en tal aspecto, la toxina mutante de *C. difficile* no se ha puesto en contacto con un agente de entrecruzamiento químico que incluye formaldehído. Como otro aspecto ejemplar, una composición farmacéutica que está en forma liofilizada no incluye formaldehído.

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

Los adyuvantes ejemplares incluyen lípido A monofosforilado 3-des-O-acilado (MPL^{MR}) (véase el documento GB 2220211 (GSK)); un gel de hidróxido de aluminio tal como Alhydrogel^{MR} (Brenntag Biosector, Dinamarca); sales de aluminio (como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio), que se pueden utilizar con o sin un agente inmunoestimulante tal como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina.

Otro adyuvante ejemplar más es un oligonucleótido inmunoestimulador tal como un oligonucleótido CpG (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/040100, WO2010/067262), o una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como un oligonucleótido CpG (véase, por ejemplo, el documento WO 00/062800). En un aspecto preferido, el adyuvante es un oligonucleótido CpG, lo más preferiblemente un oligodesoxinucleótido de CpG (ODN de CpG). Los ODN de CpG preferidos son de la clase B que activan preferentemente las células B. En aspectos de la divulgación, el ODN de CpG tiene la secuencia de ácido nucleico 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 48) en la que * indica un enlace fosforotioato. El ODN de CpG de esta secuencia se conoce como CpG 24555, que se describe en el documento WO2010/067262. En un aspecto preferido, CpG 24555 se usa junto con una sal de hidróxido de aluminio tal como Alhydrogel.

Una clase adicional de adyuvantes ejemplares incluye adyuvantes de saponina, tales como Stimulon^{MR} (QS-21, que es un glicósido de triterpeno o saponina, Aquila, Framingham, Mass.) o partículas generadas a partir de ellas tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) y adyuvante ISCOMATRIX®. Por consiguiente, las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse en forma de ISCOM, ISCOM que contienen CTB, liposomas o encapsuladas en compuestos tales como acrilatos o poli(DL-lactida-co-glucósido) para formar microesferas de un tamaño adecuado para la adsorción. Normalmente, el término "ISCOM" se refiere a complejos inmunogénicos formados entre glucósidos, tales como saponinas triterpenoides (particularmente Quil A), y antígenos que contienen una región hidrófoba. En un aspecto preferido, el adyuvante es un adyuvante ISCOMATRIX.

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

Otra clase más de adyuvantes ejemplares son los análogos de glucolípidos que incluyen N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo de azúcar por un aminoácido.

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

Alternativamente, en un aspecto, la composición se administra al mamífero en ausencia de un adyuvante.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar mediante cualquier vía de administración, tal como, por ejemplo, vía parenteral, tópica, intravenosa, mucosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal, intramuscular, intradérmica, infusión, rectal y/o transdérmica para aplicaciones profilácticas y/o terapéuticas. En un aspecto preferido, la vía de administración de la composición es parenteral, más preferiblemente intramuscular. La administración intramuscular típica se realiza en los músculos del brazo o de la pierna.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar en combinación con terapias que son al menos parcialmente eficaces en la prevención y/o el tratamiento de la infección por *C. difficile*. Por ejemplo, una composición de la divulgación puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la bioterapia; terapia probiótica; implantes de heces; inmunoterapia (tal como inmunoglobulina intravenosa); y/o un estándar de atención aceptado para el tratamiento con antibióticos de la enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD), tal como metronidazol y/o vancomicina.

Una composición de la presente divulgación relacionada con la toxina A y la toxina B se puede administrar al mamífero en cualquier combinación. Por ejemplo, una composición inmunogénica que incluye una TcdA mutante de *C. difficile* puede administrarse al mamífero antes, al mismo tiempo o después de la administración de una composición inmunogénica que incluye una TcdB mutante de *C. difficile*. Por el contrario, una composición inmunogénica que incluye una TcdB mutante de *C. difficile* puede administrarse al mamífero antes, al mismo tiempo o después de la administración de una composición inmunogénica que incluye una TcdA mutante de *C. difficile*.

En otro aspecto, una composición que incluye un anticuerpo antitoxina A o un fragmento de unión del mismo puede administrarse al mamífero antes, al mismo tiempo o después de la administración de una composición que incluye

un anticuerpo antitoxina B o fragmento de unión del mismo. Por el contrario, una composición que incluye un anticuerpo antitoxina B o un fragmento de unión del mismo puede administrarse al mamífero antes, al mismo tiempo o después de la administración de una composición que incluye un anticuerpo antitoxina A o un fragmento de unión del mismo.

En un aspecto adicional, una composición de la presente divulgación puede administrarse al mamífero antes, simultáneamente con o después de la administración de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se puede administrar un adyuvante antes, al mismo tiempo o después de la administración de una composición que incluye una toxina mutante de *C. difficile*. Por consiguiente, una composición de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden envasar en el mismo vial o se pueden envasar en viales separados y mezclarse antes de su uso. Las composiciones se pueden formular para administración de una sola dosis y/o administración de múltiples dosis.

Métodos para proteger y/o tratar la infección por *C. difficile* en un mamífero

En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmune a una toxina de *C. difficile* en un mamífero. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento al mamífero. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir administrar una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune a la toxina de *C. difficile* respectiva en el mamífero.

En un aspecto ejemplar, la divulgación se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmune a una TcdA de *C. difficile* en un mamífero. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica que incluye una TcdA mutante de *C. difficile* al mamífero. En otro aspecto ejemplar, la divulgación se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmune a una TcdB de *C. difficile* en un mamífero. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica que incluye una TcdB mutante de *C. difficile* al mamífero.

En un aspecto adicional, el procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica que incluye una TcdA mutante de *C. difficile* y una cantidad eficaz de una composición inmunogénica que incluye una TcdB mutante de *C. difficile* al mamífero. En aspectos adicionales, las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar para tratar, prevenir, disminuir el riesgo, disminuir la gravedad, disminuir las ocurrencias y/o retrasar el inicio de una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile*, en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de la composición al mamífero.

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

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

Finalmente, la diarrea asociada a antibióticos (AAD, que también se conoce como diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD) es un síndrome relativamente leve y se caracteriza por diarrea leve a moderada, sin inflamación del intestino grueso (caracterizada por, por ejemplo, dolor y sensibilidad abdominal) y signos sistémicos de infección (por ejemplo, fiebre).

Estos tres síndromes distintos ocurren típicamente en un orden creciente de frecuencia. Es decir, la PMC suele ocurrir con menos frecuencia que la AAC, y la AAD suele ser la presentación clínica más frecuente de la enfermedad por *C. difficile*.

Una complicación frecuente de la infección por *C. difficile* es la enfermedad recurrente o recidivante, que ocurre en hasta el 20% de todos los sujetos que se recuperan de la enfermedad por *C. difficile*. La recaída puede caracterizarse clínicamente como AAD, AAC o PMC. Los pacientes que recaen una vez tienen más probabilidades de recaer nuevamente.

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

Los síntomas de una infección por *C. difficile* pueden incluir síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales tales como, por ejemplo, diarrea; colitis; colitis con calambres, fiebre, leucocitos fecales e inflamación en la biopsia de colon; colitis pseudomembranosa; hipoalbuminemia; anasarca; leucocitosis; septicemia; dolor abdominal; porte asintomático; y/o complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la infección, y combinaciones de los mismos, etc. En consecuencia, por ejemplo, la administración de

una cantidad eficaz de las composiciones descritas en el presente documento puede, por ejemplo, tratar, prevenir, disminuir el riesgo, disminuir la gravedad, disminuir las apariciones y/o retrasar el inicio de la diarrea; dolor abdominal, calambres, fiebre, inflamación en la biopsia de colon, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitosis, sepsis y/o porte asintomático, etc., en comparación con un mamífero al que no se le administró la composición.

Los factores de riesgo de una infección por *C. difficile* pueden incluir, por ejemplo, el uso actual o futuro inmediato de un antimicrobiano (se incluye cualquier agente antimicrobiano con un espectro antibacteriano y/o actividad contra bacterias anaeróbicas, incluidos, por ejemplo, antibióticos que causan alteración de la microbiota colónica normal, por ejemplo, clindamicina, cefalosporinas, metronidazol, vancomicina, fluoroquinolonas (incluyendo levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina y ciprofloxacina, linezolid, etc.); retirada presente o futura inmediata de metronidazol o vancomicina recetados; admisión actual o futura inmediata a un centro de atención médica (tal como un hospital, centro de atención crónica, etc.) y trabajadores de la salud; tratamiento presente o futuro inmediato con inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de H₂ y/o metotrexato, o una combinación de los mismos; presente o riesgo de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal; cirugía o procedimiento gastrointestinal pasado, presente o futuro inmediato en el mamífero; recurrencia pasada o presente de una infección por *C. difficile* y/o una CDAD, por ejemplo, pacientes que han tenido una infección por *C. difficile* y/o una CDAD una o más de una vez; y seres humanos de al menos aproximadamente 65 años o más.

En los procedimientos descritos en el presente documento, el mamífero puede ser cualquier mamífero, tal como, por ejemplo, ratones, hámsteres, primates y seres humanos. En un aspecto preferido, el mamífero es un ser humano. De acuerdo con la presente divulgación, el ser humano puede incluir individuos que han exhibido una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile*; individuos que presentan actualmente una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile*; e individuos que están en riesgo de una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile*.

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

Ejemplos de pacientes que están en riesgo de una infección por *C. difficile* incluyen individuos en riesgo de o que están experimentando actualmente un uso antimicrobiano planificado; individuos en riesgo de o que están experimentando actualmente la abstinencia de metronidazol o vancomicina recetados; individuos que están en riesgo de o están actualmente sometidos a una admisión planificada a un centro de atención médica (tal como un hospital, centro de atención crónica, etc.) y trabajadores de la salud; y/o individuos con riesgo de, o que están experimentando actualmente un tratamiento planificado con inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de H₂ y/o metotrexato, o una combinación de los mismos; individuos que han tenido o están sufriendo enfermedades gastrointestinales, tal como enfermedad inflamatoria del intestino; individuos que han tenido o están siendo sometidos a cirugía gastrointestinal o procedimientos gastrointestinales; e individuos que han tenido o están teniendo una recurrencia de una infección por *C. difficile* y/o una CDAD, por ejemplo, pacientes que han tenido una infección por *C. difficile* y/o una CDAD una o más de una vez; individuos que tienen alrededor de 65 años o más. Estos pacientes en riesgo pueden o no mostrar actualmente síntomas de una infección por *C. difficile*.

En pacientes asintomáticos, la profilaxis y/o el tratamiento pueden comenzar a cualquier edad (por ejemplo, aproximadamente a los 10, 20 o 30 años). En un aspecto, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcance al menos aproximadamente 45, 55, 65, 75 u 85 años. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un ser humano asintomático que tiene entre 50 y 85 años.

En un aspecto, el procedimiento para prevenir, disminuir el riesgo, disminuir la gravedad, disminuir las ocurrencias y/o retrasar el inicio de una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile* en un mamífero incluye administrar una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento a un mamífero que lo necesite, un mamífero en riesgo y/o un mamífero susceptible a una infección por *C. difficile*. Una cantidad eficaz incluye, por ejemplo, una cantidad suficiente para prevenir, disminuir el riesgo, disminuir la gravedad, disminuir las ocurrencias y/o retrasar el inicio de una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile* en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición. La administración de una cantidad eficaz de las composiciones descritas en el presente documento puede, por ejemplo, prevenir, disminuir el riesgo, disminuir la gravedad, disminuir la aparición y/o retrasar el inicio de la diarrea; dolor abdominal, calambres, fiebre, inflamación en la biopsia de colon, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitosis, sepsis y/o porte asintomático, etc., en comparación con un mamífero al que no se le administró la composición. En un aspecto preferido, el procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica descrita en el presente documento al mamífero que lo necesite, al mamífero en riesgo de y/o al mamífero susceptible a una infección por *C. difficile*.

En un aspecto adicional, el procedimiento para tratar, disminuir la gravedad y/o retrasar el inicio de una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile* en un mamífero incluye administrar una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento a un mamífero que se sospecha o padece actualmente una infección por *C. difficile*. Una cantidad eficaz incluye, por ejemplo, una cantidad suficiente para tratar, disminuir la gravedad y/o retrasar el inicio de una infección por *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma y/o complicación de los mismos asociados a *C. difficile* en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición.

La administración de una cantidad eficaz de la composición puede mejorar al menos un signo o síntoma de infección por *C. difficile* en el sujeto, como los que se describen a continuación. La administración de una cantidad eficaz de las composiciones descritas en el presente documento puede, por ejemplo, disminuir la gravedad y/o disminuir la aparición de diarrea; disminuir la gravedad y/o disminuir la aparición de dolor abdominal, calambres, fiebre, inflamación en la biopsia de colon, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitosis, sepsis y/o portador asintomático, etc., en comparación con un mamífero al que no se le administró la composición. Opcionalmente, la presencia de síntomas, signos y/o factores de riesgo de una infección se determina antes de comenzar el tratamiento. En un aspecto preferido, el procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo y/o fragmento de unión del mismo descrito en el presente documento al mamífero que se sospecha o padece actualmente una infección por *C. difficile*.

Por lo tanto, una cantidad eficaz de la composición se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto deseado (por ejemplo, efecto profiláctico y/o terapéutico) en los procedimientos de la presente divulgación. Por ejemplo, la cantidad de un inmunógeno para la administración puede variar desde un mínimo de aproximadamente 1 µg, 5 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg o 1 mg hasta un máximo de aproximadamente 2 mg, 1 mg, 500 µg, 200 µg por inyección. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un intervalo adecuado. Normalmente, se utilizan aproximadamente 10, 20, 50 o 100 µg por inmunógeno para cada inyección humana.

La cantidad de una composición de la divulgación administrada al sujeto puede depender del tipo y la gravedad de la infección y/o de las características del individuo, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos. También puede depender del grado, la gravedad y el tipo de enfermedad. Una cantidad eficaz también puede variar dependiendo de factores, tales como la vía de administración, el lugar de destino, el estado fisiológico del paciente, la edad del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras terapias administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. El experto en la materia podrá determinar las cantidades apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

Una cantidad eficaz puede incluir una dosis eficaz o múltiples dosis eficaces (tales como, por ejemplo, 2, 3, 4 dosis o más) para su uso en los procedimientos de la presente invención. Es posible que sea necesario ajustar las dosis eficaces para optimizar la seguridad y la eficacia.

Una combinación de cantidad y frecuencia de dosis adecuada para lograr usos profilácticos y/o terapéuticos se define como un régimen profiláctico o terapéuticamente eficaz. En un régimen profiláctico y/o terapéutico, la composición se administra típicamente en más de una dosis hasta que se alcanza una respuesta inmune suficiente. Por lo general, se controla la respuesta inmune y se administran dosis repetidas si la respuesta inmune comienza a disminuir.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de cepas de *C. difficile* negativas para toxinas

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

Seis cepas no expresaban la toxina A y carecían del locus de patogenicidad completo: *C. difficile* 1351 (ATCC 43593^{MR}), *C. difficile* 3232 (ATCC BAA-1801^{MR}), *C. difficile* 7322 (ATCC 43601^{MR}), *C. difficile* 5036 (ATCC 43603^{MR}), *C. difficile* 4811 (4 ATCC 3602^{MR}) y *C. difficile* VPI 11186 (ATCC 700057^{MR}). Se seleccionó VPI 11186 con base en su eficacia para absorber el ADN plasmídico por conjugación.

Se ensayaron las mismas 13 cepas en un ensayo de PCR multiplex usando cebadores fuera del locus de patogenicidad (PaLoc; Braun et al., Gene. 28 de noviembre de 1996; 181 (1-2): 29-38). Los resultados de la PCR

demonstraron que el ADN de las 6 cepas negativas a la toxina A mediante ELISA no amplificaba ningún gen de PaLoc (*tcdA-tcdE*). Las secuencias flanqueantes de PaLoc (*cdd3* y *cdu2*) estaban presentes (datos no mostrados).

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

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

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

Los marcos de lectura abiertos (ORF) de las toxinas A y B mutantes de longitud completa con base en las secuencias del genoma de la cepa 630Δ se diseñaron para síntesis personalizada en Blue Heron Biotech. Véase, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 9-14. El sitio activo de la actividad glucosiltransferasa responsable de la toxicidad celular se alteró mediante dos sustituciones alélicas: D285A/D287A (véase la SEQ ID NO: 3) para la toxina A, y D286A/D288A (véase la SEQ ID NO: 5) para la toxina B. Se mutaron dos nucleótidos en cada codón de aspartato (D) para crear el codón de alanina (A). Véanse, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 9-14. Además, se construyó un par de vectores que expresan toxinas mutantes que carecen de residuos de cisteína siguiendo una síntesis personalizada en Blue Heron Biotech. Se reemplazaron siete residuos de cisteína de la toxina A mutante y 9 residuos de cisteína de la toxina B mutante por alanina. Las sustituciones incluyen cisteínas catalíticas de la proteasa autocatalítica de la toxina A y B. Además, se introdujeron mutaciones silenciosas cuando fue necesario para eliminar los sitios de enzimas de restricción utilizados para la construcción del vector.

Ejemplo 4: Vector de expresión de *fdx* pMTL84121

El vector lanzadera plasmídico utilizado para la expresión del antígeno de la toxina mutante de *C. difficile* se seleccionó del sistema modular de la serie pMTL8000 desarrollado por el laboratorio Minton (véase Heap et al., J Microbiol Methods. Julio de 2009; 78 (1): 79-85). El vector elegido pMTL84121fdx contiene el replicón Gram+ pCD6del plásmido de *C. difficile*, el marcador seleccionable *catP* (cloranfenicol/tiamfenicol), el replicón Gram- p15a y la función *tra*, y el promotor de ferredoxina (*fdx*) de *C. sporogenes* y el sitio de clonación múltiple distal (MCS). Los datos empíricos sugirieron que el replicón p15a de bajo número de copias confería mayor estabilidad en *E. coli* que la alternativa ColE1. El promotor *fdx* se seleccionó porque producía una expresión más alta que otros promotores probados en experimentos con constructos informadores CAT (por ejemplo, *tcdA*, *tcdB*; o tetR o *xylR* heterólogos) (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Clonación de los ORF de toxina modificados en pMTL84121fdx

Los marcos de lectura abiertos (ORF) de la toxina A y B mutante de longitud completa basados en las secuencias del genoma de la cepa 630Δ se subclonaron usando sitios de clonación múltiple *NdeI* y *BglII* del vector pMTL84121fdx usando técnicas estándar de biología molecular. Para facilitar la clonación, los ORF estaban flanqueados por un sitio *NdeI* proximal que contenía el codón de inicio y un sitio *BglII* justo secuencia abajo del codón de terminación.

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

El residuo de cisteína catalítica del dominio de proteasa autocatalítico se sustituyó (es decir, C700A por TcdA y C698A por TcdB) en las SEQ ID NOs: 3 y 5, es decir, en cada uno de los "mutantes dobles". Para la mutagénesis de la toxina A mutante, se subclonó un fragmento *NdeI-HindIII* de 2,48 kb del plásmido de expresión TcdA D285A/D287A en pUC19 (cortado con el mismo) y se realizó la mutagénesis dirigida al sitio en este molde. Una vez que se confirmaron los nuevos alelos mediante análisis de secuencia de ADN, los fragmentos *NdeI-HindIII* modificados se reintrodujeron en el vector de expresión pMTL84121fdx para crear los "mutantes triples", es decir, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6.

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

Para la mutagénesis de la toxina B mutante, se modificó y reintrodujo un fragmento *NdeI-EcoNI* de 3,29 kb del plásmido de la toxina B mutante. Como el sitio *EcoNI* no está presente en los vectores de clonación disponibles, se subclonó un fragmento de *NdeI-EcoRV* de 3,5 kb ligeramente más grande en pUC19 (preparado con *NdeI-SmaI*). Después de la mutagénesis, el fragmento interno modificado *NdeI-EcoNI* de 3,3 kb se cortó y se usó para reemplazar el correspondiente fragmento pMTL84121fdx del vector de expresión de la toxina B mutante. Como se encontró que la eficacia de clonación de esta estrategia direccional era bastante baja, se intentó en paralelo una

estrategia alternativa para introducir el alelo C698A que implicaba la sustitución de un *DraIII* de 1,5 kb. Ambas estrategias produjeron independientemente los recombinantes deseados.

Ejemplo 8: Creación de las variantes adicionales de toxinas mutantes mediante mutagénesis dirigida al sitio

Se construyeron al menos doce variantes diferentes de toxina mutante de *C. difficile*. Se introdujeron sustituciones alélicas en fragmentos del extremo terminal N del gen de la toxina mutante mediante mutagénesis dirigida al sitio (kit Quickchange®). También se diseñaron toxinas recombinantes como controles de referencia para evaluar la capacidad de este sistema basado en plásmidos para generar proteína cuantitativamente equivalente en actividad biológica a las toxinas nativas purificadas a partir de cepas de *C. difficile* de tipo silvestre. En este caso, se introdujeron sustituciones alélicas para revertir las sustituciones originales de glucosiltransferasa. Además, se construyó un par de vectores de toxinas mutantes sin cisteína siguiendo una síntesis personalizada en Blue Heron Biotech.

Las doce variantes de toxina incluyen (1) una toxina A mutante de *C. difficile* que tiene una mutación D285A/D287A (SEQ ID NO: 3); (2) una toxina B mutante de *C. difficile* que tiene una mutación D286A/D288A (SEQ ID NO: 5); (3) una toxina A mutante de *C. difficile* que tiene una mutación de D285A/D287A C700A (SEQ ID NO: 4); (4) una toxina B mutante de *C. difficile* que tiene una mutación D286A/D288A C698A (SEQ ID NO: 6); (5) una toxina A recombinante que tiene la SEQ ID NO: 1; (6) una toxina B recombinante que tiene SEQ ID NO: 2; (7) una toxina A mutante de *C. difficile* que tiene una mutación C700A; (8) una toxina B mutante de *C. difficile* que tiene una mutación C698A; (9) una toxina A mutante de *C. difficile* que tiene una mutación C700A C597S, C1169S, C1407S, C1623S, C2023S y C2236S; (10) una toxina B mutante de *C. difficile* que tiene una mutación C698A C395S, C595S, C824S, C870S, C1167S, C1625S, C1687S y C2232S; (11) una toxina A mutante de *C. difficile* que tiene una mutación D285A, D287A, C700A, D269A, R272A, E460A y R462A (SEQ ID NO: 7); y (12) una toxina B mutante de *C. difficile* que tiene una mutación D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A y C698A (SEQ ID NO: 8)

También se construyeron toxinas penta mutantes mediante mutagénesis dirigida al sitio y usando los mismos materiales y procedimientos que se describieron anteriormente, por ejemplo, en los Ejemplos 1-7. El penta mutante para la toxina B incluyó las siguientes sustituciones D286A/D288A C698A/E970K/E976K (SEQ ID NO: 184). La toxina B penta mutante se expresó en células negativas para VPI 11186 *spo0A* como se describió anteriormente. Se realizó una transferencia Western usando mAb # B8-26 (SEQ ID NO: 49), que es específico para un epítipo del extremo terminal N de la toxina B, para confirmar la expresión de la toxina B penta mutante. En el segundo, tercero y cuarto carriles desde la izquierda, se utilizaron 50 ng, 30 ng y 10 ng de triple mutante B purificado (SEQ ID NO: 86), respectivamente, como proteína de referencia. En los carriles quinto y sexto desde la izquierda, se evaluó una dilución 1:100 y una dilución 1:1.000, respectivamente, del concentrado de lisado de células B de la toxina penta mutante. La cantidad estimada de proteína en la concentración de la toxina B penta mutante es de aproximadamente 1.000 µg/ml. Como se muestra en la transferencia, la toxina B penta mutante (concentrada) exhibe una banda de proteína del tamaño esperado a aproximadamente 270 kD.

Ejemplo 9: Estabilidad de transformantes

Se obtuvieron plásmidos reorganizados con la cepa de laboratorio de *E. coli* DH5D comúnmente utilizada. Por el contrario, las transformaciones utilizando el huésped de *E. coli* Invitrogen Stb12^{MR} produjeron recombinantes de toxina mutante de longitud completa de crecimiento lento después de tres días de crecimiento a 30 °C en placas de cloranfenicol LB (25 µg/ml). Se obtuvieron eficiencias de clonación más bajas con cepas de *E. coli* relacionadas Stb13^{MR} y Stb14^{MR}, aunque se encontró que estas líneas eran estables para el mantenimiento del plásmido. Posteriormente, los transformantes se propagaron en agar o en cultivo líquido bajo selección de cloranfenicol a 30 °C. También se encontró que el uso de medios LB (de Miller) mejora la recuperación y el crecimiento de transformantes en comparación con los medios basados en triptona-soja sin animales.

Ejemplo 10: Transformación de *C. difficile* con pMTL84121_{fdx} que codifica genes de toxina mutantes genéticos o de tipo silvestre

La transformación de *C. difficile* por transferencia conyugal de *E. coli* se realizó esencialmente como se describe en Heap et al., Journal of Microbiological Methods, 2009. 78 (1): páginas 79-85. El huésped de *E. coli* CA434 se transformó con pMTL84121 _{fdx} que codifica genes de toxina mutante de tipo silvestre o variantes. El huésped de *E. coli* CA434 es el intermedio para movilizar plásmidos de expresión en la cepa de producción de *C. difficile* VPI 11186 *spo0A1*. CA434 es un derivado de *E. coli* HB101. Esta cepa alberga el plásmido conjugativo Tra+ Mob+ R702 que confiere resistencia a Km, Tc, Su, Sm/Spe y Hg (debido a Tn1831). Se prepararon células CA434 químicamente competentes o electrocompetentes y se seleccionaron los transformantes del vector de expresión en placas LB CAM de Miller a 30 °C. Las colonias de crecimiento lento que aparecieron después de 3 días se recogieron y amplificaron en cultivos de cloranfenicol LB de 3 ml hasta la fase logarítmica media (~ 24 h, 225 rpm, agitador orbital a 30 °C). Los cultivos de *E. coli* se recolectaron mediante centrifugación a baja velocidad (5.000 g) para evitar romper los pili, y los sedimentos celulares se resuspendieron suavemente con una pipeta de transferencia de calibre ancho en 1 ml de PBS. Las células se concentraron mediante centrifugación a baja velocidad. La mayor parte del PBS se eliminó por inversión y los sedimentos drenados se transfirieron a la cámara anaeróbica y se resuspendieron con 0,2 ml de

cultivo de *C. difficile*, se colocaron en placas de agar BHIS y se dejaron crecer durante 8 h o durante la noche. En el caso de los transformantes de la toxina A mutante, se lograron mejores resultados con la conjugación durante la noche. Los parches celulares se rasparon en 0,5 ml de PBS y se sembraron 0,1 ml en medio de selección BHIS suplementado con 15 µg/ml de tiamfenicol (análogo más potente de cloranfenicol) y D-cicloserina/cefotaxima para matar las células donantes de *E. coli*. Los transformantes que aparecieron 16-24 h más tarde se purificaron volviendo a sembrar en una nueva placa BHIS (más suplementos) y los cultivos posteriores se probaron para determinar la expresión de toxinas recombinantes o toxinas mutantes. Se prepararon reservas permanentes de semillas y glicerol a partir de clones que mostraban una buena expresión. También se prepararon minipreps de plásmido a partir de cultivos de 2 ml utilizando un procedimiento del kit modificado de Qiagen en el que las células se trataron previamente con lisozima (no esencial). El ADN del miniprep de *C. difficile* se utilizó como molde para la secuenciación por PCR para verificar la integridad del clon. Alternativamente, el ADN maxiprep del plásmido se preparó a partir de transformantes de *E. coli* Stbl2^{MR} y se secuenció.

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

Los transformantes se cultivaron ya sea en cultivos de 2 ml (para análisis de rutina) o en matraces con tapa de ventilación (para experimentos de curso temporal). Las muestras (2 ml) se centrifugaron brevemente (10.000 rpm, 30 s) para concentrar las células: los sobrenadantes se decantaron y concentraron 10x (Amicon-ultra 30k); los sedimentos se drenaron y congelaron a -80 °C. Los sedimentos celulares se descongelaron en hielo, se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis (Tris-HCl pH 7,5; EDTA 1 mM, glicerol al 15%) y se sometieron a ultrasonido (una ráfaga de 20 s con micropunta). El lisado se centrifugó a 4 °C y el sobrenadante se concentró 5 veces. Las muestras de sobrenadante y lisado se combinaron con tampón de muestra y se trataron térmicamente (10 min, 80 °C) antes de cargarlas en geles de SDS-PAGE con Tris-acetato al 3-8% por duplicado (Invitrogen). Un gel se tiñó con Coomassie, el segundo se sometió a electrotransferencia para análisis Western. Se utilizaron antisueros de conejo específicos de la toxina A y específicos de la toxina B (Fitzgerald; Biodesign) para detectar las variantes de la toxina A y B mutantes. La expresión de la toxina B hepta mutante (SEQ ID NO: 8) también se confirmó mediante hibridación por transferencia Western.

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

Las toxinas A y B doble mutantes (DM) genéticas (SEQ ID NOs: 3 y 5, respectivamente) y las toxinas A y B triple mutantes (TM) (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) no transfirieron ¹⁴C-glucosa a 10 µg de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 en ensayos de glucosilación *in vitro* en presencia de UDP-¹⁴C-glucosa [30 µM], HEPES 50 mM, pH 7,2, KCl 100 mM, MgCl₂ 4 mM, MnCl₂ 2 mM, DTT 1 mM y 0,1 µg/µl de BSA. Sin embargo, los controles de toxina A y B de tipo silvestre (que tienen la SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente) transfirieron ¹⁴C-glucosa a GTPasas de manera eficiente a una dosis baja de 10 y 1 ng cada una (y los datos más bajos no se muestran) (Figuras 4A y 4B), incluso en presencia de 100 µg de toxina mutante (Figura 4B), lo que indica una reducción de al menos 100.000 veces en comparación con las respectivas toxinas de tipo silvestre. Se detectaron resultados similares para la GTPasa Cdc42 (datos no mostrados).

Específicamente, en la Figura 4B, la toxina A y la toxina B de tipo silvestre (1 ng) o la toxina A triple mutante y la toxina B triple mutante (100 µg) se incubaron con GTPasa RhoA en presencia de UDP-¹⁴C-glucosa durante 2 horas a 30 ° vs. Como se ilustra, 1 ng de TcdA y TcdB de tipo silvestre transfirieron ¹⁴C-glucosa a RhoA, pero 100 µg de toxina A triple mutante y toxina B triple mutante no lo hicieron. Cuando se añadió 1 ng de TcdA o TcdB de tipo silvestre en la reacción con 100 µg respectivos de toxina A triple mutante o toxina B triple mutante, se detectó glucosilación de RhoA, lo que indica la falta de inhibidores de glucosilación. La sensibilidad de detección para la actividad de glucosilación se estableció en 1 ng de toxina de tipo silvestre en un ambiente de 100 µg de toxina mutante (proporción de 1:100.000). Los resultados muestran que las mutaciones en el sitio activo de la glucosiltransferasa en la toxina A triple mutante y la toxina B triple mutante redujeron cualquier actividad de glucosiltransferasa medible (actividad 100.000 veces menor en comparación con la actividad de las respectivas toxinas de tipo silvestre). También se desarrolló un ensayo similar para cuantificar la actividad glucosiltransferasa mediante precipitación con TCA de GTPasas glucosiladas.

Ejemplo 13: Anulación de la actividad cisteína proteasa autocatalítica

La función de escisión autocatalítica se anuló en los mutantes A y B triple genéticos (TM) (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) cuando se mutó el sitio de escisión de la cisteína proteasa. Como se ilustra en la Figura 5, las toxinas A y B de tipo silvestre (wt) (SEQ ID NOs: 3 y 5, respectivamente) se escinden en presencia de inositol-6-fosfato. Las toxinas A y B doble mutantes (SEQ ID NOs: 3 y 5, respectivamente) también se escinden en presencia de inositol-6-fosfato (datos no mostrados), similar a la del tipo silvestre. La toxina A (SEQ ID NO: 3) se escinde de 308 kDa en 2 fragmentos de 245 y 60 kDa. La toxina B (SEQ ID NO: 5) se escinde a partir de 270 kDa en dos fragmentos de 207 y 63 kDa. Los mutantes A y B triple genéticos (TM) (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) no se ven afectados a 308 y 270 kDa respectivamente, incluso en presencia de inositol-6-fosfato. Véase la Figura 5. Por lo tanto, la actividad de la cisteína proteasa se inactivó mediante modificación genética.

Más específicamente, en la Figura 5, se incubó 1 µg de triple mutante A y triple mutante B durante 90 minutos a temperatura ambiente (21 ± 5 °C) en paralelo con TcdA y TcdB de tipo silvestre de List Biologicals. La reacción de escisión se realizó en un volumen de 20 µl en Tris-HCl, pH 7,5, DTT 2 mM en presencia o ausencia de inositol-6-fosfato (10 mM para TcdA y 0,1 mM para TcdB). A continuación, se cargó todo el volumen de reacción en un SDS/PAGE al 3-8%; las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Como se ilustra, TcdA y TcdB wt se escindieron en dos bandas de proteínas de 245 kD y 60 kD y 207 kD y 63 kD, respectivamente, en presencia de inositol-6-fosfato. La toxina A triple mutante y la toxina B triple mutante no se escindieron, lo que confirma la mutación C700A en la toxina A triple mutante y la mutación C698A en la toxina B triple mutante bloquearon la escisión.

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

Se evaluaron las toxinas mutantes genéticas por su citotoxicidad mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células IMR90, una línea celular de fibroblastos pulmonares diploides humanos. Estas células son sensibles tanto a la toxina A como a la B. Como realización alternativa preferida, se pueden usar células renales normales Vero de *Cercopithecus aethiops* en el ensayo de citotoxicidad, ya que se observó que tenían sensibilidades razonables a la toxina A y B. Preferiblemente, las células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 no se utilizan en el ensayo de citotoxicidad porque han mostrado sensibilidades significativamente reducidas a las toxinas, en comparación con las líneas celulares Vero e IMR90. Véase, por ejemplo, la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Sensibilidad de la línea celular a las toxinas A y B*				
Línea celular	50 µg/ml de toxina	Células/pocillo	CE ₅₀ pg/ml)	
			48 horas	72 horas
Vero (ATCC CCL-81 ^{MR})	A	10.000	1.816	244
	B	10.000	62	29
IMR90 (ATCC CCL-186 ^{MR})	A	10.000	1.329	1.152
	B	10.000	14	13
HT-29 (ATCC HTB-38 ^{MR})	A	10.000	>1E6	>1E6
	B	10.000	11.089	53.313
* El ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> se realizó midiendo el ATP celular utilizando un sustrato a base de luciferasa, CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI)				

Se añadieron muestras de toxina mutante genética o toxina wt diluidas en serie a las monocapas de células cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Después de la incubación a 37 °C durante 72 h, las placas se evaluaron en busca de células metabólicamente activas midiendo los niveles de ATP celular mediante la adición del reactivo CellTiterGlo® basado en luciferasa (Promega, Madison, WI) que genera luminiscencia expresada como unidades relativas de luminiscencia (URL). Las URL altas muestran que las células son viables, las URL bajas muestran que las células no son metabólicamente activas y están muriendo. El nivel de citotoxicidad, expresado como CE₅₀, se define como la cantidad de toxina wt o toxina mutante genética que provoca una reducción del 50% en las URL en comparación con los niveles en los controles de cultivo celular (los detalles de este ensayo se proporcionan a continuación). Como se muestra en la Figura 6, Tabla 7A y Tabla 8A, los valores de CE₅₀ de TcdA y TcdB fueron de aproximadamente 0,92 ng/ml y 0,009 ng/ml, respectivamente. Los valores de CE₅₀ de la toxina A triple mutante y la toxina B triple mutante fueron aproximadamente 8.600 ng/ml y 74 ng/ml, respectivamente. A pesar de una reducción aproximada de 10.000 veces en la citotoxicidad en relación con las toxinas wt, ambas toxinas mutantes genéticas todavía demostraron bajos niveles residuales de citotoxicidad. Esta citotoxicidad residual podría bloquearse neutralizando los anticuerpos monoclonales antitoxina, lo que indica que era específica de las toxinas triple mutantes, pero no probablemente relacionadas con las actividades enzimáticas conocidas de las toxinas wt (glucosilación o autoproteólisis).

Ambas toxinas wt exhiben una potente citotoxicidad *in vitro*, siendo suficientes pequeñas cantidades de las toxinas para causar diversos efectos sobre las células de mamíferos tales como redondeo celular (efecto citopático o ECP) y falta de actividad metabólica (medida por niveles de ATP). En consecuencia, se han desarrollado dos ensayos *in vitro* (un ensayo de ECP o de redondeo celular y un ensayo de ATP) para verificar que no quede ninguna citotoxicidad residual en las sustancias farmacológicas de la toxina mutante. Los resultados se expresan como CE₅₀, que es la cantidad de toxina o toxina mutante que hace que 1) 50% de las células desarrollen ECP o 2) 50% de reducción en los niveles de ATP medidos en unidades relativas de luz.

En el ensayo de ECP, una muestra de sustancia farmacológica se diluye en serie y se incuba con células IMR90, que se observan en busca de un efecto citopático potencial. El ensayo de ECP se puntúa en una escala de 0 (células normales) a 4 (~ 100% de redondeo de células) y una puntuación de 2 (~ 50% de redondeo de células) se define como el valor de CE₅₀ de la muestra de prueba. Este procedimiento se utiliza para analizar una sustancia farmacológica de toxina mutante a una concentración de 1.000 µg/ml, que es la concentración máxima tolerable que se puede analizar en este ensayo sin interferencia de la matriz. En consecuencia, no se informa citotoxicidad detectable como CE₅₀ > 1.000 µg/ml.

El ensayo de ATP se basa en la medición de la cantidad de señal luminiscente generada a partir de ATP, que es proporcional al número de células metabólicamente activas. La concentración máxima tolerable que se puede probar en este ensayo sin interferencia del ensayo es de aproximadamente 200 µg/ml. Por lo tanto, no se informa de citotoxicidad detectable en este ensayo como $CE_{50} > 200$ µg/ml.

Se añadieron diferentes concentraciones de toxina A y B mutante a las células en paralelo con los controles de toxina. Los criterios de valoración del ensayo fueron la viabilidad celular determinada por los niveles de ATP celular utilizando CellTiter-Glo® (Promega). El grado de luminiscencia es proporcional a los niveles de ATP o al número de células viables.

La citotoxicidad *in vitro* (CE_{50}) de la toxina A de tipo silvestre (wt) fue de 920 pg/ml y de 9 pg/ml para la toxina B. La citotoxicidad *in vitro* (CE_{50}) de la toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) fue de 8.600 ng/ml y de 74 ng/ml para la toxina B mutante (SEQ ID NO: 6). Aunque estos valores representan reducciones de 9.348 y 8.222 veces, respectivamente, se detectó citotoxicidad residual en ambas toxinas mutantes.

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

Además, la citotoxicidad residual de cada toxina triple mutante podría neutralizarse completamente (por ejemplo, una reducción de al menos 6-8 \log_{10} en la toxicidad, en relación con la toxicidad de la toxina de tipo silvestre) por los anticuerpos específicos de la toxina. Véase el Ejemplo 16, a continuación.

Los ensayos de cultivo celular son más sensibles para la detección de citotoxicidad que los modelos animales *in vivo*. Cuando se suministra por vía ip o vía iv en el modelo de desafío letal de ratón, la TcdA wt tiene una DL_{50} de ~ 50 ng por ratón mientras que la TcdB wt es más potente con una DL_{50} de ~ 5 ng por ratón. Por el contrario, los ensayos *in vitro* basados en cultivo celular descritos anteriormente tienen valores de CE_{50} de 100 pg por pocillo para TcdA wt y 2 pg por pocillo para TcdB wt.

Ejemplo 15: Citotoxicidad residual de la toxina B hepta mutante genética (SEQ ID NO: 8), y citotoxicidad de la toxina B penta mutante (SEQ ID NO: 184)

Como se ilustra en la Figura 7, los valores de CE_{50} son similares para los mutantes de la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) (20,78 ng/ml) y la toxina B hepta mutante (SEQ ID NO: 8) (35,9 ng/ml) lo que indica que las cuatro mutaciones adicionales para modificar adicionalmente el sitio activo de glucosiltransferasa y el sitio de unión al sustrato de GTPasa no redujeron más la citotoxicidad de las toxinas mutantes genéticas. Los valores de CE_{50} también fueron similares para la toxina B doble mutante (SEQ ID NO: 5) que para las toxinas triple y hepta mutantes (datos no mostrados). Esta observación sugiere que el mecanismo de citotoxicidad de las toxinas mutantes es sorprendentemente independiente de la glucosiltransferasa y del mecanismo de reconocimiento del sustrato.

Se evaluó la citotoxicidad de la toxina B penta mutante (SEQ ID NO: 184) mediante un ensayo de citotoxicidad de ATP *in vitro* en células IMR90, como se describió anteriormente. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 14. Como se muestra en la Figura 26, la citotoxicidad de la toxina B penta mutante se redujo en gran medida, en comparación con la toxina B de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), que se obtuvo comercialmente de List Biologicals), y en comparación con la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 86). El control de "sólo células" se refiere a las células IMR-90. Véase la Tabla 62 a continuación, que muestra los valores de CE_{50} respectivos.

Tabla 62

Muestra	CE_{50}	Veces que se reduce la CE_{50}
B penta mutante (concentrado de lisado)	11,5 µg/ml	1.642.857
B triple mutante (purificado)	18,9 ng/ml	2.700
List toxina B lote 127902-115	7,0 pg/ml	1

Además, se evaluó la toxina B penta mutante ("PM-B") (SEQ ID NO: 184) para determinar la inhibición competitiva de la citotoxicidad que está mediada por la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 86) en células IMR-90. Véase la Figura 27. Para preparar las muestras, la toxina B triple mutante (B TM) (SEQ ID NO: 86) se mantuvo a una concentración constante de 200 ng/ml ($10 \times CE_{50}$) en todos los pocillos. A los pocillos que contenían la toxina B triple mutante se les añadió una toxina B penta mutante diluida en serie 2 veces a partir de 5 µg/ml. Las muestras se transfirieron luego a una placa de 96 pocillos que contenía células IMR-90 y luego se incubaron durante 72 horas. Se completó un ensayo de ATP, como se describió anteriormente, por ejemplo, en el Ejemplo 14. Como se puede mostrar en la Figura 27, la toxina B penta mutante inhibió competitivamente la citotoxicidad de la toxina B triple mutante.

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

Para evaluar adicionalmente la naturaleza de la citotoxicidad residual, las toxinas mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6) se mezclaron y se incubaron con sus respectivos anticuerpos neutralizantes antes y la mezcla se añadió a la monocapa de células IMR-90.

Los resultados (Figura 8) mostraron que la citotoxicidad residual de la toxina A y B mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) puede anularse completamente con anticuerpos neutralizantes específicos para la toxina A mutante (panel superior, Figura 8) y la toxina B mutante (panel inferior, Figura 8). Se incubaron concentraciones crecientes de toxina A mutante (panel superior) y B (panel inferior) con anticuerpos policlonales antitoxina de conejo (pAb, dilución 1:10) o monoclonales murinos (dilución 1:50 de una solución madre que contenía 3,0 mg de IgG/ml) antes de agregarlos a las células IMR-90. Después de 72 horas de incubación de tratamiento con células IMR-90 a 37 °C, se añadió sustrato CellTiter-Glo® y se midieron las unidades relativas de luz (URL) en un espectrofotómetro con el programa de luminiscencia para medir los niveles de ATP. Cuanto menor sea el nivel de ATP, mayor será la toxicidad. Los controles incluyeron TcdA y TcdB añadidas 4 veces sus correspondientes valores de CE₅₀.

Los informes publicados sugieren que las mutaciones en el dominio glucosiltransferasa o proteasa autocatalítica de las toxinas dan como resultado la inactivación completa de la toxicidad. Sin embargo, nuestros datos no concuerdan con estos informes publicados y esto podría atribuirse al aumento de las concentraciones de las toxinas mutantes altamente purificadas probadas en nuestros estudios en comparación con los lisados de cultivos crudos en los informes publicados; puntos de tiempo aumentados en los que se observó el redondeo celular de las células tratadas con toxina mutante (por ejemplo, 24 horas, 48 horas, 72 horas o 96 horas) en comparación con las observaciones realizadas en menos de 12 horas; el uso de líneas celulares que exhiben sensibilidades significativamente más altas a las toxinas en los ensayos de citotoxicidad presentes en contraste con las células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 en los ensayos de citotoxicidad descritos en informes publicados; y/o a una actividad o proceso desconocido, distinto de la glucosilación, que podría estar impulsando la toxicidad residual de las toxinas mutantes.

Ejemplo 17: Nuevo mecanismo de citotoxicidad de toxinas mutantes genéticas

Para investigar el mecanismo de citotoxicidad residual de las toxinas mutantes genéticas, se trataron células IMR-90 con toxina B wt (SEQ ID NO: 2) o toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6), y se estudió la glucosilación de GTPasa Rac1 con el tiempo de tratamiento. Se recolectaron muestras de 24 a 96 horas y se prepararon extractos celulares. El Rac1 glucosilado se distingue del Rac1 no glucosilado mediante transferencias Western con dos anticuerpos contra Rac1. Un anticuerpo reconoce ambas formas de Rac1 (23A8) y el otro (102) solo reconoce Rac1 no glucosilado. Como se ilustra en la Figura 22, para la toxina B, los niveles totales de Rac1 permanecieron sin cambios a lo largo del tiempo, estando la mayoría de Rac1 glucosilada. El tratamiento con la toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6), por otro lado, dio como resultado una reducción significativa de Rac1 total, sin embargo, Rac1 no estaba glucosilado en todos los puntos de tiempo. Esto muestra que el nivel de Rac1 se vio afectado negativamente por el tratamiento con la toxina mutante genética, pero no por la toxina wt. Como se ilustra en la Figura 22, el nivel de actina fue similar en las células tratadas con toxina y toxina B mutante genética y similar a las células tratadas de forma simulada en los puntos de tiempo indicados. Esto mostró que las toxinas mutantes genéticas ejercen citotoxicidad por un mecanismo que es diferente a la vía de glucosilación impulsada por toxinas de tipo silvestre.

Ejemplo 18: Tratamiento químico de toxinas mutantes genéticas

Aunque se prefieren que las toxinas mutantes modificadas genéticamente mostraran una reducción de 4 log en la actividad citotóxica, se consideró una reducción adicional (de 2 a 4 log) en la actividad citotóxica. Se han evaluado dos estrategias de inactivación química.

El primer procedimiento usa formaldehído y glicina para inactivar las toxinas mutantes. La inactivación con el formaldehído se produce al formar una base de Schiff (imina) entre el formaldehído y las aminas primarias en la proteína. Las bases de Schiff pueden entonces reaccionar con varios residuos de aminoácidos (Arg, His, Trp, Tyr, Gln, Asn) para formar entrecruzamientos intra o intermoleculares. Este entrecruzamiento fija la estructura de la proteína dejándola inactiva. Además, el formaldehído puede reaccionar con la glicina a partir de una base de Schiff. La base de Schiff glicilo puede entonces reaccionar con los residuos de aminoácidos para formar enlaces cruzados intermoleculares proteína-glicina. El formaldehído redujo la actividad citotóxica de las toxinas mutantes genéticas por debajo de los límites detectables (reducción de la citotoxicidad > 8 log₁₀ para la B triple mutante (SEQ ID NO: 6) y > 6 log₁₀ para la A triple mutante (SEQ ID NO: 4). Sin embargo se observó reversión a lo largo del tiempo cuando las toxinas triple mutantes inactivadas con formaldehído (IF) se incubaron a 25 °C. La reversión citotóxica se puede prevenir mediante la adición de una cantidad baja de formaldehído (0,01-0,02%) en la solución de almacenamiento de las toxinas triple mutantes-IF. Véase el Ejemplo 23.

Otro procedimiento usa el tratamiento con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS) para generar toxinas mutantes inactivadas. En este procedimiento, EDC/NHS reacciona con grupos carboxílicos en la proteína para formar ésteres activados. Los ésteres activados pueden entonces reaccionar con aminas primarias en la proteína para formar enlaces amida estables. Al igual que con la reacción del formaldehído,

esta reacción da como resultado enlaces cruzados intra e intermoleculares. El enlace amida formado por el tratamiento con EDC/NHS es más estable e irreversible que el enlace imina lábil formado por inactivación con formalina. Además de los entrecruzamientos formados por la reacción de ésteres activados con aminas primarias en el polipéptido, se pueden formar aductos de glicina y beta-alanina. Sin estar ligado por un mecanismo o teoría, los aductos de glicina se producen cuando se agrega glicina para inactivar los ésteres activados que no reaccionan. La amina de glicina reacciona con el éster activado del polipéptido para formar enlaces amida estables. Sin estar ligados a ningún mecanismo o teoría, los aductos de beta-alanina se forman por reacción de beta-alanina activada con aminas primarias en el polipéptido. Esta reacción da como resultado enlaces amida estables. La beta-alanina activada se produce mediante la reacción de tres moles de NHS con un mol de EDC.

Para lograr la reducción de 2-4 logaritmos de la actividad citotóxica en relación con las toxinas mutantes modificadas genéticamente (6-8 logaritmos, en relación con las toxinas nativas), las toxinas mutantes inactivadas químicamente deben tener valores de CE_{50} de $\geq 1.000 \mu\text{g/ml}$. Además de la reducción de la actividad citotóxica, sería ventajoso retener los epítomos clave según se determina mediante análisis de transferencia de puntos. Hasta la fecha, se han identificado varias condiciones de reacción que cumplen tanto los criterios de reducción de citotoxicidad como de reconocimiento de epítomos. Se han preparado varios lotes de toxinas mutantes inactivadas para estudios en animales y los datos analíticos de unos pocos lotes representativos se muestran en las Tablas 7A y 7B, Tabla 8A y 8B.

Tabla 7A: La toxina A mutante químicamente inactivada es segura y antigénica

Muestra #	Identificación de la muestra de toxina	Tratamiento	CE ₅₀ de ECP	Reducción en toxicidad	Reactividades contra los mAb
			$\mu\text{g/ml}$	Escala Log	
1	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	Formalina	>1.000	6,4	Media/alta
2	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44166-166	EDC	>1.000	6,4	Alta
3	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-170A	Formalina	>1.000	6,4	Baja
CONTROLES					
4	TcdA wt (de List Bio)	ninguno	390 pg/ml	1	Alta
5	TcdB wt (de List Bio)	ninguno	3,90 pg/ml	No aplicable	Ninguna
6	TcdA rMutante TM Genética L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	ninguno	12,5 $\mu\text{g/ml}$	4,5	Alta
7	Toxoide A List Bio	Formalina	No realizada	---	Baja

Tabla 7B: La toxina A mutante químicamente inactivada es segura y antigénica

Muestra #	Identificación de la muestra de toxina	Tratamiento	Reactividad con mAb (transferencia de puntos, condiciones no desnaturalizantes)					
			mAb#6 del extremo terminal N	mAb # 102 del dominio medio	Extremo terminal C (neutralizante)			
					A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
1	TcdA mutante (SEQID NO: 4) L44905-160A	Formalina	++	++	++++	++	++++	++++
2	TcdA mutante (SEQID NO: 4) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	TcdA mutante (SEQID NO: 4) L44905-170A	Formalina	+	+	++	++	++	+
CONTROLES								
4	TcdA wt (de List Bio)	ninguno	++++	+++	++++	++++	++++	++++
5	TcdB wt (de List Bio)	ninguno	-	-	-	-	-	-
6	TcdA rMutante TM Genética L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	ninguno	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	Toxoide A List Bio	Formalina	-	-	+	-	++	+

List = List Biologicals; ECP = ensayo de efecto citopático; CE_{50} = la concentración más baja en la que el 50% de las células muestran citotoxicidad; mAb = anticuerpos monoclonales; neut = neutralizante; ND = no realizada; TM = sitio activo y mutante de escisión ("triple mutante")

Tabla 8A: La toxina B mutante químicamente inactivada es segura y antigénica					
Muestra #	Identificación de la muestra de toxina	Tratamiento	CE ₅₀ de ECP	Reducción en toxicidad	Reactividades contra los mAb
			µg/ml	Escala Log	
1	TcdB mutante L44905-182 (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1.000	8,4	Media/alta
2	TcdB mutante L34346-38A (SEQ ID NO: 6)	EDC	>1.000	8,4	Alta
3	TcdB mutante L44905-170B (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1.000	8,4	Baja
CONTROLES					
4	TcdA wt (de List Bio)	ninguno	390 pg/ml	No aplicable	Ninguna
5	TcdB wt (de List Bio)	ninguno	3,90 pg/ml	1	Alta
6	Toxina B rMutante TM Genética (SEQ ID NO: 6) L34346-022	ninguno	69 ng/ml	4,2	Alta
7	Toxoide A List	Formalina	No realizada	---	Media

Tabla 8B: La toxina B mutante químicamente inactivada es segura y antigénica						
Muestra #	Identificación de la muestra de toxina	Tratamiento	Reactividad con mAb (transferencia de puntos, condiciones no desnaturalizantes)			
			aa 1-543 del extremo terminal N		aa 544-2366 del medio/extremo terminal C	
			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 (de List Bio)	ninguno	-	-	-	-
5	TcdB wt (de List Bio)	ninguno	++++	+++	++++	++++
6	TcdB rMutante TM Genética L34346-022 (SEQ ID NO: 6)	ninguno	++++	++++	++++	++++
7	Toxoide B List	Formalina	+++	+++	+++	+++

List = List Biologicals; ECP = ensayo de efecto citopático; CE₅₀ = la concentración en la que el 50% de las células muestran citotoxicidad; mAb = anticuerpos monoclonales; neut = neutralizante; ND = no realizada; TM = sitio activo y mutante de escisión ("triple mutante")

Ejemplo 19: Fermentación y purificación

5 Las fermentaciones se iniciaron a partir de una fuente congelada de un *Clostridium difficile* recombinante que incluye un promotor de fdx descrito anteriormente. Las reservas congeladas eran una suspensión celular preparada a una DO₆₀₀ = 2,0 y glicerol al 20%. Se inoculó un cultivo iniciador con 0,2 ml de la reserva de cultivo en 500 ml de medio SHYG10 (30 g/l de hidrolizado de soja SE50MK, 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, 10 g/l de glucosa, 15 mg/l de tiamfenicol, pH 7). El medio estaba contenido en una botella ventilada de 500 ml. La inoculación se realizó en una cabina de bioseguridad convencional, la botella se lavó abundantemente con nitrógeno y luego la botella se incubó en forma estática (ventilaciones cerradas) durante aproximadamente 16-18 horas a 37 °C en una incubadora convencional.

15 Se usó para la fase de fermentación un biorreactor de diez litros que contenía 8 litros de medio SHYG60 (30 g/l de hidrolizado de soja SE50MK, 20 g/l de extracto de levadura HY YEST 412, 60 g/l de glucosa, 15 mg/l de tiamfenicol, pH 7). El contenido de 500 ml de la botella de inóculo se inoculó en el fermentador que se hizo funcionar a 37 °C, 400 rpm (1,47 m/s) con burbujeo de nitrógeno de 0,1 vvm. El pH se controló a 7,0 mediante la autoadición de NaOH 5N. La fermentación se realizó típicamente durante ~24 horas para alcanzar la potencia máxima. El crecimiento durante el curso de la fermentación se controló mediante lecturas de DO₆₀₀. Las muestras tomadas para la cuantificación de la toxina mutante se centrifugaron a ~ 5000 xg y los sedimentos resultantes se congelaron a -70 °C. A continuación, el sedimento celular se descongeló y se resuspendió en un tampón que consistía en Tris 20 mM, NaCl 3 mM, EDTA 0,5 mM, pH 6,5 y se sonicó a una amplitud de 40 durante 20 segundos. El lisado celular resultante se centrifugó a 5.000 xg durante 10 min. El sobrenadante se combinó con tampón de carga y agente

reductor y se procesó en un gel PAGE de Tris-acetato al 3,8% a 150 voltios durante 50-55 min frente a estándares de toxina auténticos. El gel se tiñó durante la noche, luego se destiñó y se cuantificó en un densitómetro de barrido. Por lo general, se observaron valores de DO_{600} de ~ 10-12 con valores de toxina de 80-120 mg/l.

5 La siguiente tabla es un ejemplo de datos de fermentación para la toxina A mutante.

Tabla 63		
Tiempo de fermentación transcurrido (horas)	DO_{600}	Rendimiento de toxina (mg/l)
1	0,32	
3	1,16	
5	3,55	33
7	5,56	53
9	7,11	63
11	8,64	81
24	11,14	123

En la siguiente tabla se presenta un ejemplo de datos de fermentación para la toxina B mutante.

Tabla 64		
Tiempo de fermentación transcurrido (horas)	DO_{600}	Rendimiento de toxina (mg/l)
1	0,73	
3	1,18	
5	4,54	30
7	5,93	40
9	7,05	48
11	8,44	62
24	10,03	94

10 Se han ensayado modificaciones de la composición y procedimientos para cultivar la célula de *C. difficile* recombinante y/o la producción de toxinas mutantes y están dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, aunque SE50MK (y de forma diversa SE50MK-NK, ambos de Friesland-Campaign) fue la opción preferida para la fuente de nitrógeno, se identificaron una variedad de otros hidrolizados de soja de otros fabricantes que funcionaron bien en el proceso. Un medio de cultivo que incluye hidrolizado de soja en ausencia de extracto de levadura proporcionó un 30-40% del rendimiento esperado.

15 Se demostró que los extractos de levadura de fabricantes alternativos soportan rendimientos equivalentes. Un medio de cultivo que incluye extracto de levadura en ausencia de hidrolizado de soja proporcionó un 60-70% del rendimiento esperado.

20 El uso de un medio de cultivo basado en hidrolizado de soja/extracto de levadura, en ausencia de una fuente de carbono, produjo aproximadamente 2-3 DO_{600} y aproximadamente 10-15 mg/l de toxina. Aunque la glucosa fue una fuente de carbono preferida para el cultivo, se obtuvieron resultados equivalentes con manitol. Un cribado de fuentes de carbono en botellas indicó que *C. difficile* también puede utilizar fructosa y manosa, que también se esperaba que soporten un alto DO/rendimiento, en comparación con un medio de cultivo en ausencia de una fuente de carbono. Las siguientes fuentes de carbono no parecieron apoyar el crecimiento óptimo: arabinosa, xilosa, sacarosa, lactosa, maltosa, glicerol, ramnosa y galactosa.

30 Además, extender el tiempo de fermentación a 48 horas (requiriendo la adición de más glucosa) no pareció mejorar sustancialmente el rendimiento.

Además, la fermentación a pH 6,5 y 7,5 produjo rendimientos en el intervalo esperado de 80-120 mg/l. La fermentación a un pH más extremo (pH 6,0 u 8,0) todavía produjo los valores esperados de DO_{600} , pero redujo los rendimientos (40-60 mg/l) de toxina.

35 La fermentación usando un medio de cultivo en ausencia de tiamfenicol dio como resultado una pérdida de plásmido, por ejemplo, aproximadamente un 10-20% para un plásmido que codifica la toxina B mutante, y aproximadamente un 30-40% para un plásmido que codifica la toxina A mutante. Por consiguiente, fue factible la fermentación utilizando un medio de cultivo en ausencia de un derivado de cloranfenicol.

También se probaron modos alternativos de operar la fermentación y están dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, la fermentación se puede realizar a 400 rpm o menos y se puede usar una capa de nitrógeno, ambas técnicas se probaron y usaron con éxito.

- 5 Además, se probó un medio de anticuerpo monoclonal SFM4MAb y se demostró que proporciona aproximadamente 10 DO₆₀₀ de células y aproximadamente 40 mg/l de toxina mutante.

Por último, la adición de un ingrediente que contiene fosfato a la fermentación pareció reducir la producción de toxina, en comparación con el medio de cultivo en ausencia del ingrediente que contiene fosfato.

- 10 Al final de la fermentación, el fermentador se enfría. La suspensión de células se recupera mediante centrifugación continua y se resuspende en el tampón apropiado. La lisis de la suspensión celular se logra mediante homogeneización a alta presión. Para la toxina A mutante, el homogeneizado se flocula y la solución floculada se somete a centrifugación continua. Esta solución se filtra y luego se transfiere para su procesamiento posterior. Para la toxina B mutante, el homogeneizado se clarifica mediante centrifugación continua y luego se transfiere para su procesamiento posterior.

- 15 La toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) se purifica usando dos etapas cromatográficas seguidas de un intercambio de tampón final. El lisado clarificado se carga en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y la toxina mutante unida se eluye usando un gradiente de citrato de sodio. El conjunto de productos de la columna HIC se carga luego en una columna de intercambio catiónico (CEX) y la toxina A mutante unida se eluye usando un gradiente de cloruro de sodio. El conjunto de CEX que contiene la toxina A mutante purificada se intercambia en el tampón final mediante diafiltración. La toxina A mutante purificada se intercambia en el tampón intermedio de la sustancia farmacológica final mediante diafiltración. Después de la diafiltración, el retentato se filtra a través de un filtro de 0,2 micrómetros antes de la inactivación química hasta una sustancia farmacológica final. La concentración de proteína está dirigida a 1-3 mg/ml.

- 20 La toxina B mutante (SEQ ID NO: 6) se purifica usando dos etapas cromatográficas seguidas de un intercambio de tampón final. El lisado clarificado se carga en una columna de intercambio aniónico (AEX) y la toxina mutante unida se eluye usando un gradiente de cloruro de sodio. Se añade citrato de sodio al conjunto de productos de la columna AEX y se carga en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). La toxina mutante unida se eluye usando un gradiente de citrato de sodio. El conjunto de HIC que contiene polipéptido de toxina mutante purificado (SEQ ID NO: 6) se intercambia en el tampón final mediante diafiltración. La toxina B mutante purificada se intercambia en el tampón intermedio de sustancia farmacológica final mediante diafiltración. Después de la diafiltración, el retentato se filtra a través de un filtro de 0,2 micrómetros antes de la inactivación química hasta una sustancia farmacológica final. La concentración de proteína está dirigida a 1-3 mg/ml.

Ejemplo 20: Inactivación con formaldehído/glicina

- 40 Después de la purificación, las toxinas A y B mutantes genéticas (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) se inactivan durante 48 horas a 25 °C usando 40 mM (1,2 mg/ml) de formaldehído. La inactivación se lleva a cabo a pH 7,0 ± 0,5 en fosfato 10 mM, tampón de cloruro de sodio 150 mM que contiene glicina 40 mM (3 mg/ml). Se establece que el período de inactivación exceda tres veces el período necesario para la reducción de la CE₅₀ en las células IMR-90 a más de 1.000 µg/ml. Después de 48 horas, la actividad biológica se reduce de 7 a 8 log₁₀ con respecto a la toxina nativa. Después de la incubación de 48 horas, la toxina mutante inactivada se intercambia en el tampón de sustancia farmacológica final mediante diafiltración. Por ejemplo, utilizando un casete de ultrafiltración de acetato de celulosa regenerada de 100 kD, la toxina inactivada se concentra a 1-2 mg/ml y se intercambia con tampón.

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

- 50 Después de la purificación, las toxinas mutantes genéticas (SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6) se inactivan durante 2 horas a 25 °C usando 0,5 mg de EDC y 0,5 mg de NHS por mg de toxina A y B mutante genética purificada. (aproximadamente 2,6 mM y 4,4 mM respectivamente). La reacción se inactiva mediante la adición de glicina hasta una concentración final de 100 mM y las reacciones se incuban durante 2 horas más a 25 °C. La inactivación se lleva a cabo a pH 7,0 ± 0,5 en fosfato 10 mM, tampón de cloruro de sodio 150 mM. Se establece que el período de inactivación exceda tres veces el período necesario para la reducción de la CE₅₀ en las células IMR-90 a más de 1.000 µg/ml. Después de 2 horas, la actividad biológica se reduce de 7 a 8 log₁₀ con respecto a la toxina nativa. Después de la incubación de 4 horas, la toxina mutante inactivada se intercambia en el tampón de sustancia farmacológica final mediante diafiltración. Por ejemplo, utilizando un casete de ultrafiltración de acetato de celulosa regenerada de 100 kD, la toxina inactivada se concentra a 1-2 mg/ml y se intercambia con tampón.

- A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos, tal como se usan en la sección de Ejemplos, se refieren a una composición producida de acuerdo con la presente descripción en el Ejemplo 21: "Toxina triple mutante tratada con EDC/NHS"; "Toxina mutante inactivada con EDC"; "sustancia farmacológica de toxina [A/B] mutante"; "Toxina mutante con E1"; "Toxina triple mutante con EDC/NHS". Por ejemplo, los siguientes términos son sinónimos: "toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS"; "Toxina A mutante inactivada con EDC"; "sustancia farmacológica de

la toxina A mutante"; "Toxina A mutante con E1"; "Toxina A triple mutante con EDC/NHS". Como otro ejemplo, los siguientes términos son sinónimos: "toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS"; "Toxina B mutante inactivada con EDC"; "sustancia farmacológica de la toxina B mutante"; "Toxina B mutante con E1"; "Toxina B triple mutante con EDC/NHS".

La sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante se fabrican cada uno mediante un proceso por lotes, que incluye (1) la fermentación de una cepa de *C. difficile* negativa para la toxina (VPI 11186) que contiene un plásmido que codifica el respectivo polipéptido de la toxina triple mutante genética (en un medio que incluye hidrolizado de soja, extracto de levadura HY YEST^{MR} 412 (Sheffield Bioscience), glucosa y tiamfenicol), (2) purificación de la toxina mutante genética (el "el intermedio de la sustancia farmacológica") del lisado sin células utilizando procedimientos cromatográficos de intercambio iónico e interacción hidrófoba hasta una pureza al menos superior al 95%, (3) inactivación química mediante tratamiento con EDC/NHS seguido de inactivación/protección con glicina, y (4) intercambio en la matriz de tampón final.

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

Para optimizar la inactivación química de las toxinas mutantes genéticas, se realizó un diseño estadístico del experimento (DOE). Los factores examinados en el DOE incluyeron temperatura, concentración de formaldehído/glicina, concentración de EDC/NHS y tiempo (Tabla 9 y 10). Para controlar la pérdida de actividad biológica, se determinaron los valores de CE₅₀ en células IMR-90. Además, también se observó la morfología celular de las células IMR-90 en varios puntos de tiempo posteriores al tratamiento. Véase la Figura 9, que muestra la morfología a las 72 horas posteriores al tratamiento. Para determinar el efecto sobre la estructura de la proteína, se controló el reconocimiento del epítipo usando análisis de transferencia de puntos usando un panel de anticuerpos monoclonales generados contra diferentes dominios de la toxina.

Tabla 9: Parámetros probados en el DOE con Formaldehído/Glicina	
Parámetros	Intervalo probado
Tiempo (días)	1 a 14
Temperatura (°C)	4 a 37
Concentración de toxina (mg/ml)	1 a 1,25
Concentración de formaldehído (mM)	2 a 80
Concentración de glicina (mg/ml)	0 a 80

Tabla 10: Parámetros probados en el DOE con EDC/NHS	
Parámetros	Intervalo probado
Tiempo (horas)	1 a 4
Temperatura (°C)	25 a 35
Concentración de toxina (mg/ml)	1 a 1,25
EDC (mg/mg de toxina)	0,25 a 2,5
NHS (mg/mg de toxina)	0 a 2,5

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

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

En una realización alternativa, la reacción con EDC-NHS se inactivó mediante la adición de alanina, que inactivó suficientemente la reacción. El uso de alanina puede dar como resultado una modificación en la proteína de la toxina mutante que es similar a la modificación cuando la reacción se inactiva con glicina. Por ejemplo, la inactivación mediante la adición de alanina puede dar como resultado una fracción de alanina en una cadena lateral de una fracción de ácido glutámico y/o ácido aspártico de la toxina mutante. En otra realización alternativa, la reacción con EDC-NHS se inactivó mediante la adición de éster metílico de glicina, que inactivó suficientemente la reacción.

La producción de toxina A y toxina B de *C. difficile* triple mutante químicamente inactivas en condiciones optimizadas dio como resultado una reducción adicional de la citotoxicidad residual a un nivel indetectable (> 1.000 µg/ml, la concentración más alta probada mediante el ensayo de ECP), mientras retiene la antigenicidad medida por su reactividad con los anticuerpos neutralizantes específicos de la toxina. Los resultados mostrados en la Tabla 28 demuestran una reducción gradual de la citotoxicidad desde la toxina wt hasta las toxinas triple mutantes tratadas con EDC/NHS. El etiquetado de inmunofluorescencia confirmó que las toxinas triple mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6) y las sustancias farmacológicas de toxinas mutantes exhibieron una unión comparable a las células IMR-90, lo que

sugiere que la pérdida de citotoxicidad no se debió a una unión reducida a las células (datos no mostrados). En comparación con la sustancia farmacológica de la toxina A mutante, la sustancia farmacológica de la toxina B mutante logró una mayor reducción de la citotoxicidad, lo que es consistente con la potencia observada aproximadamente 600 veces mayor de TcdB en comparación con TcdA.

5

Tabla 28. Sumario de citotoxicidad

Toxina	Muestra	CE ₅₀	Veces que se reduce la citotoxicidad
A	TcdA (SEQ ID NO: 1)	1,6 ng/ml	1
	Toxina A triple mutante (SEQ ID NO:4)	12,5 mg/ml	7800
	Sustancia farmacológica de la toxina A mutante	>1.000 mg/ml	>625.000
B	TcdB (SEQ ID NO: 2)	2,5 pg/ml	1
	Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)	45 ng/ml	18.000
	Sustancia farmacológica de la toxina B mutante	>1.000 mg/ml	>400.000.000

También se evaluaron los resultados del ensayo de citotoxicidad para la toxina B mutante modificada por EDC solamente, o por EDC y sulfo-NHS. Véase la Tabla 29.

10

Tabla 29

Muestra	CE ₅₀ de Citotoxicidad, mg.ml ⁻¹ (ECP)	Comentario
TcdB TM (SEQ ID NO: 6), sin modificar	0,03	
TcdB TM-EDC 1, sin NHS	<0,97	Reaccionó solo con EDC
TcdB TM-EDC 2, sin NHS	<0,97	Preparación por duplicado
TcdB TM-EDC 3, sulfo-NHS (0,5x)	125	Reaccionó con EDC y sulfo-NHS
TcdB TM-EDC 4, sulfo-NHS (0,5x)	125	Preparación por duplicado
TcdB TM-EDC 3, sulfo-NHS (1,0x)	250	Reaccionó con EDC y sulfo-NHS
TcdB TM-EDC 4, sulfo-NHS (2,0x)	750	Reaccionó con EDC y sulfo-NHS

Condiciones: La toxina B triple mutante ("TcdB TM") (SEQ ID NO: 6) se modificó en las proporciones en peso de toxina B mutante: EDC: sulfo-NHS = 1:0,5:0,94. Esta relación es el equivalente molar (corregido para un PM más alto de sulfo-NHS) con respecto a la reacción estándar con EDC/NHS como se describe en el Ejemplo 21. Para determinar el efecto de sulfo-NHS, la relación de sulfo-NHS se varió de 0,5x a 2x la relación estándar. Se realizaron reacciones por duplicado en 1 x PBS pH 7,0 a 25 °C y se iniciaron mediante la adición de solución de EDC. Después de 2 horas, las reacciones se inactivaron mediante la adición de glicina 1 M pH 7,0 (concentración final 0,1 M) y se incubaron durante 2 horas más. Las reacciones inactivadas se desalaron y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante ("TcdB TM-EDC") se concentró utilizando dispositivos Vivaspin 20, se filtró de forma estéril en viales estériles y se sometió a evaluación en un ensayo de citotoxicidad.

15

20

A la misma relación molar, sulfo-NHS redujo la CE₅₀ a aproximadamente 250 µg/ml en comparación con >1.000 µg/ml para NHS. Incluso al doble de la relación molar, sulfo-NHS no parece ser tan efectiva como NHS para disminuir la citotoxicidad. Véase la Tabla 30.

25

Tabla 30

Modificación	Digestión de referencia (TcdB EDC 004)	Digestión de control con NHS (TcdB EDC 001)	Digestión de la muestra con sulfo-NHS
aducto de glicina (+57 da)	49	29	35
beta-alanina (+71 da)	24	19	0
entrecruzamientos (-18 da)	7	4	3
deshidroalanina (-34 da)	6	5	4
Sin modificar	273	195	217

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

30

Se inactivó la toxina B de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) usando el protocolo estándar (véase el Ejemplo 21); toxina B: EDC:NHS 1:0,5:0,5, 25 °C durante 2 horas en 1 x PBS pH 7,0, luego se inactivó con glicina 1 M (concentración final 0,1 M) y se incubó durante 2 horas más. La muestra fue desalada, concentrada y sometida a un ensayo de citotoxicidad. La CE₅₀ para estas muestras fue <244 ng/ml.

35

Ejemplo 23: Estudios de reversión

40

Para determinar si se produce la reversión con las toxinas mutantes de *C. difficile* inactivadas con formaldehído/glicina o con EDC/NHS, se incubaron muestras de toxinas mutantes inactivadas (1 mg/ml) a 25 °C durante cinco a seis semanas. Se retiraron alícuotas cada semana y se determinaron los valores de CE₅₀ en células IMR-90. Una muestra inactivada con formaldehído/glicina no contenía formaldehído y una muestra contenía formaldehído al 0,01%. La CE₅₀ se midió mediante el ensayo de ECP.

Tabla 11: Resultados del estudio de reversión de TcdA inactivada			
Tiempo de incubación (Días)	CE ₅₀ (ensayo con células IMR-90)		
	Inactivado con formalina		EDC/NHS
	Sin formaldehído	formaldehído al 0,01%	
0	1000 µg/ml	1.000 µg/ml	1.000 µg/ml
7	740 µg/ml	ND	1.000 µg/ml
14	493 µg/ml	1.000 µg/ml	1.000 µg/ml
21	395 µg/ml	ND	1.000 µg/ml
28	395 µg/ml	1.000 µg/ml	1.000 µg/ml
35	326 µg/M	ND	ND

A 25 °C en ausencia de formaldehído residual, se observa una reversión parcial (Tabla 11). Después de cinco semanas, la actividad citotóxica aumentó aproximadamente 3 veces. Aunque la actividad citotóxica aumentó, después de cinco semanas todavía había una reducción de 7 log₁₀ con respecto a la toxina nativa. La reversión se evitó por completo mediante la inclusión de formalina a una concentración de 0,010%. No se observó reversión en la muestra inactivada con EDC/NHS. Durante las 6 semanas de incubación, los valores de CE₅₀ se mantuvieron en el nivel inicial de >1.000 µg/ml para los cuatro lotes de toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) y toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 6). Por el contrario, los valores de CE₅₀ de la toxina A triple mutante tratada con FI (SEQ ID NO: 4) y la toxina B triple mutante tratada con FI (SEQ ID NO: 6) no fueron estables y disminuyeron a valores de CE₅₀ inaceptablemente bajos, lo que indica un aumento de la citotoxicidad o reversión de la inactivación. Véase la Tabla 11.

Además de reducir de manera estable la citotoxicidad a un nivel indetectable (> 1.000 µg/ml, medido por el ensayo de ECP), las toxinas mutantes inactivadas usando EDC/NHS retuvieron epítomos importantes que son dianas de mAb neutralizantes de toxinas. Véase la Tabla 31. Las toxinas mutantes con FI mostraron una pérdida de los mismos determinantes antigénicos.

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

Muestra	CE ₅₀	Reducción de la citotoxicidad con respecto a la toxina wt (log ₁₀) ^a	mAb ^d neutralizantes de unión máxima (R _{máx.}) ^b		
			1 ^c	2	3
A triple mutante (SEQ ID NO: 4)	12,5 µg/ml	4,5	100	100	100
A triple mutante con FI	>1.000 µg/ml	>6,4	55	59	53
A triple mutante con EDC/NHS	>1.000 µg/ml	>6,4	90	94	103
B triple mutante (SEQ ID NO: 6)	69 ng/ml	4,3	100	100	100
B triple mutante con FI	>1.000 µg/ml	8,4	67	67	36
B triple mutante con EDC/NHS	>1.000 µg/ml	8,4	87	78	73

a Se midió la citotoxicidad utilizando el ensayo de ECP en células IMR-90.

b Valores determinados por análisis Biacore^{MR} usando múltiples mAbs neutralizantes dirigidos a varios epítomos de toxinas que no se superponen

c Los valores son promedios de dos experimentos.

d Para las primeras tres filas, los mAb neutralizantes "1", "2", "3" se refieren a los mAb A60-22, A80-29 y A65-33 para la toxina A, respectivamente.

Para las tres filas inferiores, los mAb neutralizantes "1", "2", "3" se refieren a los mAb B8-26, B59-3 y B-56-15 para la toxina B, respectivamente.

Ejemplo 24: Estudios preclínicos de inmunogenicidad

Los objetivos preclínicos clave incluyen probar composiciones que incluyen toxinas A y B mutantes de *C. difficile* en animales pequeños y primates no humanos (NHP). Se inmunizaron ratones y hámsteres para determinar, entre otras cosas, si las composiciones de *C. difficile* son capaces de provocar anticuerpos neutralizantes contra las toxinas A y

B mutantes. Los antígenos se probaron para la inducción de respuestas de anticuerpos de neutralización en suero después de una serie de inmunizaciones en ratones, hámsteres y macacos *Cynomolgus*. Las toxinas mutantes genéticas y/o químicamente inactivadas se formularon en tampón neutro, tampón de fosfato de aluminio o tampón que contenía ISCOMATRIX como adyuvante en algunas realizaciones. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes se probaron generalmente alrededor de dos a cuatro semanas después de cada refuerzo o la dosis final.

El ensayo de neutralización de toxinas demuestra la capacidad de un antisuero para neutralizar el efecto citotóxico mediado por TcdA o TcdB de *C. difficile* y, por lo tanto, es capaz de medir la actividad funcional de los anticuerpos que están presentes en una muestra. Se realizó un ensayo de neutralización de toxinas en una línea celular de fibroblastos de pulmón humano, IMR-90, que es sensible tanto a TcdA como a TcdB. En resumen, se sembró una placa de microtitulación de 96 pocillos con células IMR-90 que sirven como diana de la citotoxicidad mediada por toxinas. Cada muestra de suero de prueba se analizó por separado para determinar la capacidad para neutralizar TcdA y TcdB. Se mezclaron diluciones en serie apropiadas de antisueros de prueba con concentraciones fijas de TcdA o TcdB y se incubaron a 37 °C durante 90 minutos en una incubadora humidificada (37 °C/5% CO₂) para permitir que ocurriera la neutralización de las toxinas. Para el control de calidad, todas las placas incluyeron un patrón de referencia y controles que incluyen anticuerpos antitoxina de título conocido. Después de 90 minutos, se añadió la mezcla de toxina-antisuero a la monocapa de células IMR-90 y las placas se incubaron durante 72 horas más. Posteriormente, se añadió el sustrato CellTiter-Glo® a la placa de ensayo para determinar los niveles de trifosfato de adenosina (ATP) presentes en las células metabólicamente activas y se midió como unidades relativas de luminiscencia (URL). Un alto nivel de ATP indica una alta viabilidad celular y los niveles son directamente proporcionales a la cantidad de neutralización de la toxina por el anticuerpo presente en la muestra. Para los datos preclínicos, los datos de URL se representaron frente al valor de dilución de la muestra de antisueros de prueba para generar una curva de ajuste de respuesta de regresión logística de cuatro parámetros (4-PL). Los títulos de neutralización se expresaron como el valor de dilución de la muestra que exhibió una reducción del 50% en la citotoxicidad.

Ejemplo 25: Estudio de inmunogenicidad en ratones: muC. *difficile*2010-06

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

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

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

Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Vía	Programación
1	Toxina B ^a mutante inactivada con formalina en AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8
2	Toxina B mutante inactivada forma 2 ^b en AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8
3	Toxina B mutante genética inactivada sin adyuvante	10 µg	10	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8
4	Toxina B mutante genética inactivada en AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8
^a inactivación química = tratado con formalina/glicina a 10 °C durante 7 días					
^b inactivación química = tratado con EDC/NHS, 30 °C durante 2 horas					
^c concentración de iones de aluminio = 0,5 mg/ml					

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

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

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

Ejemplo 26: Estudio de inmunogenicidad en ratones: muC. *difficile*2010-07:

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

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

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

Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Grupo	Programación
1	Toxina B mutante inactivada con formalina ^a (SEQ ID NO: 6) en AIPO4 ^c	10 µg	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12
2	Toxina B mutante inactivada con EDC ^b (SEQ ID NO: 6) en AIPO4 ^c	10 µg	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12
3	Toxina A mutante inactivada con formalina (SEQ ID NO: 4) forma 1 en AIPO4 ^c	10 µg g	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12
4	Toxina A mutante inactivada con EDC (SEQ ID NO: 4) en AIPO4 ^c	10 µg	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12
5	Toxinas A + B mutantes inactivadas con formalina en AIPO4 ^c	10 µg cada una	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12

^a Tratamiento con formalina = tratados con formalina/glicina durante 2 días a 25 °C; la toxina mutante no fue citotóxica y retuvo la unión a todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante analizados.
^b tratamiento con EDC = tratados con EDC/NHS durante 4 horas a 30 °C; la toxina mutante no fue citotóxica y retuvo la unión a todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante analizados.
^c concentración de iones aluminio = 0,5 mg/ml

- 10 Resultados: No hubo eventos adversos en los ratones después de cada administración de los candidatos a vacuna. Como se ilustra en la Figura 11, después de dos dosis de toxinas mutantes genéticas inactivadas químicamente, los anticuerpos neutralizantes antitoxina A (Grupos 3-5) se reforzaron a títulos entre 3 y 4-log₁₀ mientras que los anticuerpos neutralizantes antitoxina B (Grupos 1-2, 5) permanecieron bajos a indetectables, lo que es consistente con los datos del estudio con ratones descritos anteriormente (Figura 10). Los anticuerpos neutralizantes antitoxina B aumentaron hasta 2-3 log₁₀ en los grupos 1, 2 y 5 después de la tercera dosis (títulos de la semana 12) y alcanzaron su pico dos semanas después de la cuarta dosis (títulos de la semana 14). Los títulos de anticuerpos neutralizantes antitoxina A en los grupos 3-5 aumentaron ligeramente después de la tercera (títulos de la semana 12) y la cuarta inmunización (títulos de la semana 14).

20 **Ejemplo 27: Estudio de inmunogenicidad con hámsteres: hamC. difficile2010-02:**

- El propósito de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad y el potencial protector de las toxinas A y B mutantes triple mutantes y químicamente inactivadas de *C. difficile* en el modelo de hámster dorado sirio. El modelo de hámster dorado sirio representa el mejor modelo de desafío disponible para simular CDAD humana. Los mismos lotes de toxinas A y B mutantes usados en el estudio con ratones muC. difficile2010-07 se utilizaron en este estudio. Como control, se le administraron a un grupo toxinas mutantes sin adyuvante que contenía aluminio.

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

30 Tabla 14. Ensayo de toxinas A y B mutantes químicamente inactivadas (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) en hámsteres (hamC. difficile2010-02)

Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Vía	Programación
1	Toxinas A + B mutantes inactivadas con formalina ^a (SEQ ID NOs: 4 y 6) en AIPO4 ^c	10 µg cada una	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12
2	Toxinas A + B mutantes inactivadas con formalina (SEQ ID NOs: 4 y 6) en PBS (sin adyuvante)	10 µg cada una	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12
3	Toxinas A + B mutantes inactivadas con EDC ^b (SEQ ID NOs: 4 y 6) en AIPO4 ^c	10 µg cada una	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12

(continuación)

Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Vía	Programación
4	Toxoide List Biological en AIPO ₄ ^c	10 µg cada una	5	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 4, 8, 12

^a Tratamiento con formalina = tratados con formalina/glicina durante 2 días a 25 °C; la toxina mutante no fue citotóxica y retuvo la unión a todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante probada

^b tratamiento con EDC = tratamiento con EDC/NHS durante 4 horas a 30 °C; la toxina mutante no fue citotóxica y retuvo la unión a todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante probada

^c concentración de iones de aluminio = 0,5 mg/ml

1. Animales: 15 hámsteres dorados sirios, hembra, de 6 a 8 semanas de edad/100-130 g cada uno.

2. Vacunación: IM, 0,05 ml cada uno, de acuerdo con la programación anterior. Los toxoides serán proporcionados por Process Development y serán formulados en diluyente de AIPO₄ por grupos de formulaciones. El grupo 2 servirá como grupo de control sin adyuvante.

3. Sangrado: Se sangrará a todos los hámsteres en las semanas 0, 4, 8 y 12, justo antes de cada inmunización.

4. Análisis de la muestra de suero: ensayo de neutralización.

Resultados: No se observaron eventos adversos después de la inmunización con las toxinas mutantes. Como se ilustra en la Figura 12, después de una dosis única de toxinas mutantes, las respuestas de neutralización de la antitoxina A estuvieron entre 2-3 log₁₀ para las toxinas mutantes inactivadas con formalina (Grupos 1-2) y entre 3-4 log₁₀ para las toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 3). Después de la segunda dosis, los anticuerpos antitoxina A aumentaron en los tres grupos. Los anticuerpos antitoxina A en los tres grupos no parecieron aumentar después de la tercera dosis. Se observó un resultado similar después de la cuarta inmunización, en el que se observó un aumento en el título en el grupo inactivado con formalina que no contenía el adyuvante de aluminio (Grupo 2).

Las respuestas de neutralización de antitoxina B fueron indetectables en los grupos de toxinas mutantes inactivadas con formalina (Grupos 1-2) y fueron un poco más de 2 log₁₀ para las toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 3) después de una dosis única. Después de la segunda dosis, los títulos de anticuerpos neutralizantes antitoxina B en los dos grupos inactivados con formalina (Grupos 1-2) aumentaron a 3-4 log₁₀ mientras que los del grupo inactivado con EDC (Grupo 3) aumentaron a 4-5 log₁₀. Para los tres grupos, se observaron aumentos en los títulos de anticuerpos neutralizantes antitoxina B después de la tercera y/o cuarta dosis, y todos los grupos alcanzaron un título máximo en la semana 16 (después de la última dosis). Véase la Figura 12.

En la Figura 13, el nivel de respuestas de anticuerpos neutralizantes contra toxinas mutantes genéticas inactivadas químicamente (Figura 12) se comparó con aquellas obtenidas por toxoides de List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, California) (también denominado en el presente documento "List Bio" o "List Biologicals") (es decir, los toxoides adquiridos a través de List Biological Laboratories se prepararon mediante inactivación con formalina de toxinas de tipo silvestre; reactivo de control usado para establecer el modelo de exposición del hámster).

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

Los datos de la Figura 13 muestran que, en hámsteres a los que se les administró de acuerdo con la Tabla 14, los respectivos títulos de anticuerpos neutralizantes contra la toxina A (Figura 13A) y la toxina B (Figura 13B) inducidos por la composición inmunogénica que incluyen toxinas mutantes inactivadas con EDC después de dos dosis es superior a los respectivos títulos de anticuerpos neutralizantes provocados por los toxoides de List Biologicals.

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

Para evaluar la eficacia protectora de las toxinas mutantes, a los hámsteres inmunizados, junto con un grupo de control de animales no inmunizados, se les administró primero una dosis oral del antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para alterar la flora intestinal normal. Después de cinco días, los hámsteres se expusieron a una dosis oral de esporas de *C. difficile* de tipo silvestre (cepa 630, 100 ufc por animal). Los animales se controlaron diariamente durante once días después de la exposición para detectar signos de CDAD, que en los hámsteres se conoce como cola húmeda. Utilizando un sistema de puntuación clínica de varios parámetros diferentes, los animales que se determinó que tenían DACD grave se sacrificaron. Los parámetros incluían actividad después de la estimulación, deshidratación, excrementos, temperatura y peso, etc., que son conocidos en la técnica.

El día 11, se terminó el estudio y todos los animales supervivientes se sacrificaron. La Figura 14 muestra las curvas de supervivencia para cada uno de los tres grupos inmunizados (Grupos 1-3, de acuerdo con la Tabla 14) en comparación con los controles no inmunizados. Como se puede observar, todos los animales no inmunizados desarrollaron CDAD grave y requirieron eutanasia entre los días 1-3 después de la exposición (0% de

supervivencia). Ambos grupos administrados con toxina mutante inactivada con formalina tuvieron curvas de supervivencia del 60%, y los animales no requirieron eutanasia hasta el día 3 (Grupo 1) o el día 4 (Grupo 2). El grupo al que se administró la toxina mutante inactivada con EDC tuvo una curva de supervivencia del 80%, con 1 animal (de 5) que requirieron eutanasia el día 7. Por consiguiente, los hámsteres se protegieron del desafío letal con esporas de *C. difficile*.

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

El propósito de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad de las toxinas A y B mutantes triple mutante y químicamente inactivadas de *C. difficile* sin adyuvante (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) en el modelo de hámster dorado sirio. Los mismos lotes de toxinas A y B mutantes (SEQ ID NO: 4 y 6, respectivamente) usadas en el estudio con ratones muC. *difficile*2010-07 se utilizaron en este estudio. Como control, un grupo (Grupo 1) recibió una solución salina tamponada con fosfato como placebo.

Se inmunizaron grupos de cinco o diez hámsteres dorados sirios con un inmunógeno de acuerdo con la Tabla 15. Los animales recibieron tres dosis. Además, los animales recibieron dosis cada dos semanas.

Tabla 15: Diseño experimental de inmunización y desafío de hámsteres					
Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Vía	programación
1	Placebo (tampón de PBS)	NA	5	NA	
2	Toxina A+B mutante (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente); inactivada con formalina	10 µg cada una	10	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4
3	Toxina A+B mutante (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente); inactivada con EDC	10 µg cada una	10	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4
4	Toxina A+B mutante (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente); genética	10 µg cada una	10	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4

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

Los anticuerpos neutralizantes antitoxina B fueron detectables después de la segunda dosis, en la que los anticuerpos neutralizantes antitoxina B inactivados con formalina (Grupo 2) e inactivados con EDC (Grupo 3) aumentaron entre 3-4 log₁₀ y entre 2 -3 log₁₀ para el triple mutante genético (Grupo 4). Después de la tercera inmunización (semana 4), los títulos de anticuerpos neutralizantes antitoxina B aumentaron hasta entre 3-4 log₁₀ para las toxinas mutantes inactivadas con formalina (Grupo 2) y las toxinas mutantes genéticas (Grupo 4) y entre 4-5 log₁₀ para las toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 3).

Para los anticuerpos neutralizantes tanto antitoxina A como antitoxina B, se observaron títulos máximos en la semana 6 (posteriores a la dosis 3) para todos los grupos vacunados (Grupos 2-4).

Evaluación de composiciones inmunogénicas adyuvadas con Alhydrogel/CpG o ISCOMATRIX

Los hámsteres inmunizados con una composición inmunogénica que incluye una toxina mutante químicamente inactivada formulada con Alhydrogel, ISCOMATRIX o Alhydrogel/CpG24555 (Alh/CpG) desarrollaron antiseros antitoxina neutralizantes robustos. Se observó que las respuestas máximas de antitoxina A y antitoxina B fueron 2-3 veces más altas y estadísticamente significativas en los grupos inmunizados con toxinas mutantes formuladas en Alh/CpG o ISCOMATRIX en comparación con la vacuna formulada con Alhydrogel solamente. Véase la Tabla 32 que muestra los títulos de neutralización al 50%. Los hámsteres (n = 10/grupo) se inmunizaron IM a las 0, 2 y 4 semanas con 10 µg de cada fármaco de toxina A mutante y de fármaco de toxina B mutante formulado con 100 µg de Alhydrogel, o 200 µg de CpG 24555 + 100 µg de Alhydrogel, o 10 U de ISCOMATRIX. Se recogieron sueros en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de toxinas para determinar la actividad antitoxina funcional. Los títulos medios geométricos se proporcionan en la Tabla 32. Los asteriscos (*) indican significancia estadística (p <0,05) cuando se comparan con los títulos en el grupo de Alhydrogel.

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

Se ensayó la eficacia protectora de la composición inmunogénica que incluye sustancias farmacológicas de toxinas mutantes formuladas con estos adyuvantes. Se inmunizaron hámsteres y se les administró clindamicina oral (30 mg/kg) en la semana 5 y se los expuso de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Un grupo de hámsteres no inmunizados (n = 5) se incluyó como control. Se observó una mayor eficacia en hámsteres inmunizados con sustancias farmacológicas de toxina mutante adyuvadas con Alh/CpG o ISCOMATRIX (100% de supervivencia) en comparación con solo Alhydrogel (70% de supervivencia). Por consiguiente, los hámsteres se protegieron del desafío letal con esporas de *C. difficile*.

Ejemplo 30: Vacunación contra *Clostridium difficile* en macacos *Cynomolgus*

El propósito de este estudio fue probar la inmunogenicidad de dosis bajas y altas de toxinas mutantes de *C. difficile* inactivadas con EDC e inactivadas con formalina en macacos *Cynomolgus*. Todas las toxinas mutantes se formularon en ISCOMATRIX® como adyuvante excepto un grupo, que sirvió como control sin adyuvante (Grupo 5).

Tabla 16: Inmunización de macacos <i>Cynomolgus</i>					
Grupo	Inmunógeno	Número	Dosis	Vía	Programación
1	Toxinas A + B mutantes con FI (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada una	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4
2	Toxinas A + B mutantes con FI (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada una	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4
3	Toxinas A + B mutantes con EI (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada una	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4
4	Toxinas A + B mutantes con EI (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada una	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4
5	toxinas A + B mutantes con EI (sin adyuvante)	5	100 µg cada una	IM	Principal semana 0, refuerzo semanas 2, 4

Animales: 25 macacos *Cynomolgus*. El asterisco, "***", en la Figura 16 se refiere a tener solo 4 *Cynomolgus* en el grupo durante la semana 12, un *Cynomolgus* en el grupo fue sangrado terminalmente a las 8 semanas. Vacunación: IM, 0,5 ml por dosis, en las semanas 0, 2 y 4. Se prepararon composiciones de toxinas mutantes como se describió anteriormente. Las composiciones de toxina mutante se formularon en ISCOMATRIX, excepto que el Grupo 5 se formuló en tampón sin adyuvante. Sangrado: Semanas -2, 0, 2, 3, 4, 6, 8 y 12. Eutanasia y sangrado terminal en animales con los títulos más altos de *C. difficile* en la semana 8. Análisis de muestra de suero: ELISA de proteínas y ensayos de neutralización

Resultados: La Figura 16 muestra las respuestas de anticuerpos neutralizantes antitoxina en estos animales en las semanas 0, 2, 3, 4, 6, 8 y 12. Los títulos de antitoxina A estaban entre 2-3 log₁₀ para los cinco grupos después de una dosis única (títulos de la semana 2). Estos títulos aumentaron después de cada dosis posterior para cada grupo. En estos animales, no hubo caída en el título entre las semanas 3 y 4. Para todos los grupos, los títulos máximos estuvieron entre 4-5 log₁₀. En todos los puntos de tiempo, el grupo sin adyuvante ISCOMATRIX (Grupo 5) tuvo los títulos más bajos, lo que indica la utilidad de ISCOMATRIX para estimular las respuestas inmunitarias. El grupo de control sin adyuvante (Grupo 5) alcanzó títulos máximos en la semana 12, al igual que el grupo inmunizado con la dosis alta de toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 4); todos los demás grupos alcanzaron títulos máximos en la semana 6, dos semanas después de la última dosis. Los títulos en todos los grupos aumentaron después de la segunda dosis (punto de tiempo en la semana 3). Al igual que con las respuestas antitoxina A, las respuestas antitoxina B no disminuyeron de la semana 3 a la semana 4. Después de la tercera dosis (punto de tiempo en la semana 6), los títulos de anticuerpos neutralizantes antitoxina B en todos los grupos estuvieron entre 3 -4 log₁₀, excepto en el grupo inactivado con formalina de dosis baja (Grupo 1) y el grupo inactivado con EDC de dosis alta (Grupo 4), los cuales tenían títulos apenas > 4 log₁₀. Los títulos máximos se observaron en la semana 12 para todos los grupos excepto el grupo inactivado con EDC de dosis baja (Grupo 3), que tuvo títulos máximos en la semana 8. Todos los grupos tuvieron títulos máximos > 4 log₁₀.

Ejemplo 31: Producción de anticuerpos monoclonales

Aunque las toxinas A y B comparten mucha homología estructural, se encontró que las actividades neutralizantes de los anticuerpos eran específicas de la toxina. En esta divulgación, se identificaron varios anticuerpos que son específicos de una toxina individual y están dirigidos a varios epítomos y dominios funcionales, y tienen una alta afinidad y una potente actividad neutralizante hacia las toxinas nativas. Se aislaron anticuerpos de ratones que se inmunizaron con una toxina mutante inactivada con formalina (FI) disponible comercialmente o una toxina holomutante recombinante (SEQ ID NOs: 4 y 6) que se volvió no tóxica mediante la introducción de mutaciones específicas en su sitio catalítico para producir mAb de la toxina A y B, respectivamente. El mapeo de epítomos de los anticuerpos mostró que la gran mayoría de mAb contra la toxina A (49 de 52) estaban dirigidos al dominio no catalítico del extremo terminal C de la toxina.

Los monoclonales contra la toxina B se dirigieron a tres dominios de la proteína. De un total de 17 mAb específicos de la toxina B, 6 eran específicos para el extremo terminal N (por ejemplo, los aminoácidos 1-543 de una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*, tal como 630), 6 del extremo terminal C (por ejemplo, los aminoácidos 1.834-2.366 de una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*, tal como 630) y 5 para el dominio de translocación media (por ejemplo, los aminoácidos 799-1.833 de una TcdB de tipo silvestre de *C. difficile*, tal como 630). El enfoque de usar toxinas mutantes de *C. difficile* (por ejemplo, las SEQ ID NOs: 4 y 6) como antígenos inmunizantes ofrece, por lo tanto, una ventaja clave de presentar la mayoría, si no todos, los epítomos antigénicos en comparación con el proceso de inactivación con formalina que tienden a afectar adversamente la estructura antigénica de la toxina mutante.

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

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

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

Ejemplo 33: Capacidad de neutralización y mapeo de epítomos de anticuerpos específicos de toxinas

Además, en un esfuerzo por identificar anticuerpos funcionales/neutralizantes, se evaluó la capacidad de todos los monoclonales para neutralizar las toxinas de tipo silvestre en un ensayo de efecto citopático (ECP) estándar o en un ensayo más riguroso y cuantitativo basado en la medición de ATP como indicador de viabilidad celular.

De un total de 52 anticuerpos específicos de la toxina A, cuatro mAb (A3-25, A65-33, A60-22 y A80-29 (Tabla 17 y Figura 18) exhibieron niveles variados de actividad neutralizante. Se realizaron ensayos de unión competitiva BiaCore y de inhibición de la hemaglutinación (HI) para mapear los epítomos de anticuerpos. Los resultados indicaron que estos anticuerpos pueden dirigirse a diferentes epítomos de la proteína de la toxina A (Tabla 17). Para identificar aún más la ubicación de los sitios de unión en la proteína, los anticuerpos se evaluaron individualmente en ensayos de transferencia Western o de transferencia de puntos usando fragmentos de toxina de secuencias conocidas. Se encontró que los 4 mAb neutralizantes estaban dirigidos a la región del extremo terminal C de la toxina.

De un total de 17 anticuerpos específicos de la toxina B, se encontró que 9 eran neutralizantes. De los nueve mAb neutralizantes, seis de ellos se dirigieron al extremo terminal N y los otros tres al dominio de translocación de la toxina B (Tabla 18). De acuerdo con el ensayo de unión competitiva de Biacore, los nueve anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden agruparse en cuatro grupos de epítomos como se muestra en la Figura 19.

TABLA 17: Características de mAb de la toxina A seleccionada

Grupo de epítomos (Biacore)	mAb #	Actividad neutralizante	Inhibición de hemaglutinación	Especificidad de unión	Isotipo de Ig
1	A3-25	+	-	Extremo terminal C	IgE, κ
2	A65-33	+	-	Extremo terminal C	IgG2a, κ
3	A80-29	+	+	Extremo terminal C	IgG1, κ
ND	A60-22	+	+	Extremo terminal C	IgG1, κ

(continuación)

Grupo de epítomos (Biacore)	mAb #	Actividad neutralizante	Inhibición de hemaglutinación	Especificidad de unión	Isotipo de Ig
4	A64-6	-	-	En progreso	IgG1, κ
	A50-10	-	-	Extremo terminal C	IgG1, κ
	A56-33	-	-	En progreso	IgG1, κ
ND	A1	-	-	Extremo terminal N	IgG1, κ

TABLA 18: Características de mAb de la toxina B seleccionada

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

5 **Ejemplo 34:** Identificación de combinaciones novedosas de anticuerpos de la toxina A con actividad neutralizante significativamente mejorada

Los cuatro mAb de la toxina A (A3-25, A65-33, A60-22 y A80-29) mostraron una neutralización parcial o incompleta de la toxina A cuando se ensayaron individualmente en el ensayo de neutralización basado en ATP. El mAb A3-25 fue el anticuerpo más potente y los otros tres fueron menos neutralizantes con A80-29 apenas por encima del fondo (Figura 18). Sin embargo, cuando A3-25 se combinó con cualquiera de los otros tres mAb, se observó un efecto sinérgico en la neutralización en las tres combinaciones que fue mucho mayor que la suma total de neutralización de anticuerpos individuales como se muestra en la Figura 20A-C. Además, las tres combinaciones exhibieron una capacidad de neutralización completa normalmente observada con anticuerpos policlonales antitoxina A.

15 **Ejemplo 35:** Identificación de combinaciones novedosas de anticuerpos de la toxina B que muestran una actividad neutralizante significativamente mejorada

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

Tabla 19: Neutralización de la Toxina B con mAb		
mAb	Título con neutralización de ATP del ECP	
Solamente B8-26	20.480	5.000
Solamente B59-3	320	120
Solamente B60-2	320	80
B8-26 + B59-3	655.360	~ 60.000
B8-26 + B60-2	327.680	nd
nd, no se realizó		

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

Ejemplo 36: Cribado *in vitro* por mAb para composiciones de toxinas mutantes seguras y eficaces

30 Las toxinas A y B mutantes genéticas de *C. difficile* (por ejemplo, SEQ ID NOs: 4 y 6) generadas mediante ingeniería genética mostraron citotoxicidad residual usando un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Aunque se ha logrado una

reducción logarítmica de ~ 4 en la citotoxicidad para cada toxina mutante de *C. difficile* (Tabla 20), se prefirió la inactivación química adicional de las toxinas mutantes, tal como con el tratamiento con formalina. Sin embargo, los tratamientos de inactivación química pueden ser duros y pueden afectar adversamente los epítomos antigénicos clave de estas toxinas o toxinas mutantes.

5

Tabla 20: Una comparación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de la toxina wt, la toxina triple mutante y las toxinas wt inactivadas con formalina (FI, de List Biological) (List Biological, comercial)			
Tcd	Fuente/tratamiento	CE ₅₀ ng/ml	Veces que se reduce la citotoxicidad
TcdA			
Toxina A (SEQ ID NO: 1)	wt	0,92	1
Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4)	Triple mutante	8.600	9.348
Toxoide A (FI)	Tratada con formalina, comercial	>20.000	>21.739
TcdB			
Toxina B (SEQ ID NO: 2)	wt	0,009	1
Toxina B mutante (SEQ ID NO: 6)	Triple mutante	74	8.222
Toxoide B (FI)	Tratada con formalina, comercial	4.300	477.778

Para la optimización del bioproceso, se realizó un diseño estadístico del experimento (DOE) para la inactivación química de Tcd A y B triple mutante (1 mg/ml) usando tratamiento con formalina y EDC/NHS. Para optimizar la inactivación con formalina de TcdA triple mutante, se variaron las concentraciones de formalina/glicina (20-40 mM), pH (6,5-7,5) y temperatura (25-40 °C). Para TcdB triple mutante, se varió la concentración de formalina/glicina de 2 a 80 mM y la temperatura y el pH fueron de 25 °C y 7,0 respectivamente. El tiempo de incubación para todos los tratamientos con formalina fue de 24 horas. Para la inactivación con formalina, "40/40" en las Tablas 21 y 23 representa la concentración de formalina y glicina usada en la reacción. Para el tratamiento con EDC/NHS, se variaron las concentraciones de EDC/NHS de 0,25 a 2,5 mg/mg de TcdA triple mutante y de 0,125 a 2,5 mg/mg de TcdB triple mutante y se incubaron durante cuatro horas a 25 °C. Al final de las reacciones, todas las muestras se desalaron en fosfato 10 mM, pH 7,0. Después de la purificación, los Tcd tratados se analizaron para determinar la citotoxicidad residual y el reconocimiento de mAb de los epítomos mediante análisis de transferencia de puntos. El objetivo era identificar las condiciones de tratamiento que reducen la citotoxicidad al nivel deseado (CE₅₀ > 1.000 µg/ml) sin afectar negativamente a los epítomos reconocidos por un panel de mAb neutralizantes (++++ o +++). Las condiciones de tratamiento (marcadas con una marca de verificación "✓" en las Tablas 21-24) produjeron composiciones inmunogénicas potencialmente seguras y eficaces que retuvieron la reactividad para al menos cuatro mAb neutralizantes mientras exhibían una reducción de 6-8 log₁₀ en la citotoxicidad, en relación con las respectiva citotoxicidad de la toxina de tipo silvestre. Los resultados seleccionados se ilustran en las Tablas 21 a 24. En la Tabla 33 y la Tabla 34 se muestran datos adicionales de diferentes condiciones de tratamiento sobre las toxinas triple mutantes y los datos de los ensayos de citotoxicidad y neutralización de toxinas *in vitro*. Véanse también, por ejemplo, los Ejemplos 20 y 21 anteriores, que proporcionan más detalles con respecto a las condiciones preferidas de tratamiento de entrecruzamiento de las toxinas mutantes.

30

Tabla 21: Citotoxicidad y reactividad de mAb neutralizante de TcdA triple mutante inactivada con formalina (SEQ ID NO: 4)							
Condiciones de reacción de inactivación química sobre TcdA triple mutante	ECP µg/ml	Reactividad con mAb (transferencia de puntos, condiciones no desnaturalizantes)					
		Extremo terminal N Mab#6	Dominio de translocación Mab# 102	Extremo terminal C (neutralización)			
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
25°C, pH 6,5, 20/20 mM	250	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 6,5, 40/40 mM ✓	>1.000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,5, 40/40 mM ✓	>1.000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 6,5, 40/40 mM	>1.000	++	+++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 7,5, 40/40 mM	>1.000	++	++	++++	++++	++++	+++
Ninguna, Toxina A triple mutante	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Toxoide A con FI (List Biological)	ND	-	-	++	++	+++	+

Tabla 22: Citotoxicidad y reactividad de mAb neutralizante de TcdA triple mutante inactivada con EDC (SEQ ID NO: 4)							
		Reactividad con mAb (transferencia de puntos, condiciones no desnaturizantes)					
Condiciones de reacción de inactivación química sobre TcdA triple mutante	ECP µg/ml	Extremo terminal N Mab#6	Dominio de translocación Mab# 102	Extremo terminal C (neutralización)			
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
25°C, 0,25 mg/mg, 4 h ✓	>1.000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,5 mg/mg, 4 h ✓	>1.000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 1,25 mg/mg, 4 h ✓	>1.000	+++	++++	++++	+++	++++	++++
25°C, 2,5 mg/mg, 4 h ✓	>1.000	+++	++++	++++	+++	++++	+++
Ninguna, TcdA triple mutante	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Toxoide A con FI (List Biological)	ND	-	-	++	++	+++	+

Tabla 23: Citotoxicidad y reactividad de mAb neutralizante de TcdB triple mutante inactivada con formalina (SEQ ID NO: 6)					
Condiciones de reacción de inactivación química sobre TcdB triple mutante	ECP (µg/ml)	mAb # (extremo terminal N 543 aa 1)		mAb # (extremo terminal medio/C 544 - 2366) (extremo terminal medio/C aa 6)	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25 °C, pH 7,0, 80/80 mM, 24 h ✓	>1.000	++++	++++	++++	+++
25 °C, pH 7,0, 40/40 mM, 24 h ✓	>1.000	++++	++++	++++	++++
25 °C, pH 7,0, 10/10 mM, 24 h	15,6	++++	++++	++++	++++
25 °C, pH 7,0, 2/2 mM, 24 h	<0,98	++++	++++	++++	++++
Ninguno, TcdB triple mutante	0,058	++++	++++	++++	++++
Toxoide B con FI (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

Tabla 24: Citotoxicidad y reactividad de mAb neutralizante de TcdB triple mutante inactivada con EDC (SEQ ID NO: 6)					
Condiciones de reacción de inactivación química en TcdB triple mutante	ECP (µg/ml)	mAb # (extremo terminal N 543 aa 1)		mAb # (extremo terminal medio/C 544 - 2.366) (extremo terminal medio/C aa 6)	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25 °C, 0,125 mg/mg, 4 h	3,9	++++	++++	++++	++++
25 °C, 0,25 mg/mg, 4 h	250	++++	++++	++++	++++
25 °C, 0,5 mg/ml, 4 h ✓	>1.000	++++	++++	++++	++++
25 °C, 1,25 mg/mg, 4 h ✓	>1.000	++++	+++	+++	+++
25 °C, 2,5 mg/mg, 4 h ✓	>1.000	++++	+++	+++	+++
Ninguno, Triple mutante TcdB	0,058	++++	++++	++++	++++
Toxoide B con FI (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

Tabla 33

		Ensayo de citotoxicidad (CE ₅₀)		Reactividad con mAb (transferencia de puntos, condiciones no desnaturizantes)					
Muestra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Identificación de la muestra	ECP; 24 h µg /ml	ECP; 72h µg /ml	Extremo terminal N Mab#6	Dominio de translocación Mab# 102	Extremo terminal C (neutralización)			
						80-29	3-25	60-22	65-33
1	L44166-157A	>1.000	>1.000	++++	++++	++++	+++	++++	++++
2	L44166-157B	>1.000	>1.000	+++	++++	++++	+++	++++	++++
3	L44166-157C	>1.000	>1.000	+++	+++	++++	+++	++++	++++
4	L44166-157D	>1.000	>1.000	+++	+++	++++	+++	++++	++++
5	L44905-160A	>1.000	>1.000	++	++	++++	++	++++	++++
6	L44166-166	>1.000	>1.000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	L44905-170A	ND	>1.000	+	+	++	++	++	+
8	L44897-61	>1.000	ND	+++	++	++++	++++	++++	++++
9	L44897-63	>1.000	ND	++++	+++	++++	+++	++++	++++

(continuación)

		Ensayo de citotoxicidad (CE ₅₀)		Reactividad con mAb (transferencia de puntos, condiciones no desnaturalizantes)					
Muestra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Identificación de la muestra	ECP; 24 h µg /ml	ECP; 72h µg /ml	Extremo terminal N Mab#6	Dominio de translocación Mab# 102	Extremo terminal C (neutralización)			
						80-29	3-25	60-22	65-33
10	L44897-72 Tubo #1	250	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
11	L44897-72 Tubo #2	>1.000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
12	L44897-72 Tubo #3	>1.000	ND	+++	+++	++++	++++	++++	++++
13	L44897-72 Tubo #4	>1.000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
14	L44897-72 Tubo #5	>1.000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
15	L44897-75 Tubo #6	>1.000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
16	L44897-75 Tubo #7	>1.000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
17	L44897-75 Tubo #8	>1.000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
18	L44897-75 Tubo #9	>1.000	ND	++	+++	++++	++++	++++	++++
19	L44897-75 Tubo #10	>1.000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
20	L44897-75 Tubo #11	>1.000	ND	++	++	++++	++++	++++	+++
21	L44897-101 (modificación previa) control de TxA	23,4	<7,8	++++	++++	++++	++++	++++	++++
22	L44897-101, 2 h	187,5	155,9	+++	++++	++++	++++	++++	++++
23	L44897-101, 4 h	375	380,3	+++	++++	++++	++++	++++	++++
24	L44897-101, 6 h	500	429,6	+++	++++	++++	++++	++++	++++
25	L44897 102, 24 h	>1.000	>1.000	++	++++	++++	++++	++++	++++
26	L44897-103, 51 h	>1.000	>1.000	+	+++	+++	++++	++++	+++
27	L44897-104, 74 h	>1.000	>1.000	-	+++	+++	+++	+++	+++
28	L44897-105, 120 h	>1.000	>1.000	-	++	++	+++	+++	++
29	L44980-004	>1.000	>1.000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
30	Reacción #1 Semana 0, 25 °C	750 µg/ml	ND	ND	++	++	+++	+++	++
31	Reacción #1 Semana 1, 25 °C	375 µg/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
32	Reacción #1 Semana 2, 25 °C	375 µg/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
33	Reacción #1 Semana 3, 25 °C	375 µg/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
34	Reacción #1 Semana 4, 25 °C	250 µg/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
35	Reacción #1 Semana 3, 37 °C	93,8 µg/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
36	Reacción #2 Semana 0, 25 °C	375 µg/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
37	Reacción #2 Semana 1, 25 °C	375 µg/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
38	Reacción #2 Semana 2, 25 °C	750 µg/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++

(continuación)

		Ensayo de citotoxicidad (CE ₅₀)		Reactividad con mAb (transferencia de puntos, condiciones no desnaturizantes)					
Muestra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Identificación de la muestra	ECP; 24 h µg /ml	ECP, 72h µg /ml	Extremo terminal N Mab#6	Dominio de translocación Mab# 102	Extremo terminal C (neutralización)			
						80-29	3-25	60-22	65-33
39	Reacción #2 Semana 3, 25 °C	250 µg/ml	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
40	Reacción #2 Semana 4, 25 °C	250 µg/ml	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
41	Reacción #2 Semana 3, 37 °C	187,5 µg/ml	ND	ND	+++	+++	++++	++++	+++
42	TxA Control Semana 3, 25 °C	18,8 µg/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
43	TxA Control Semana 3, 37 °C	25 µg/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
44	L44897-116-6 29,5 h	> 2.000 µg/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++
45	L44897-116-7 57,5 h	> 2.000 µg/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++
46	L44897-116 -8 79,5 h	> 2.000 µg/ml	ND	ND	+	+	+	+++	+
47	L44897-116-9 123,5 h	> 2.000 µg/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++
48	L44897-139	>1.000	ND	++	++++	++++	++++	++++	++++
49	L44166-204	>1.000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++

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

5

Las muestras 1-4 se modificaron con EDC/NHS. Condiciones: 30 °C, MES 20 mM/NaCl 150 mM pH 6,5. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de EDC. Después de 2 horas de reacción, a las muestras A, B y C se les añadió glicina 1 M hasta una concentración final de glicina 50 mM. A la muestra D no se le añadió glicina. Las reacciones se establecieron con diferentes proporciones en peso de toxina A mutante (SEQ ID NO: 4): EDC: NHS como se indica a continuación.

10

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

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

Muestra 6 L44166-166 modificación con EDC/NHS de la toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) a 25 °C en MES 20 mM/NaCl 150 mM pH 6,5. Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5. Reacción iniciada por la adición de EDC. Después de 2 horas de reacción, se añadió glicina 1 M hasta una concentración final de glicina 0,1 M y se incubó durante 2 horas más. Después de este tiempo, el tampón de reacción se intercambió por 1 X PBS en Sefadex G25.

Muestra 7 L44905-170A HCHO 80 mM, glicina 80 mM, NaPO₄ 80 mM pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina A mutante (SEQ ID NO: 4), 48 horas de reacción a 35 °C. Esta reacción de formalina estaba dirigida a producir un entrecruzamiento excesivo, por lo que la unión al antígeno se vería gravemente disminuida.

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

Muestra 9 L44897-63 HCHO 80 mM/glicina 80 mM, 72 horas de reacción a 25 °C. Las siguientes reacciones tuvieron todas un tiempo de reacción de 24 horas.

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

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

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

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

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

- Muestra 15 L44897-75 Tubo # 6 25 °C, NaPi 80 mM pH 7,5, HCHO 20 mM/glicina 20 mM
 Muestra 16 L44897-75 Tubo # 7 25 °C, NaPi 80 mM pH 7,5, HCHO 40 mM/glicina 40 mM
 Muestra 17 L44897-75 Tubo # 8 40 °C, NaPi 80 mM pH 6,5, HCHO 20 mM/glicina 20 mM
 Muestra 18 L44897-75 Tubo # 9 40 °C, NaPi 80 mM pH 6,5, HCHO 40 mM/glicina 40 mM
 5 Muestra 19 L44897-75 Tubo # 10 40 °C, NaPi 80 mM pH 7,5, HCHO 20 mM/glicina 20 mM
 Muestra 20 L44897-75 Tubo # 11 40 °C, NaPi 80 mM pH 7,5, HCHO 40 mM/glicina 40 mM
 Las siguientes 8 muestras se hicieron reaccionar a 25 °C durante los tiempos indicados en NaPi 80 mM pH 7,0 que contenía HCHO 78 mM y glicina 76 mM.
 Muestra 21 L44897-101 (modificación previa) control de TxA de tiempo cero muestra de control, no modificada ni
 10 expuesta a HCHO/glicina
 Muestra 22 L44897-101, 2 h
 Muestra 23 L44897-101, 4 h
 Muestra 24 L44897-101, 6 h
 Muestra 25 L44897 102, 24 h
 15 Muestra 26 L44897-103, 51 h
 Muestra 27 L44897-104, 74 h
 Muestra 28 L44897-105, 120 h
 Muestra 29 (L44980-004) era la toxina A mutante modificada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) (toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4)-EDC). Las condiciones de reacción son: 25°C, el tampón era MES 20 mM/NaCl 150 mM pH 6,6. Toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 p:p:p. Reacción iniciada por la adición de EDC. Después de 2 horas de reacción, se añadió glicina hasta una concentración final de 0,1 M y se hizo reaccionar durante 2 horas más a 25°C. La reacción terminó desalando en Sefadex G25.
 20
 Las siguientes 12 muestras y 2 controles fueron experimentos de reversión en los que las muestras se incubaron a 25 °C y 37 °C.
 25 Reacción 1 = 25 °C, NaPi 80 mM pH 7,0, HCHO 40 mM solamente (sin glicina), reacción de 24 horas.
 Reacción 2 = 25 °C, NaPi 80 mM pH 7,0, HCHO 40 mM/glicina 40 mM, reacción de 24 horas

Muestra	Reacción
30	Reacción # 1 Semana 0, 25°C
31	Reacción # 1 Semana 1, 25°C
32	Reacción # 1 Semana 2, 25°C
33	Reacción # 1 Semana 3, 25°C
34	Reacción # 1 Semana 4, 25°C
35	Reacción # 1 Semana 3, 25°C
36	Reacción # 1 Semana 0, 25°C
37	Reacción # 1 Semana 1, 25°C
38	Reacción # 1 Semana 2, 25°C
39	Reacción # 1 Semana 3, 25°C
40	Reacción # 1 Semana 4, 25°C
41	Reacción # 1 Semana 3, 37°C
42	Control de TxA Semana 3, 25°C
43	Control de TxA Semana 3, 37°C

- 30 Las siguientes 4 muestras se generaron por reacción durante los tiempos indicados a 25 °C en NaPi 80 mM pH 7,0, HCHO 40 mM/glicina 40 mM

- 35 44 L44897-116-6 29,5 horas
 45 L44897-116-7 57,5 horas
 46 L44897-116 -8 79,5 horas
 47 L44897-116-9 123,5 horas

- 40 Muestra 48 L44897-139 48 horas de reacción a 25 °C, NaPi 80 mM pH 7,0, HCHO 40 mM/glicina 40 mM.
 Muestra 49 L44166-204 modificación con EDC/NHS de la toxina A mutante (SEQ ID NO: 4). 25 °C, tampón 1 x PBS pH 7,0. Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 p:p:p. 2 horas de reacción con EDC/NHS, luego glicina 1 M añadida hasta una concentración final de 0,1 M y 2 horas más de reacción. Tampón intercambiado en Sefadex G25 en L-histidina 20 mM/NaCl 100 mM pH 6,5.

Tabla 34							
	Ensayo de citotoxicidad (CE ₅₀)		Reactividad con mAb neutralizante (transferencia de puntos, condiciones no desnaturalizantes)				Reactividad fuerte con todos los 4 mAb
Identificación de la muestra de toxina B mutante	ECP; 24 h	ATP, 72 h	mAb # (extremo terminal N aa 1 - 543)		mAb # (extremo terminal medio/C aa 544 - 2.366)		
			8-26	9-30	56-6	59-3	
L44905-86-01 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Control no tratado	<0,1 µg /ml	<0,1 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-02 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10 °C, día 1	≥100 µg/ml	2,2 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-03 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25 °C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	++	+++	√*
L44905-86-04 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10 °C, día 1	>100 µg/ml	5,2 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-05 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25 °C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++	+++	√*
L44905-86-06 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Reacción 3, 10 °C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	+++	
L44905-86-07 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Reacción 3, 25 °C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	+++	
L44905-86-08 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10 °C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	+++	√
L44905-86-09 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25 °C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++	++	-	+	
L44905-86-10 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10 °C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-11 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++	++++	-	+	
L44905-86-12 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Reacción 3, 10°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++		-		++++
L44905-86-13 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Reacción 3, 25°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++		-		++++
L44905-86-14 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, día 7	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-15 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, día 7	>100 mg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	-	+	
L44905-86-16 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, día 7	>100 mg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	+++	++++	√
L44905-86-17 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, día 7	>100 mg/ml	>100 µg/ml	++	++	-	+	
L44905-86-18 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Reacción 3, 10°C, día 7	>100 mg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	++++	

(continuación)

Continuación

Tabla 34							
	Ensayo de citotoxicidad (CE ₅₀)		Reactividad con mAb neutralizante (transferencia de puntos, condiciones no desnaturalizantes)				Reactividad fuerte con todos los 4 mAb
Identificación de la muestra de toxina B mutante	ECP; 24 h	ATP, 72 h	mAb # (extremo terminal N aa 1 - 543)		mAb # (extremo terminal medio/C aa 544 - 2.366)		
			8-26	9-30	56-6	59-3	
L44905-86-19 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Reacción 3, 25°C, día 7	>100 mg/ml	>100 µg/ml	+++	-	++	++	
L34346-30A	>100 mg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L34346-30B	>100 mg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	++++	++++	√
Comercial, toxoide B con FI (List Biologicals)	ND	ND	++++	++++	++++	++++	√
Comercial, toxina B wt de control (List Biologicals)	22,5 pg/ ml	7,8 pg/ml	+++	++	+++	+++	√
Control, toxina B triple mutante recombinante (SEQ ID NO: 6)	78 ng/ml	72 ng/ml	+++	++	++++	+++	√

Condiciones de reacción de entrecruzamiento químico para las muestras de toxina B mutante a las que se hace referencia en la Tabla 34

5 La toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) se entrecruzó químicamente y se ensayó de acuerdo con las siguientes condiciones de reacción. Las muestras L44905-86 se probaron en un experimento que incluía tres variaciones de la reacción de formalina y dos temperaturas de incubación. Cada día, se tomaron 6 muestras para un total de 18 muestras. La primera muestra de la lista es el control sin tratar (que hace un total de 19 muestras). El control sin tratar incluyó un polipéptido de toxina B triple mutante si tratar (SEQ ID NO: 6).

Reacción 1 ("Rxn1") = HCHO 80 mM, glicina 80 mM, NaPO₄ 80 mM pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)

Reacción 2 ("Rxn2") = HCHO 80 mM, sin glicina, NaPO₄ 80 mM pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)

Reacción 3 ("Rxn3") = HCHO 80 mM, sin glicina, NaPO₄ 80 mM pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) + protección con cianoborohidruro. La protección con cianoborohidruro implicó CNBrH₄ 80 mM añadido a la reacción final desalada y se incubó durante 24 horas a 36 °C.

Para la muestra L34346-30A, 0,5 g de EDC y NHS por gramo de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), 4 horas a 30 °C, en MES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5.

Para la muestra L34346-30B, 0,5 g de EDC y NHS por gramo de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), 2 horas a 30 °C seguido por la adición de glicina (concentración final de g/l) y se incubó otras 2 horas a 30 °C, en MES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5. La única diferencia entre las dos reacciones para L34346-30A y L34346-30B es la adición de glicina a la reacción L34346-30B.

Ejemplo 37: Los anticuerpos inducidos por composiciones inmunogénicas son capaces de neutralizar las toxinas de diversas cepas de *C. difficile*

Para evaluar si los anticuerpos inducidos por las composiciones inmunogénicas que incluyen las sustancias farmacológicas de toxina mutante pueden neutralizar un amplio espectro de diversas secuencias de toxinas, se secuenciaron cepas que representan diversos ribotipos y toxinotipos para identificar el grado de diversidad genética entre las diversas cepas en comparación con la sustancias farmacológicas de toxina mutante. Los sobrenadantes de cultivo que contienen toxinas secretadas de las diversas cepas se probaron luego en un ensayo de neutralización *in vitro* utilizando sueros de hámsteres inmunizados para determinar la cobertura de la composición inmunogénica y para determinar la capacidad de la composición inmunogénica para proteger contra diversas toxinas de las cepas clínicas circulantes.

Se usaron tanto células HT-29 (línea celular de carcinoma de colon) como células IMR-90 para probar la neutralización de toxinas expresadas a partir de cepas CDC. Las células HT-29 son más sensibles a TcdA; la CE₅₀ de la TcdA purificada en estas células es de 100 pg/ml en comparación con 3,3 ng/ml para TcdB. Por otro lado, las células IMR-90 son más sensibles a TcdB; la CE₅₀ de la TcdB purificada en estas células varía entre 9-30 pg/ml en comparación con 0,92-1,5 ng/ml para TcdA. La especificidad del ensayo tanto para TcdA como para TcdB en estas

líneas celulares se confirmó usando anticuerpos específicos de toxina tanto policlonales como monoclonales. Para la normalización del ensayo, los filtrados de cultivo de los 24 aislados de CDC se analizaron a una concentración cuatro veces mayor que su valor de CE_{50} respectivo. Tres de las cepas tenían niveles de toxina demasiado bajos para probarlos en el ensayo de neutralización.

Se obtuvieron de los CDC veinticuatro cepas que representan varios ribotipos/toxinotipos que cubren más del 95% de las cepas circulantes de *C. difficile* en los Estados Unidos y Canadá. Entre estos aislados se encontraban cepas que representan los ribotipos 027, 001 y 078, tres cepas epidémicas de CDAD en los Estados Unidos, Canadá y Reino Unido. Las cepas 2004013 y 2004118 representaron el ribotipo 027; la cepa 2004111 representaba el ribotipo 001 y las cepas 2005088, 2005325 y 2007816 representaban el ribotipo 078. Para identificar el grado de diversidad genética entre los aislados clínicos que causan enfermedades y la cepa 630, se secuenciaron completamente los genes de toxina (*tcdA* y *tcdB*) de estas cepas clínicas. Véase la Tabla 35. Las secuencias de aminoácidos de las toxinas se alinearon usando ClustalW en el programa Megalign^{MR} (DNASTAR® Lasergene®) y se analizaron para determinar la identidad de secuencia. Para *tcdA*, el análisis de alineación genómica mostró que todos los aislados clínicos y la cepa 630 compartían en general aproximadamente 98-100% de identidad de secuencia de aminoácidos. La porción del extremo terminal C del gen *tcdA* fue ligeramente más divergente. Se realizó el mismo análisis para el gen *tcdB* que exhibió una mayor divergencia de secuencia. Notablemente, las cepas 2007838/NAP7/126 y 2007858/NAP1/unK5 mostraron los patrones más divergentes de la cepa 630 en los dominios del extremo terminal N (79-100%) y del extremo terminal C (88-100%; datos no mostrados).

Se recogió un conjunto de suero de hámster (HS) de los hámsteres dorados sirios que se inmunizaron con un inmunógeno que incluía TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) y TcdB mutante (SEQ ID NO: 6), en los que se inactivaron las toxinas mutantes con EDC, de acuerdo con, por ejemplo, el Ejemplo 29, Tabla 15, descrito anteriormente, y formulado con fosfato de aluminio. Los resultados de la Tabla 35 muestran que al menos la toxina B de los sobrenadantes de cultivo respectivos fueron neutralizados, en un ensayo de neutralización *in vitro*, por sueros de los hámsteres inmunizados.

Tabla 35. Descripción de las cepas de *C. difficile* de los CDC y capacidad de los sueros inmunes de hámster para neutralizar diversas toxinas

Cepa	Tipo PFGE	Ribotipo	Neutralizados por sueros de Hámster
2005088	NAP7	78	sí
2007816	Relacionado con NAP7	78	sí
2005325	NAP7	78	sí
2004013	NAP1	27	sí
2007886	NAP1		sí
2008222	NAP4	77	sí
2004206	NAP4	154	sí
2005283	NAP5	Unk3	No analizado ^b
2009141	NAP2		sí
2007838	NAP7	126	sí
2004111	NAP2	1	sí
2007070	NAP10	70	sí
2006017	NAP12	15	sí
2009078	NAP11	106	No analizado ^b
2007217	NAP8	126	sí
2006376	NAP9	17	sí
2007302	NAP11	Unk2	sí
2004118	NAP1	27	sí
2005022	NAP3	53	sí
2009292	NAP1		sí
2004205	NAP6	2	sí
2007858	NAP1	Unk5	sí
2009087	NAP11	106	No analizado ^b
2005359	Relacionado con NAP1		sí

^b Los niveles de toxina eran demasiado bajos para realizar el ensayo de neutralización.

La Figura 23 representa los resultados del ensayo de neutralización usando preparaciones de toxinas de diversas cepas de *C. difficile* en células IMR-90. Los datos muestran que los anticuerpos neutralizantes de TcdB en los antisueros de hámster fueron capaces de neutralizar las toxinas de los 21 aislamientos probados, incluidas las cepas hipervirulentas y una cepa negativa para TcdA, positiva para TcdB. Se obtuvieron al menos 16 cepas diferentes de *C. difficile* del CDC (Atlanta, GA) (descrito previamente) y se cultivaron en medios de cultivo de *C. difficile* en

condiciones adecuadas como se conoce en la técnica y como se describió anteriormente. Los sobrenadantes de los cultivos que contienen las toxinas secretadas se analizaron para determinar su citotoxicidad (CE_{50}) en monocapas de IMR-90 y posteriormente se analizaron en un ensayo de neutralización *in vitro* estándar a 4 veces la CE_{50} utilizando varias diluciones de sueros de hámsteres inmunizados con la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante, formulada con fosfato de aluminio. La toxina sin purificar obtenida de los sobrenadantes de cultivo de cada cepa y la toxina purificada (toxina comercial obtenida de List Biologicals) (no purificada de los sobrenadantes respectivos) se ensayaron para determinar la citotoxicidad para las células IMR-90 usando el ensayo de citotoxicidad *in vitro* descrito anteriormente.

En las Figuras 23A-K, los gráficos muestran los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* (descritas anteriormente) en las que los niveles de ATP (URL) se representan frente a concentraciones crecientes de: medio de cultivo de *C. difficile* y el conjunto de suero de hámster (■); la toxina sin purificar y el conjunto de suero de hámster (●); toxina purificada y el conjunto de suero de hámster (▲); toxina sin purificar (▼), control; y toxina purificada (◆), control. Las toxinas de las respectivas cepas se añadieron a las células a valores de 4 x CE_{50} .

Como se muestra en las Figuras 23A-K, los hámsteres que recibieron el inmunógeno descrito desarrollaron sorprendentemente anticuerpos neutralizantes que exhibieron actividad neutralizante contra las toxinas de al menos las siguientes 16 cepas de *C. difficile* diferentes del CDC, en comparación con el respectivo control de solo toxina: 2007886 (Figura 23A); 2006017 (Figura 23B); 2007070 (Figura 23C); 2007302 (Figura 23D); 2007838 (Figura 23E); 2007886 (Figura 23F); 2009292 (Figura 23G); 2004013 (Figura 23H); 2009141 (Figura 23I); 2005022 (Figura 23J); 2006376 (Figura 23K). Véase también la Tabla 35 para las cepas adicionales de *C. difficile* a partir de las cuales se analizaron las toxinas y se neutralizaron mediante la composición inmunogénica que incluye una sustancia farmacológica de la toxina A mutante y una sustancia farmacológica de la toxina B mutante, formuladas en fosfato de aluminio.

En otro estudio, los sobrenadantes de cultivo que contenían toxinas secretadas de las diversas cepas de *C. difficile* (obtenidas de los CDC y del Hospital de Leeds, Reino Unido) se probaron en el ensayo de neutralización *in vitro* utilizando sueros de hámsteres a los que se les administró la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y sustancia farmacológica de la toxina B mutante, formuladas con Alhydrogel. Véase la Tabla 36 para conocer el diseño experimental. Los resultados se muestran en la Tabla 37 y la Tabla 38.

Tabla 36: Diseño experimental

Control del ensayo	En el ensayo usando células HT-29: antisuero de conejo (Anti-Toxina A policlonal, Fitzgerald Industries, # 70-CR65) y Toxina A de referencia (toxina A de tipo silvestre de List Biologicals). En el ensayo usando células IMR-90: Antisuero de conejo (Anti Toxina B policlonal, Meridian Life Science, # B01246R) y Toxina B de referencia (toxina B de tipo silvestre de List Biologicals)
Controles de la muestra	En el ensayo usando células HT-29: suero HS + toxina A de referencia. En el ensayo usando células IMR-90: suero HS + toxina B de referencia
	Suero HS + toxina wt 630
	Suero HS + medio de cultivo de la línea celular IMR-90 o HT-29
	Suero HS + sobrenadante de cultivo de VPI11186
Muestra de prueba	HS + sobrenadante respectivo de cultivo de <i>C. difficile</i>
Fuente de antisuero de hámster (HS)	Animales a los que se les administró la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante formulados con Alhydrogel

Tabla 37: Los anticuerpos inducidos por la composición inmunogénica neutralizaron la toxina A y la toxina B de diversas cepas de *C. difficile* de tipo silvestre de los CDC, incluidas las cepas hipervirulentas

Cepa de <i>C. difficile</i>	Tipo PFGE	Ribotipo	Toxinotipo	Otro procedimiento de tipificación	Neutralizados por HS (IMR- 90, toxina B)	Neutralizado por HS (HT-29, Toxina A)
2004111	NAP2	1	0	La secuencia de la toxina respectiva tiene una homología del 100% con la toxina de la cepa 630	Sí	Sí
2009141	NAP2		0		Sí	Sí
2006017	NAP 12	15	0		Sí	Sí
2007302	NAP11	Unk2	0		Sí	Sí
2009087	NAP11	106	0		Sí	Sí
2005022	NAP3	53	0		Sí	Sí
2005283	NAP5	Unk3	0		Sí	Sí
2009078	NAP5	53	0		Sí	Sí
2004206	NAP4	154	0		Sí	Sí

(continuación)

Tabla 37: Los anticuerpos inducidos por la composición inmunogénica neutralizaron la toxina A y la toxina B de diversas cepas de *C. difficile* de tipo silvestre de los CDC, incluidas las cepas hipervirulentas

Cepa de <i>C. difficile</i>	Tipo PFGE	Ribotipo	Toxinotipo	Otro procedimiento de tipificación	Neutralizados por HS (IMR- 90, toxina B)	Neutralizado por HS (HT-29, Toxina A)
2008222	NAP4	77	0		Sí	Sí
2004205	NAP6	2	0		Sí	Sí
2007070	NAP10	70	0		Sí	Sí
2006376	NAP9	17	VIII	toxina A-/toxina B+	Sí	N/A
2007816	Relacionado con NAP7	78	V	Prevalencia incrementada en los Estados Unidos	Sí	Sí
2007838	NAP7	126		y Europa	Sí	Sí
2005088	NAP7	78			Sí	Sí
2005325	NAP7	78			Sí	Sí
2007217	NAP8	126			Sí	Sí
2004013	NAP1	27	III	NAP1/027/III Hipervirulenta	Sí	Sí
2004118	NAP1	27			Sí	Sí
2009292	NAP1				Sí	Sí
2005359	Relacionado con NAP1				Sí	Sí
2007858	NAP1	Unk5	IX/XXIII	Otro	Sí	Sí
2007886	NAP1		IX/XXIII		Sí	Sí

Tabla 38: Anticuerpos inducidos por composición inmunogénica, toxina A y toxina B neutralizadas de varias cepas de *C. difficile* de tipo silvestre de Europa, incluidas las cepas hipervirulentas

Cepa de <i>C. difficile</i>	Tipo PFGE	Otro tipo procedimiento de tipificación	Tipo de toxina	Neutralizados por HS (IMR-90, Toxina B)	Neutralizados por HS (HT-29, Toxina A)
001	NAP2	Cepas de Toxinotipo 0	0	Sí	Sí
002	NAP6			Sí	Sí
012 (004)	NAPCR1			Sí	Sí
014	UK			Sí	Sí
015	NAP12			Sí	Sí
020	NAP4			Sí	Sí
029	UK			Sí	Sí
046	UK			Sí	Sí
053	NAP5			Sí	Sí
059	UK			Sí	Sí
077	UK			Sí	Sí
078	UK			Sí	Sí
081	UK			Sí	Sí
087	UK			Sí	Sí
095	UK			Sí	Sí
106	UK			Sí	Sí
117	UK			Sí	Sí
017	NAP9	toxina A-/toxina B+	VIII	Sí	NA
027	NAP1	Hipervirulenta	III	Sí	Sí
075	UK	Hipervirulenta		Sí	Sí
003	NAP10	Otro	I	Sí	Sí
023	UK		IV	Sí	Sí
070	UK		XIII	Sí	Sí
126	UK		UK	Sí	Sí
131	UK		UK	En Progreso	Sí

Cepas de *C. difficile* tipo silvestre obtenidas del Hospital de Leeds, RU. "UK" = estado desconocido; NA, no aplicable; la cepa no produce la toxina A; no se probó en el ensayo de neutralización de la toxina A

Ejemplo 38: Mapeo de péptidos de toxinas triple mutantes con EDC/NHS

Para caracterizar las toxinas triple mutantes inactivadas con EDC/NHS, se realizaron experimentos de mapeo de péptidos en cuatro lotes de toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) y cuatro lotes de B triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 6). Después de digerir las toxinas mutantes con tripsina, los fragmentos de péptidos resultantes se separaron usando HPLC de fase inversa. Se utilizó el análisis espectral de masas para identificar las modificaciones que se producen como resultado del proceso de inactivación. Tanto para la sustancia farmacológica de la toxina A mutante como para la sustancia farmacológica de la toxina B mutante, se identificaron más del 95% de los péptidos tripticos teóricos. Se identificaron entrecruzamientos y aductos de glicina (se utilizó glicina como agente de protección). Tanto en la sustancia farmacológica de la toxina A mutante como en la sustancia farmacológica de la toxina B mutante, también se observaron aductos de beta-alanina. Sin estar ligados por ningún mecanismo o teoría, los aductos de beta-alanina parecen resultar de la reacción de tres moles de NHS con un mol de EDC que forma beta-alanina activada por NHS. Esta molécula puede entonces reaccionar con grupos lisina para formar aductos de beta-alanina (+70 Da). En las muestras de toxina B triple mutante tratadas con EDC/NHS, también se observaron niveles bajos (0,07 moles/mol de proteína) de deshidroalanina (-34 Da). La deshidroalanina es el resultado de la desulfonación de un residuo de cisteína. Se observó el mismo tipo y grado de modificación en los cuatro lotes de cada toxina mutante, lo que indica que el proceso produce un producto consistente. El mapeo de péptidos (con una cobertura de secuencia superior al 95%) confirma que existen modificaciones. En la Tabla 39 se muestra un resumen de las modificaciones. Véanse también las Figuras 24-25. Además, el tamaño y la heterogeneidad de carga de la sustancia farmacológica de la toxina A triple mutante y de la sustancia farmacológica de la toxina B triple mutante aumentaron, en comparación con el tamaño y la heterogeneidad de carga de las respectivas toxina A triple mutante y toxina B triple mutante en ausencia de inactivación química. Como resultado, los perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico (AEX) tenían picos relativamente anchos (datos no mostrados).

Tabla 39. Resumen de modificaciones observadas en sustancias farmacológicas de toxinas mutantes

Modificación	# de residuos modificados	# total de residuos	Grado de modificación	Moles modificados/mol de proteína
Sustancia farmacológica de la toxina A mutante				
Entrecruzamiento	2	313 de Asp/Glu	16-40%	0,6
Fracción de Glicina	8	313 de Asp/Glu	10-53%	2,2
Fracción de Beta Alanina	19	233 de Lys	10-60%	4,7
Sustancia farmacológica de la toxina B mutante				
Entrecruzamiento	3	390 de Asp/Glu	11-63%	0,8
Fracción de Glicina	23	390 de Asp/Glu	10-31 %	3,9
Fracción de Beta Alanina	10	156 de Lys	12-42%	2,6
deshidroalanina	2	8 de Cys	1,0-3,5%	0,07

El grado de modificación se calcula dividiendo el área de HPLC del péptido modificado por el área de HPLC del péptido nativo + modificado.

Ejemplo 39: Producción del producto farmacéutico

La composición inmunogénica con *C. difficile* (producto farmacéutico) contiene dos ingredientes farmacéuticos activos (sustancia farmacológica de la toxina A mutante y sustancia farmacológica de la toxina B mutante): □. Un producto farmacéutico ejemplar es una formulación liofilizada que contiene tampón Tris 10 mM pH 7,4, trehalosa dihidrato al 4,5% (p/p) y polisorbato 80 al 0,01% (p/v), que incluye cada una, una sustancia farmacológica de la toxina A mutante y una sustancia farmacológica de la toxina B mutante. Véase la Tabla 40. La composición inmunogénica se prepara para inyección resuspendiendo la vacuna liofilizada con diluyente o con diluyente que contiene Alhydrogel. El placebo incluirá una solución salina normal estéril para inyección (cloruro de sodio al 0,9%).

Tabla 40

Componente	Seleccionado
Forma de dosificación de la formulación	Liofilizada
Dosis de antígeno por 0,5 ml	25, 50, 100 µg de cada toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) y toxina triple B mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 6)
pH	7,4 ± 0,5
Tampón	Tris 10 mM
Agente estabilizador/de relleno	Trehalosa dihidratada al 4,5% (3 - 6%)
Tensioactivo	Polisorbato 80 al 0,01% (0,005 - 0,015%)
Cierres de contenedores	Vial de vidrio de pedernal de 2 ml, 13 mm, Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

Preparación del tampón

Se añade agua para inyección (WFI) a un recipiente para elaboración de la composición. Mientras se mezcla, se añaden los excipientes y se disuelven hasta formar una disolución. Se mide el pH. Si es necesario, el pH se ajusta a $7,4 \pm 0,1$ con HCl. La solución se diluye hasta el peso final con WFI y luego se filtra usando un filtro Millipore Express SHC XL150 de $0,22 \mu\text{m}$. Se toma una muestra de reducción de la carga biológica previa a la filtración antes de la filtración. Se toman muestras del tampón filtrado para determinar la osmolalidad y el pH.

Preparación de la formulación

Las sustancias farmacológicas de toxina mutante descongeladas se reúnen en el recipiente de formulación con base en las cantidades previamente calculadas en el siguiente orden de operación: primero se agrega al recipiente el 50% del volumen de tampón de dilución diana para lograr 0,6 mg/ml, seguido por la adición de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y se mezcla durante 5 minutos a 100 rpm. A continuación, se añade al recipiente la sustancia farmacológica de la toxina B mutante y la solución se diluye adicionalmente hasta un punto de dilución de 0,6 mg/ml y luego se mezcla durante otros 5 minutos a 100 rpm. Se extrae una muestra y se analiza la concentración total de toxina mutante. La solución se diluye al 100 por ciento del volumen con base en el valor de concentración de toxina mutante en proceso y luego se mezcla durante 15 minutos a 100 rpm. Se toman muestras del producto farmacéutico formulado para determinar el pH y filtración previa de la carga biológica. A continuación, el producto farmacéutico formulado se filtra utilizando un Millipore Express SHC XL150 para su almacenamiento durante la noche, o se lleva a la línea de llenado para una filtración estéril.

La masa formulada se lleva al área de llenado, se toman muestras para determinar la carga biológica y luego se filtra de forma estéril con dos filtros Millipore Express SHC XL150 en serie. El volumen formulado se introduce en viales de vidrio libre de pirógenos con un volumen de llenado diana de 0,73 ml. Los viales llenos se tapan parcialmente y luego se cargan en el liofilizador. El ciclo de liofilización se realiza como se muestra en la Tabla 41. Al finalizar el ciclo, la cámara de liofilización se vuelve a llenar con nitrógeno a 0,8 atmósferas y luego los tapones se asientan completamente. La cámara se descarga y los viales se tapan con sellos Flip Off.

Tabla 41. Puntos de ajuste del ciclo de liofilización del producto farmacéutico con *C. difficile*

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (minutos)	Remojo (minutos)	Presión
Carga	5 °C	N/A	60	-
Congelamiento 1	-50 °C	183	60	-
Recocido	-10 °C	133	180	
Congelamiento 2	-45 °C	117	90	
Iniciación del vacío	-45 °C	-	60	50
Secado primario	-30 °C	75	3.420	50
Secado secundario	30 °C	300	600	50
Almacenamiento	5 °C	50	-	50

Los datos de estabilidad del producto farmacéutico se resumen en la Tabla 42. Los datos sugieren que el producto farmacéutico es física y químicamente estable durante el almacenamiento a 2-8 °C durante al menos 3 meses o al menos 1 mes a 25 °C o 40 °C. En ambas condiciones de almacenamiento, el nivel de impurezas detectadas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) no cambió, ni hubo cambios en la antigenicidad *in vitro* a través de los últimos puntos de tiempo probados.

Tabla 42: Estabilidad del producto farmacéutico liofilizado^a

Formulación del producto farmacéutico 200 µg/ml de sustancia farmacológica de la toxina A mutante, 200 µg/ml de sustancia farmacológica de la toxina B mutante, trehalosa dihidratada al 4,5%, polisorbato 80 al 0,01%, tampón Tris 10 mM pH 7,4				
Prueba	t = 0	1 Mes a 25°C	1 Mes a 40°C	3 meses a 2-8 °C
Apariencia antes de la Reconstitución	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible
Apariencia después de la reconstitución	Solución transparente incolora	Solución transparente incolora	Solución transparente incolora	Solución transparente incolora
pH	7,5	7,6	7,6	7,5

Tabla 42: Estabilidad del producto farmacéutico liofilizado^a

	Formulación del producto farmacéutico 200 µg/ml de sustancia farmacológica de la toxina A mutante, 200 µg/ml de sustancia farmacológica de la toxina B mutante, trehalosa dihidratada al 4,5%, polisorbato 80 al 0,01%, tampón Tris 10 mM pH 7,4			
Prueba	t = 0	1 mes a 25°C	1 mes a 40°C	3 meses a 2-8°C
Concentración por AEX (µg/ml)	<ul style="list-style-type: none"> • Sustancia farmacológica de la toxina A mutante 212 • Sustancia farmacológica de la toxina B mutante 235 	<ul style="list-style-type: none"> • Sustancia farmacológica de la toxina A mutante 193 • Sustancia farmacológica de la toxina B mutante 223 	<ul style="list-style-type: none"> • Sustancia farmacológica de la toxina A mutante 191 • Sustancia farmacológica de la toxina B mutante 222 	<ul style="list-style-type: none"> • Sustancia farmacológica de la toxina A mutante 193 • Sustancia farmacológica de la toxina B mutante 230
Impurezas por SEC	< 2,5%	2,8%	2,8%	2,9%
Caracterización por SEC	HMMS: 29,6% Monómero: 68,0%	HMMS: 30,2% Monómero: 67,1%	HMMS: 30,2% Monómero: 67,1%	HMMS: 28,5% Monómero: 68,7%
Humedad	0,5	NA	NA	NA
^a El producto farmacéutico liofilizado se reconstituye con un diluyente de NaCl 60 mM para estas pruebas.				

Ejemplo 40: Diluyentes de vacunas

Para la solución salina, se usa NaCl 60 mM como diluyente para el producto farmacéutico liofilizado sin ningún adyuvante para asegurar una solución isotónica tras la reconstitución.

Alhydrogel: Alhydrogel "85" 2% (Brenntag) es un producto con grado de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) disponible comercialmente compuesto de láminas cristalinas octaédricas de hidróxido de aluminio. En la Tabla 43 se muestra una formulación de diluyente de Alhydrogel ejemplar. La formulación ejemplar puede usarse en combinación con el producto farmacéutico descrito anteriormente.

Tabla 43. Justificación de la formulación del diluyente de Alhydrogel	
Componente	Seleccionado
Forma de dosificación de la formulación	Suspensión líquida
Dosis de adyuvante por 0,5 ml	0,5 mg de Al
pH	6,5 ± 0,5
Tampón	His 10 mM
Sal	NaCl 60 mM
Cierres para contenedores	Vial de vidrio de pedernal de 2 ml, 13 mm, Tipo 1, Blowback, West - Fluotec

Los estudios con el adyuvante Alhydrogel muestran un 100% de unión de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante a 1 mg de Al/ml de Alhydrogel desde un pH de 6,0 a 7,5. La unión máxima de ambas sustancias farmacológicas se observó a la concentración de proteína más alta probada (300 µg/ml cada una).

La unión de las proteínas a Alhydrogel también se probó con la formulación de producto farmacéutico liofilizado que contenía 200 µg/ml de cada sustancia farmacológica y Alhydrogel en el intervalo de 0,25 a 1,5 mg/ml. El producto farmacéutico se reconstituyó con diluyentes que contenían concentraciones variables de Alhydrogel y se midió el porcentaje de cada toxina mutante unida. Todas las concentraciones probadas de Alhydrogel demostraron un 100% de unión de los antígenos.

También se evaluó la cinética de unión de las proteínas a Alhydrogel a la dosis diana de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (200 µg/ml cada una). Los resultados muestran que el 100% de las sustancias farmacológicas con toxinas mutantes se unieron a Alhydrogel durante el transcurso de tiempo de RT de 24 horas.

CpG 24555 y Alhydrogel: CpG 24555 es un oligodesoxinucleótido sintético de 21 mer (ODN) que tiene una secuencia 5-TCG TCG TTTTC GGT GCT TTT-3 (SEQ ID NO: 48). En la Tabla 44 se muestra una formulación ejemplar para una combinación de CpG 24555 y diluyentes de Alhydrogel. La formulación ejemplar puede usarse en combinación con el producto farmacéutico descrito anteriormente.

Tabla 44: Justificación de la formulación del diluyente CpG/Alhydrogel	
Componente	Seleccionado
Forma de dosificación de la formulación	Suspensión líquida

(continuación)

Tabla 44: Justificación de la formulación del diluyente CpG/Alhydrogel

Componente	Seleccionado
Dosis de adyuvante por 0,5 ml	Al 0,5 mg y 1 mg de CpG
pH	6,5 ± 0,5
Tampón	His 10 mM
Sal	NaCl 60 mM
Cierres de contenedores	Vial de vidrio de pedernal de 2 ml, 13 mm, Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

ISCOMATRIX®: el adyuvante ISCOMATRIX® es un adyuvante a base de saponina conocido en la técnica. En la Tabla 45 se muestra una formulación ejemplar para la formulación de adyuvante ISCOMATRIX®. La formulación ejemplar puede usarse en combinación con el producto farmacéutico descrito anteriormente.

Tabla 45: Justificación de la formulación del diluyente ISCOMATRIX®

Componente	Seleccionado
Forma de dosificación de la formulación	Suspensión líquida
Dosis de adyuvante por 0,5 ml	45 unidades
pH	6,2 ± 0,5
Tampón	Fosfato 10 mM
Sal	NaCl 60 mM
Cierres de contenedores	Vial de vidrio de pedernal de 2 ml, 13 mm, Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

Ejemplo 41: Inmunogenicidad de composiciones de sustancias farmacológicas de toxina mutante adyuvadas con Alhydrogel en el modelo NHP y prueba de concepto preclínica

Se evaluó la inmunogenicidad de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y las composiciones de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante adyuvadas con Alhydrogel en NHP, específicamente en macacos *Cynomolgus*. Los NHP inmunizados a intervalos de dos semanas (semanas 0, 2, 4) con 10 µg de cada sustancia farmacológica de la toxina A mutante y las composiciones de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (formuladas con Alhydrogel) por dosis, desarrollaron respuestas robustas de antitoxina neutralizante. Véase la Tabla 46. Las respuestas de neutralización de la antitoxina A y la antitoxina B alcanzaron un intervalo protector después de la tercera inmunización y permanecieron dentro o por encima del intervalo protector al menos hasta la semana 33 (último punto de tiempo estudiado).

Los macacos *Cynomolgus* (n = 8) se inmunizaron por vía intramuscular a las 0, 2 y 4 semanas con 10 µg de cada uno de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante formulada en 250 µg de Alhydrogel. Se recogieron sueros en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de toxinas para determinar la actividad antitoxina funcional. Los GMT se proporcionan en la Tabla 46. El intervalo de títulos protectores proporcionado en la tabla representa el intervalo de títulos de anticuerpos neutralizantes que se correlaciona con una reducción significativa en la recurrencia de la infección por *C. difficile* en el ensayo de terapia con anticuerpos monoclonales de Merck.

Tabla 46: Inmunogenicidad de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (formulada en 250 µg de Alhydrogel) en monos *Cynomolgus* (título de neutralización del 50%)

Antitoxina A (intervalo de protección de Merck/Medarex: 666-6.667 para antitoxina A)												
Semana:	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 8	Semana 12	Semana 25	Semana 29	Semana 33
Título:	15	19	129	382	336	246 9	306 9	217 1	159 9	152 0	154 5	217 8
Antitoxina B (intervalo de protección Merck/Medarex: 222-2.222 para la antitoxina B)												
Título:	10	10	10	10	20	311	410	446	676	163 1	297 0	351 0

Correlación de los títulos de anticuerpos protectores humanos del ensayo de terapia con mAb de Merck con los títulos inducidos por la vacuna candidata de Pfizer en los NHP

El estudio de eficacia de fase 2 con los mAb de Merck/Medarex (Lowy et al., N Engl J Med. 21 de enero de 2010; 362 (3): 197-205) parecía demostrar una correlación entre el nivel de los mAb de antitoxina neutralizantes en el suero y la prevención de la recurrencia de CDAD. Después de la administración de los mAb específicos de toxina a humanos, los niveles de anticuerpos en suero en receptores humanos en el intervalo de 10 a 100 µg/ml parecen proteger contra las recurrencias (reducción del 70% en la recurrencia de CDAD).

Se ensayaron composiciones inmunogénicas que incluían las sustancias farmacológicas de toxina mutante para evaluar si las composiciones inmunogénicas son capaces de inducir respuestas de anticuerpos neutralizantes potencialmente eficaces en humanos comparando los datos publicados del estudio de fase 2 de Merck/Medarex con

los niveles de anticuerpos inducidos por las composiciones inmunogénicas en el modelo NHP. Esto se logró utilizando características publicadas previamente de los mAb de Merck/Medarex para convertir el intervalo de estos mAb en el suero obtenido de sujetos que no mostraron signos de recurrencia (10-100 µg/ml) en títulos de neutralización del 50% y comparando estos títulos ("intervalo de títulos de protección") con los títulos observados en los modelos preclínicos descritos en el presente documento. Como se muestra en la Tabla 46, las composiciones inmunogénicas que incluyen la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante adyuvadas con Alhydrogel generaron respuestas inmunes en los NHP que alcanzaron el "intervalo de protección" después de la tercera dosis y se han mantenido dentro o por encima de este intervalo hasta la semana 33. El nivel de anticuerpos neutralizantes de toxinas inducidos en los NHP por la composición inmunogénica de *C. difficile* de la invención es comparable a los niveles de anticuerpos en suero en los sujetos del ensayo de Merck/Medarex que parecían estar protegidos de las recurrencias de CDAD.

Ejemplo 42: Inmunogenicidad de composiciones de sustancias farmacológicas de toxina mutante adyuvadas con ISCOMATRIX o Alhydrogel/CpG 24555 (Alh/CpG) en el modelo NHP

En los NHP, tanto ISCOMATRIX como Alh/CpG mejoraron estadísticamente significativamente los títulos de neutralización de antitoxina A y B en comparación con la vacuna administrada con Alhydrogel solamente (Tabla 47). Las respuestas de antitoxina por encima del fondo se obtuvieron en puntos de tiempo anteriores mediante la vacuna administrada con Alh/CpG o ISCOMATRIX (semana 2-4) en comparación con Alhydrogel solamente (semana 4-6), que puede tener un efecto importante en la protección contra la recurrencia de CDAD en humanos. En comparación con Alhydrogel, la composición inmunogénica adyuvada con Alh/CpG o con ISCOMATRIX generó títulos de neutralización de antitoxina que alcanzaron el intervalo protector (véase también el Ejemplo 41) más rápidamente y que se han mantenido dentro o por encima de este intervalo hasta la semana 33.

Como se muestra en la Tabla 47, los macacos *Cynomolgus* se inmunizaron IM en las semanas 0, 2 y 4 con 10 µg de cada una de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante formuladas en 250 µg de Alhydrogel (n = 8), o 500 µg de CpG + 250 µg de Alhydrogel (n = 10), o 45 U de ISCOMATRIX (n = 10). Se recogieron sueros en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de toxinas descrito anteriormente para determinar la actividad antitoxina funcional. Los GMT se enumeran en las tablas. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística (p < 0,05) en comparación con los títulos en el grupo de Alhydrogel. El intervalo de títulos de protección representa el intervalo de títulos de anticuerpos neutralizantes que se correlaciona con una reducción significativa en la recurrencia de la infección por *C. difficile* de acuerdo con el ensayo de terapia con mAb de Merck/Medarex.

Tabla 47: Inmunogenicidad de sustancias farmacológicas de toxinas mutantes adyuvantes en NHP (título de neutralización del 50%) Antitoxina A (intervalo de protección de Merck/Medarex: 666-6.667 para antitoxina A)							
Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
Título con Alhydrogel:	15	129	336	3.069	1.599	1.520	2.178
Título con Alhydrogel + CpG :	17	*1.004	*2.162	*15.989	*7.179	*5.049	*7.023
Título con ISCOMATRIX:	25	*1.283	*3.835	*19.511	*12.904	*6.992	*7.971
Antitoxina B (Intervalo de protección de Merck/Medarex: 222- 2.222 para antitoxina B)							
Título con Alhydrogel	10	10	20	410	676	1.631	3.510
Título con Alhydrogel + CpG	10	13	*136	*2.163	*5.076	*9.057	*27.971
Título con ISCOMATRIX:	10	10	*269	*5.325	*9.161	*19.479	*25.119

También se evaluó la dosis de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante administradas, en presencia de los adyuvantes ISCOMATRIX o Alh/CpG, sobre los títulos de anticuerpos antitoxina neutralizantes generados en los NHP. En un estudio, se administró a los NHP una dosis baja (10 µg) o alta (100 µg) de cada sustancia farmacológica de toxina mutante formulada en ISCOMATRIX. Las respuestas se compararon en cada punto de tiempo después de la inmunización. Como se muestra en la Tabla 48, los títulos de neutralización de antitoxina fueron robustos en ambos grupos de tratamiento. Los títulos de antitoxina A fueron casi equivalentes en la mayoría de los puntos de tiempo entre los grupos de dosis baja y alta, mientras que hubo una tendencia a que los títulos de antitoxina B fueran más altos en el grupo de dosis alta.

Tabla 48: Títulos de antitoxinas neutralizantes en NHP después de la inmunización con 10 µg o 100 µg de cada una de las sustancias farmacológicas de toxina mutante y la sustancia farmacológica de toxina mutante administrada con ISCOMATRIX (título de neutralización del 50%)

Antitoxina A (intervalo de protección de Merck/Medarex: 666-6.667 para antitoxina A)							
Semana	Semana 0	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 12
Título con 10 µg:	11	585	3.522	4.519	19.280	10.225	12.084
Título con 100 µg:	11	400	1.212	2.512	9.944	10.283	18.337
Antitoxina B (intervalo de protección de Merck/Medarex: 222-2.222 para la antitoxina B)							
Título con 10 µg:	10	10	112	266	3.710	2.666	7.060
Título con 100 µg:	10	10	303	469	6.016	4.743	20.683

Como se muestra en la Tabla 48, los macacos *Cynomolgus* (n = 5) se inmunizaron IM en las semanas 0, 2 y 4 con 10 µg o 100 µg de cada sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante formulada con 45 U de ISCOMATRIX. Se recogieron sueros en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de toxinas para determinar la actividad antitoxina funcional. Los GMT se enumeran en la tabla. El intervalo de títulos protectores representa el intervalo de títulos de anticuerpos neutralizantes que se correlaciona con una reducción significativa en la recurrencia de la infección por *C. difficile* en el ensayo de terapia con mAb de Merck/Medarex.

En un esfuerzo por mejorar la cinética de las respuestas de la antitoxina B, los NHP se inmunizaron con una dosis constante de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante (10 µg) que se mezcló con una dosis creciente de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (10, 50, o 100 µg) en presencia de adyuvantes ISCOMATRIX o Alh/CpG. Independientemente del adyuvante, hubo una tendencia a que los grupos que recibieron dosis más altas de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (ya sea 50 o 100 µg) induzcan respuestas de neutralización de la antitoxina B más altas en comparación con la dosis de 10 µg de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (Tabla 50, marcado con * para indicar aumentos estadísticamente significativos). Esta tendencia se observó en la mayoría de los puntos de tiempo después de la inmunización final. Sin embargo, en algunos casos, las respuestas de neutralización de la antitoxina A mostraron una disminución estadísticamente significativa (marcada con ^ en la Tabla 49) cuando se incrementó la cantidad de toxina B mutante.

Como se muestra en la Tabla 49 y la Tabla 50, los NHP (10 por grupo) se inmunizaron IM en las semanas 0, 2 y 4 con diferentes proporciones de sustancia farmacológica de la toxina A mutante y sustancia farmacológica de la toxina B mutante (10 µg de sustancia farmacológica de toxina A mutante más 10, 50 o 100 µg de sustancia farmacológica de toxina B mutante; designados 10A:10B, 10A:50B y 10A:100B, respectivamente, en la Tabla 49 y Tabla 50), formulado con ISCOMATRIX (45 U por dosis) o con Alh/CpG/(250 µg/500 µg por dosis). La Tabla 49 muestra los títulos de Antitoxina A. La Tabla 50 muestra los títulos de Antitoxina B. Los GMT se enumeran en las tablas. El intervalo de títulos de protección representa el intervalo de títulos de anticuerpos neutralizantes que se correlaciona con una reducción significativa en la recurrencia de la infección por *C. difficile* en el ensayo de terapia con mAb de Merck. El símbolo ^ representa una disminución estadísticamente significativa en los títulos de neutralización (p <0,05) en comparación con el grupo 10A:10B. El símbolo de asterisco, *, representa un aumento estadísticamente significativo en los títulos de neutralización (p <0,05) en comparación con el grupo 10A:10B.

Tabla 49: Títulos de antitoxina neutralizante en NHP después de la inmunización con 10 µg de sustancia farmacológica de toxina A mutante combinada con 10, 50 o 100 µg de sustancia farmacológica de toxina B mutante utilizando ISCOMATRIX o Alh/CpG como adyuvantes (título de neutralización del 50%)							
Antitoxina A (intervalo de protección de Merck/Medarex: 666 - 6.667 para la antitoxina A) ISCOMATRIX							
Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
Título con 10A:10B:	25	1.283	3.835	19.511	12.904	6.992	7.971
Título con 10A:50B:	29	906	2.917	16.126	^7.756	^4.208	5.965
Título con 10A:100B:	20	982	2.310	^5.034	^5.469	^4.007	3.780
Antitoxina A (Intervalo de protección de Merck/Medarex: 666- 6.667 para la antitoxina A) Alh/CpG							
Título con 10A:10B:	17	1.004	2.162	15.989	7.179	5.049	7.023
Título con 10A:50B:	20	460	1.728	16.600	6.693	6.173	8.074
Título con 10A:100B:	27	^415	1.595	13.601	6.465	5.039	6.153

Tabla 50: Títulos de antitoxina neutralizante en NHP después de la inmunización con 10 µg de sustancia farmacológica de toxina A mutante combinada con 10, 50 o 100 µg de sustancia farmacológica de toxina B mutante utilizando ISCOMATRIX o Alh/CpG como adyuvantes (título de neutralización del 50%) Antitoxina B (intervalo de protección de Merck/Medarex: 222-2.222 para la antitoxina B)

Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
Título con ISCOMATRIX:	10	10	269	5.325	9.161	19.479	25.119
Título:	13	*20	*604	4.861	10.801	20.186	*57.565
Título:	10	*23	*862	*10.658	10.639	*33.725	*56.073
Antitoxina B (intervalo de protección de Merck/Medarex: 222-2.222 para la antitoxina B)							
Título con Alh/CpG	10	13	136	2.163	5.076	9.057	27.971
Título:	10	15	*450	*5.542	*9.843	15.112	50.316
Título:	11	17	*775	*13.533	*11.708	*17.487	26.600

Ejemplo 43: Estudio de toxicidad intramuscular de dosis repetidas de cinco semanas con una composición inmunogénica en monos *Cynomolgus*, con un período de recuperación de 4 semanas

El estudio de toxicidad de dosis repetidas IM de 5 semanas con PF-06425095 (una composición inmunogénica que incluye la sustancia farmacológica de la toxina A triple mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B triple mutante en una combinación con adyuvantes de hidróxido de aluminio y CpG 24555) en monos *Cynomolgus* fue realizado para evaluar la toxicidad potencial e inmunogenicidad de la sustancia farmacológica de la toxina A triple mutante de *C. difficile* y la sustancia farmacológica de la toxina B triple mutante en una combinación con los adyuvantes hidróxido de aluminio y CpG 24555 (PF-06425095). PF-06425095 a razón de 0,2 o 0,4 mg/dosis de la sustancia farmacológica de la toxina A triple mutante y de la sustancia farmacológica de la toxina B triple mutante (grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta, respectivamente), 0,5 mg de aluminio como hidróxido de aluminio y 1 mg de CpG 24555 y la combinación de adyuvante sola (hidróxido de aluminio + CpG 24555; PF-06376915) se administró IM a monos *Cynomolgus* (6/sexo/grupo) como dosis principal seguida de 3 dosis de refuerzo (días 1, 8, 22 y 36). Un grupo separado de animales (6/sexo) recibió solución salina isotónica al 0,9% a un pH aproximado de 7,0. El vehículo de composición inmunogénica estaba compuesto por tampón Tris 10 mM a pH 7,4, trehalosa dihidratada al 4,5% y polisorbato 80 al 0,1%. El vehículo de control adyuvante estaba compuesto por tampón de histidina 10 mM con NaCl 60 mM a pH 6,5. El volumen total de la dosis fue de 0,5 ml por inyección. Todas las dosis se administraron en el músculo cuádriceps izquierdo y/o derecho. Los animales seleccionados se sometieron a un período de observación de 4 semanas sin dosis para evaluar la reversibilidad de cualquier efecto observado durante la fase de dosificación del estudio.

No hubo hallazgos adversos en este estudio. PF-06425095 fue bien tolerado y produjo solo una reacción inflamatoria local sin evidencia de toxicidad sistémica. Durante la fase de dosificación, los aumentos dependientes de la dosis desde la prueba previa en fibrinógeno (23,1% a 2,3x) en los días 4 y 38 y proteína C reactiva en los días 4 (2,1x a 27,5x) y 38 (2,3x a 101,5x), y globulina (11,1% a 24,1%) el día 36 y/o 38, se observaron en grupos tratados con composición inmunogénica y fueron consistentes con la respuesta inflamatoria esperada a la administración de una composición inmunogénica con adyuvante.

Los aumentos en fibrinógeno y proteína C reactiva observados en el día 4 se habían recuperado parcialmente el día 8 con aumentos en fibrinógeno (25,6% a 65,5%) y proteína C reactiva (4,5x y 5,6x) en el grupo de composición inmunogénica de dosis alta únicamente. Se observaron aumentos en la interleucina (IL)-6 en los grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta el día 1, hora 3 (valores individuales de 8,3x a 127,2x el día 1, hora 0, de acuerdo con la dosis) y el día 36, hora 3 (valores individuales de 9,4x a 39,5x, día 36, hora 0). No se observaron cambios en las otras citocinas (IL-10, IL-12, proteína inducible por interferón (IP-10) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α)). Los aumentos en estas proteínas de fase aguda y citocinas eran parte de la respuesta fisiológica normal esperada a la administración de antígeno extraño. No hubo alteraciones relacionadas con PF 06425095 o con adyuvante en estos parámetros de patología clínica en la fase de recuperación (las citocinas no se evaluaron durante la fase de recuperación). Además hubo cambios localizados en los sitios de la inyección que fueron de incidencia y gravedad similares en el grupo de control con adyuvante y los grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta; por lo tanto, no estaban directamente relacionados con PF-06425095. Durante la fase de dosificación, los cambios incluyeron inflamación activa crónica de mínima a moderada que se caracterizó por la separación de las fibras musculares por infiltrados de macrófagos, que a menudo contenían material granular basofílico (interpretado como adyuvante que contenía aluminio), linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos, detritos necróticos y edema. El material granular basofílico también estaba presente extracelularmente dentro de estos focos de inflamación activa crónica. Al final de la fase de recuperación, hubo una inflamación crónica mínima a moderada, e infiltrado celular mononuclear y fibrosis mínima. Estos hallazgos en el lugar de la inyección representan una respuesta inflamatoria local al adyuvante. Otros cambios microscópicos incluían un aumento de la celularidad linfocítica mínima a moderada en el ganglio linfático ilíaco (drenaje) y un aumento mínimo de la celularidad en los centros germinales del bazo que se observaron durante la fase de dosificación en el grupo de control con adyuvante y los grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta. Al final de la fase de recuperación, estos

hallazgos microscópicos fueron de menor gravedad. Estos efectos representan una respuesta inmunológica a la estimulación con antígeno y fueron una respuesta farmacológica al adyuvante o PF-06425095. No hubo un aumento relacionado con el artículo de prueba en los anticuerpos anti-ADN.

- 5 Con base en la ausencia de hallazgos adversos, el nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) en este estudio es el grupo de composición inmunogénica de dosis alta (0,4 mg de sustancia farmacológica de la toxina A triple mutante y sustancia farmacológica de la toxina B triple mutante/dosis como PF-06425095) administrada en dos inyecciones de 0,5 ml para cuatro dosis.

10 **Ejemplo 44: Eficacia de sueros de NHP seropositivos transferidos pasivamente a hámsteres**

15 Se administró a grupos de 5 hámsteres dorados sirios una dosis oral de antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para alterar la flora intestinal normal. Después de cinco días, los hámsteres se expusieron a una dosis oral de esporas de *C. difficile* de tipo silvestre (cepa 630, 100 ufc por animal) y se administraron por vía intraperitoneal (IP) con sueros de NHP de acuerdo con la Tabla 51. Sin estar ligados por mecanismo o teoría, los síntomas de la enfermedad que siguen a la exposición con las esporas se manifiestan típicamente a partir de aproximadamente 30 a 48 horas después de la exposición.

20 Los sueros de NHP que se administraron a los hámsteres se combinaron a partir de muestras de suero de NHP que exhibían el título más alto (sueros de antitoxina A y sueros de antitoxina B) después de tres inmunizaciones con la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (relaciones 10:10, 10:50 y 10:100 de A:B), formuladas con ISCOMATRIX (véase el Ejemplo 42, Tabla 49 y Tabla 50). Los sueros de NHP se recogieron en los puntos de tiempo en las semanas 5, 6 y 8 (las inmunizaciones ocurrieron en las semanas 0, 2 y 4), como se describe en el Ejemplo 42. Los resultados se muestran en las Tablas 52-54 a continuación. El símbolo "+" indica una media geométrica (GM) en () que no incluye al animal # 3, que no respondió.

"*TB" representa sangrado terminal, el día en que se sacrificó al animal, que no es el mismo para todos los animales.

Tabla 51: Diseño experimental				
Grupo	Composición administrada	No. de animales	Vía	Programación
1 "dosis 1"	Sueros de NHP Seropositivo (sin concentrar)	5	IP	Exposición el día 0, Dosis el día 0, Sangrado los días 0, 1, 2, TB el día 11
2 "dosis 2"	Sueros de NHP Seropositivo (sin concentrar)	5	IP	Exposición el día 0, Dosis los días 0, 1, Sangrado los días 0, 1, 2, TB el día 11

Tabla 52: Títulos de neutralización de antitoxina A en sueros de hámster después de 1 o 2 dosis IP de sueros de NHP (título de neutralización del 50% en URL)

	Día	Hámster 1	Hámster 2	Hámster 3	Hámster 4	Hámster 5	GM	SE
1 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	2.877	4.008	2.617	4.917	1.872	3.081	538
	D2	1.983	3.009	2.750	2.902	1.117	2.214	357
	TB*	3.239 (d4)	537 (d9)	155 (d11)	977 (d9)	972 (d2)	762	538
2 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1.154	2.819	50	429	1174	606 (1.131)+	475
	D2	4.119	4.674	1.899	545		2.113	862
	TB*	1.236 (d9)	1.267 (d8)	1.493 (d4)	50 (d11)	1.877 (d9)	738	306

Entrada de sueros de NHP = 41.976

30 Tabla 53: Títulos de neutralización de antitoxina B en sueros de hámster después de 1 o 2 dosis IP de sueros de NHP (título de neutralización del 50% en URL)

	Día	Hámster 1	Hámster 2	Hámster 3	Hámster 4	Hámster 5	GM	SE
1 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1846	4254	1347	5178	406	1859	904
	D2	992	1795	2585	2459	1145	1669	327
	TB*	1744 (d4)	50 (d9)	50 (d11)	265 (d9)	544 (d2)	229	317

(continuación)

Tabla 53: Títulos de neutralización de antitoxina B en sueros de hámster después de 1 o 2 dosis IP de sueros de NHP (título de neutralización del 50% en URL)

	Día	Hámster 1	Hámster 2	Hámster 3	Hámster 4	Hámster 5	GM	SE
2 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1189	2229	50	550	3920	778 (1546)+	687
	D2	2288	2706	1452	287		1268	477
	TB*	301 (d9)	694 (d8)	682 (d4)	50 (d11)	1334 (d9)	394	217

Entrada de sueros de NHP = 23.633

Tabla 54: Porcentaje de hámsteres protegidos de DACD grave después de 1 o 2 dosis IP de sueros de NHP

Días después de la infección	0	2	4	6	8	10	11
1 dosis de sueros de NHP	100%	80%	60%	60%	60%	20%	20%
2 dosis de sueros de NHP	100%	100%	80%	80%	60%	20%	20%
Placebo	100%	75%	50%	25%	0%	n/a	n/a

- 5 En otro estudio, se administró a hámsteres dorados sirios una dosis oral del antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para alterar la flora intestinal normal. Después de cinco días, los hámsteres se expusieron a una dosis oral de esporas de *C. difficile* de tipo silvestre (cepa 630, 100 ufc por animal) y se administraron sueros de NHP por vía intraperitoneal (IP) de acuerdo con la Tabla 55. Sin estar ligados por un mecanismo o teoría, los síntomas de la enfermedad que
- 10 siguen a la exposición con las esporas se manifiestan típicamente a partir de aproximadamente 30-48 horas posteriores a la exposición.

Los sueros de NHP que se administraron a los hámsteres se combinaron a partir de muestras recolectadas de NHP después de tres inmunizaciones con la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (relaciones 10:10, 10:50 y 10:100 A:B), formuladas con Alhydrogel y CpG 24555 (véase el

15 Ejemplo 42, Tabla 49 y Tabla 50). Los sueros de NHP se recolectaron a partir de los puntos de tiempo en las semanas 5, 6, 8 y 12 como se describió en el Ejemplo 42 (los sueros de NHP se inmunizaron en las semanas 0, 2 y 4). Los resultados se muestran en las Tablas 56-59 a continuación. Los sueros de los hámsteres se investigaron adicionalmente para determinar el valor de concentración inhibitoria (CI₅₀), que se determinó usando el ensayo de neutralización de toxinas descrito anteriormente. El nivel de anticuerpos neutralizantes de toxinas inducidos en

20 hámsteres por la composición inmunogénica de *C. difficile* de la invención es comparable a los niveles de anticuerpos en suero en los sujetos del ensayo de Merck/Medarex que parecían estar protegidos de las recurrencias de CDAD.

Tabla 55: Diseño experimental

Grupo	Composición administrada	No.	Vía	Programación
1	Sueros de NHP seropositivos	5	IP	Exposición D0, Dosis D 0, 1, 3, 5, 7
2	Sueros de NHP seropositivos	5	IP	Sin exposición, Dosis D 0, 1, 3, 5, 7
3	Sueros de NHP seropositivos	10	IP	Exposición D0, Dosis D 0, 1, 3, 5, 7
4	Placebo	5	IM	Exposición D 0

25

Tabla 56: Títulos^a de neutralización de antitoxina A en sueros de hámsteres después de 1 o 2 dosis IP de sueros de NHP (título de neutralización del 50% en URL)

Día	Expuesto (Grupos 1 y 3)	No expuesto (Grupo 2)	Valor p
0	11	12	0,5933
1	380	720	0,034*
3	666	1.220	0,0256*
5	864	1.367	0,0391*
7	564	1.688	0,0411*
11	263	1281	0.001*

Entrada del conjunto de sueros de NHP = 9.680

a, títulos expresados como medias geométricas para cada grupo (n = 15 en el día 0 para el grupo "expuesto", n = 5 para el grupo "no expuesto")

Intervalo de protección de Merck/Medarex: 666-6.667 para antitoxina A

El asterisco "*" indica una diferencia significativa.

Tabla 56: Títulos ^a de neutralización de antitoxina A en sueros de hámsteres después de 1 o 2 dosis IP de sueros de NHP (título de neutralización del 50% en URL)			
Día	Expuesto (Grupos 1 y 3)	No expuesto (Grupo 2)	Valor p
0	10	10	0,3343
1	465	828	0,0579
3	765	1400	0,0273*
5	941	1734	0,0226*
7	611	1877	0,0498*
11	194	1436	0,0047*
<p>Entrada del conjunto de sueros de NHP = 19.631</p> <p>a, títulos expresados como medias geométricas para cada grupo (n = 15 en el día 0 para el grupo "expuesto", n = 5 para el grupo "no expuesto")</p> <p>Intervalo de protección de Merck/Medarex: 222-2.222 para antitoxina A</p> <p>El asterisco "*" indica una diferencia significativa.</p>			

Tabla 58: Porcentaje de hámsteres protegidos de DACD grave después de una dosis IP de sueros de NHP							
Día después de la infección	0	2	4	6	8	10	11
Grupos 1 y 3	100%	73%	53%	53%	47%	33%	33%
Placebo (Grupo 2)	100%	50%	0%				

Tabla 59: Valores de Cl_{50} de títulos de neutralización del 50% específicos de la toxina													
	Cl_{50} de antitoxina A												
	Cl_{50} de antitoxina B												
	Días después de la dosis												
Identificación del animal	0	1	3	5	7	11	Identificación del animal	0	1	3	5	7	11
1-1	10	50	338	Muerto D4			1-1	10	50	254	Muerto D4		
1-2	10	614	579	777	605	192	1-2	10	720	659	896	475	157
1-3	10	710	1.035	845	548	Muerto D10	1-3	10	867	1.017	988	694	
1-4	10	850	588	942	1.116	296	1-4	10	1.158	555	1.158	1.806	250
1-5	10	780	895*				1-5	10	910	687*			
3-1	10	647	Muerto D2				3-1	10	598	Muerto D2			
3-2	10	331	Muerto D2				3-2	10	290	Muerto D2			
3-3	10	660	1.273	849	692	640	3-3	10	717	1.623	870	791	574
3-4	10	536	493	1.102	1.314	Muerto D9	3-4	10	618	598	977	1.478	Muerto D9
3-5	10	817	807	774	1.077	187	3-5	10	772	1.260	850	913	243
3-6	10	117	649	803	50	186	3-6	10	1.038	773	883	50	50
3-7	10	50	Muerto D2				3-7	10	50	Muerto D2			
3-8	10	149	659	650*			3-8	10	121	1.010	517*		
3-9	30	797	1.170*				3-9	10	1.008	1.720*			
3-10	10	792	Muerto D2				3-10	10	835	Muerto D2			

(continuación)

Tabla 59: Valores de Cl_{50} de títulos de neutralización del 50% específicos de la toxina													
Cl_{50} de antitoxina A							Cl_{50} de antitoxina B						
Días después de la dosis							Días después de la dosis						
Identificación del animal	0	1	3	5	7	11	Identificación del animal	0	1	3	5	7	11
Media geométrica	11	380	666	864	564	263	Media geométrica	10	465	765	941	611	194
Error estándar	1	78	86	41	163	88	Error estándar	0	94	125	38	224	88
No expuesto	10	697	1.634	1.597	2.219	1.709	2-1	10	890	1.777	1.910	3.229	1.355
	10	779	1.207	1.322	1.755	1.327	2-2	10	939	1.378	1.564	1.897	1.379
	10	581	669	722	1.401	1.118	2-3	10	828	837	865	1.484	1.404
	26	856	1.540	1.875	1.830	1.826	2-4	10	748	1.780	2.939	1.880	2.650
	10	715	1.331	1.668	1.374	744	2-5	10	752	1.475	2.064	1.364	880
	12	720	1.220	1.367	1.688	1.281	Media geométrica	10	828	1.400	1.734	1.877	1.436
	3	46	169	199	156	197	Error estándar	0	38	173	338	332	296
* = fallecido ese día													

Ejemplo 45: Caracterización de sustancias farmacológicas de toxina mutante

La estructura primaria de la toxina A triple mutante se muestra en la SEQ ID NO: 4. El residuo de Met del extremo terminal NH₂ en la posición 1 de la SEQ ID NO: 4 se origina a partir del codón de iniciación de la SEQ ID NO: 12 y está ausente en proteína aislada (por ejemplo, véase la SEQ ID NO: 84). Por consiguiente, en el Ejemplo 12 al Ejemplo 45, la "SEQ ID NO: 4" se refiere a la SEQ ID NO: 4 en la que la metionina inicial (en la posición 1) está ausente. Tanto la toxina A triple mutante purificada (SEQ ID NO: 4) (intermedio de la sustancia farmacológica - Lote L44993-132) como la toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) ("Sustancia farmacológica de la toxina A mutante"- Lote L44898 -012) mostraron una única secuencia del extremo terminal NH₂ comenzando en SLISKEELIKLAYSI (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 4).

La estructura primaria de la toxina B triple mutante se muestra en la SEQ ID NO: 6. El residuo de Met del extremo terminal NH₂ en la posición 1 de la SEQ ID NO: 6 se origina en el codón de iniciación y está ausente en la proteína aislada (por ejemplo, véase la SEQ ID NO: 86). Por consiguiente, en el Ejemplo 12 al Ejemplo 45, la "SEQ ID NO: 6" se refiere a la SEQ ID NO: 6 en la que la metionina inicial (en la posición 1) está ausente. Tanto la toxina B triple mutante purificada (SEQ ID NO: 6) (intermedio de la sustancia farmacológica - Lote 010) como la toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 6) ("sustancia farmacológica de la toxina B mutante" - Lote L44906-153) mostraron una única secuencia del extremo terminal NH₂ comenzando en SLVNRKQLEKMANVR (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 6).

Se usó espectroscopía de dicroísmo circular (CD) para evaluar la estructura secundaria y terciaria de la sustancia farmacológica de la toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4) y la toxina A mutante. La espectroscopia de CD también se utilizó para evaluar la estructura secundaria y terciaria de la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante. La espectroscopia de CD también se utilizó para evaluar los efectos potenciales del pH sobre la estructura. El efecto del tratamiento con EDC sobre la toxina A triple mutante se analizó comparando los datos de CD obtenidos para la sustancia farmacológica de la toxina A mutante con los datos obtenidos para la toxina A triple mutante. Los efectos del tratamiento con EDC sobre la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) se analizaron comparando los datos de CD obtenidos para la sustancia farmacológica de la toxina B mutante con los datos obtenidos para la toxina B triple mutante.

Se obtuvieron datos de CD de UV lejano de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante a varios pH. Los espectros registrados a pH 5,0-7,0 son indicativos de una alta proporción de hélices α en la estructura secundaria, lo que sugiere que la estructura polipeptídica de la proteína adopta una conformación bien definida dominada por hélices α .

También se obtuvieron espectros de CD de UV cercano de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante. La elipticidad negativa fuerte entre 260 y 300 nm es una indicación de que las cadenas laterales aromáticas se encuentran en el entorno rígido único, es decir, la sustancia farmacológica de la toxina A mutante, posee una estructura terciaria. De hecho, los rasgos característicos que surgen de los tipos individuales de cadenas laterales aromáticas se pueden distinguir dentro del espectro: el hombro a ~290 nm y el pico negativo más grande a ~283 nm se deben a la absorbancia de la luz polarizada por las cadenas laterales de triptófano ordenadas, pico negativo en 276 nm es de las cadenas laterales de tirosina, y los hombros menores a 262 y 268 nm son indicativos de los residuos de fenilalanina que participan en contactos terciarios. Los resultados de UV lejano y cercano proporcionan evidencia de que la sustancia farmacológica de la toxina A mutante retiene una estructura plegada compacta a pH fisiológico. Los espectros de CD de UV lejano y cercano casi idénticos observados a pH 5,0 - 7,0 indican que no se están produciendo cambios estructurales detectables dentro de este intervalo de pH. Los datos de CD no se pudieron recolectar a pH 3,0 y 4,0 ya que la proteína era insoluble en estos puntos de pH. Al comparar los espectros de CD de UV lejano y cercano de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante con los de la toxina A triple mutante, los espectros de ambas proteínas son esencialmente idénticos en todas las condiciones experimentales estudiadas, lo que indica que el tratamiento con EDC no tuvo efectos detectables en estructura secundaria y terciaria de la toxina A triple mutante. Este hallazgo está de acuerdo con los resultados de la filtración en gel y la ultracentrifugación analítica, que no muestran cambios detectables en los radios de Stokes y los coeficientes de sedimentación/fricción, respectivamente.

La sustancia farmacológica de la toxina A mutante (así como la toxina A triple mutante) contiene 25 residuos de triptófano que se extienden por la secuencia primaria y pueden servir como sondas de fluorescencia intrínsecas convenientes. Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante entre 300 y 400 nm en función de la temperatura. A 6,8 °C, la sustancia farmacológica de la toxina A mutante muestra un espectro de emisión de fluorescencia de triptófano característico tras la excitación a 280 nm. El máximo de emisión de fluorescencia se observa a ~ 335 nm, lo que indica que los residuos de triptófano se encuentran en un entorno no polar, típico de los interiores de las proteínas más que de los entornos acuosos polares. Los resultados de los espectros de emisión de fluorescencia, junto con los resultados de los experimentos de CD presentados en este informe, confirman que la sustancia farmacológica de la toxina A mutante conserva la estructura plegada compacta.

Se usó la fluorescencia de la sonda extrínseca del ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS) para caracterizar los posibles cambios conformacionales en la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la toxina A triple mutante tras los cambios de pH. Como se puede observar a partir de los resultados, esencialmente no hay un aumento en la intensidad de fluorescencia del ANS cuando se titula la sustancia farmacológica de la toxina A mutante o la toxina A triple mutante con la sonda a pH 7,0, lo que sugiere que no hay superficies hidrófobas expuestas en las proteínas bajo estas condiciones. El cambio de pH a 2,6 conduce a un aumento espectacular en el rendimiento cuántico de fluorescencia ANS al aumentar la concentración de la sonda, hasta que el rendimiento cuántico de fluorescencia alcanza la saturación aparente. Este aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia de ANS indica que a pH bajo (2,6), tanto la sustancia farmacológica de la toxina A mutante como la toxina A triple mutante experimentan un cambio conformacional inducido por el pH que expone las superficies hidrófobas. Tales cambios conformacionales indican que la modificación e inactivación inducida por EDC de la toxina A triple mutante no restringió la plasticidad conformacional de la sustancia farmacológica (DS) de la toxina A mutante.

Se evaluó el efecto del tratamiento con EDC sobre las propiedades hidrodinámicas de la toxina A triple mutante usando cromatografía de exclusión por tamaño en una columna G4000 SWXL. Se inyectaron la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y de la toxina A triple mutante en la columna G4000 SWXL equilibrada a pH 7,0, 6,0 y 5,0. Los datos indican que no se pueden detectar diferencias en el radio de Stokes de la sustancia farmacológica de la toxina A mutante y la toxina A triple mutante usando cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, el tratamiento con EDC no ha afectado drásticamente las propiedades hidrodinámicas y, en consecuencia, la forma molecular general de la toxina triple mutante A.

Se realizó un análisis adicional de la toxina A triple mutante y la sustancia farmacológica de la toxina A mutante usando la técnica de dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS). El tratamiento de la toxina A triple mutante con EDC dio como resultado la generación de una mezcla heterogénea compuesta de varias especies multiméricas y monoméricas. Tal heterogeneidad refleja la introducción de un gran número de enlaces covalentes inter e intramoleculares inducidos por EDC entre carboxilos y aminas primarias de la proteína.

Los datos obtenidos proporcionan características físicas y químicas de la sustancia farmacológica de la toxina A triple mutante y la toxina A mutante (toxina A triple mutante tratada con EDC) y describen las características clave de su estructura primaria, secundaria y terciaria. Los datos generados demuestran que el tratamiento de la toxina A triple mutante con EDC dio como resultado una modificación covalente de su cadena polipeptídica pero no afectó a las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. El tratamiento con EDC conduce a entrecruzamiento intra e intermolecular. Los parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para la sustancia farmacológica de la toxina A mutante (así como para la toxina A triple mutante) se presentan en la Tabla 60.

Tabla 60: Principales parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para la toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4) y la sustancia farmacológica de la toxina A mutante

Parámetro	Toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4)	Sustancia farmacológica de la toxina A mutante
Número de residuos de aminoácidos	2.709	2.709
Secuencia de extremo terminal N	SLISKEELIKLAYSI (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 4)	SLISKEELIKLAYSI (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 4)
Masa molar (de la secuencia de AA)	308 kDa	308 kDa
Masa molar (de SEC-MALLS)	299 kDa	300 kDa y 718 - 1.139 kDa
Coefficiente de extinción a 280 nm	1,292 o 1,275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,292 o 1,275 275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
Platos teóricos	5,57	ND
Volumen molar específico parcial a 20 °C	0,735 cm ³ /g	0,735 cm ³ /g
Volumen anhidro/monómero	3,8 x 10 ⁻¹⁹ cm ³	3,8 x 10 ⁻¹⁹ cm ³
Coefficiente de sedimentación/monómero	9,2 S	9,2 S
Relación de coeficiente de fricción (f/f ₀)	1,69	1,69
Radio de Stokes /monómero	78,4 ± 1,1	77,9
Fluorescencia máx. (λ _{ex} = 280 nm)	334 - 335 nm	334 - 335 nm
Mínimos del espectro de CD de UV cercano	284 nm y 278 nm	284 nm y 278 nm
Elipticidad de resolución media a 284 y 278 nm	-138 ± 7 y -130 ± 7	-138 ± 8 y 131 ± 10

(continuación)

Tabla 60: Principales parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para la toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4) y la sustancia farmacológica de la toxina A mutante		
Parámetro	Toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4)	Sustancia farmacológica de la toxina A mutante
Elipticidad de resolución media a 222 nm	-8.989 ± 277	-7.950 ± 230
Máximos de las transiciones no plegadas de DSC (PBS, pH 7,4)	47,3 °C y 53,6 °C	47,9 ± 0,2 °C y 54,1 ± 0,2 °C

Se obtuvieron datos de CD de UV lejano de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante a varios pH. Los espectros registrados a pH 5,0 - 7,0 son indicativos de una alta proporción de hélices α en la estructura secundaria, lo que sugiere que la estructura polipeptídica de la proteína adopta una conformación bien definida dominada por hélices α .

También se obtuvieron espectros de CD de UV cercano de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante. La elipticidad negativa fuerte entre 260 y 300 nm es una indicación de que las cadenas laterales aromáticas se encuentran en el entorno rígido único, es decir, la sustancia farmacológica de la toxina B mutante posee una estructura terciaria. De hecho, los rasgos característicos que surgen de los tipos individuales de cadenas laterales aromáticas se pueden distinguir dentro del espectro: el hombro a ~290 nm y el pico negativo más grande a ~283 nm se deben a la absorbancia de la luz polarizada por las cadenas laterales de triptófano ordenadas, el pico negativo en 276 nm es de las cadenas laterales de tirosina, y los hombros menores a 262 y 268 nm son indicativos de los residuos de fenilalanina que participan en contactos terciarios. Los espectros de CD de UV lejano y cercano proporcionan evidencia de que la sustancia farmacológica de la toxina B mutante retiene la estructura plegada de forma compacta a pH fisiológico. Espectros de CD de UV lejano y cercano muy similares observados a pH 5,0 - 7,0 indican que no se están produciendo cambios estructurales secundarios o terciarios detectables dentro de este intervalo de pH. Los datos de CD no se pudieron recolectar a pH 3,0 y 4,0, ya que la proteína era insoluble en estos puntos de pH.

Al comparar los espectros de CD de UV lejano y cercano de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante con los de la toxina B triple mutante, los espectros de ambas proteínas son muy similares entre pH 5,0 y 7,0, lo que indica que el tratamiento con EDC no tuvo efectos detectables sobre la estructura secundaria y terciaria de la proteína.

La toxina B triple mutante contiene 16 residuos de triptófano que se extienden por la secuencia primaria y pueden servir como sondas de fluorescencia intrínsecas convenientes. Se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante entre 300 y 400 nm en función de la temperatura. A 7 °C, la sustancia farmacológica de la toxina B mutante muestra un espectro de emisión de fluorescencia de triptófano característico tras la excitación a 280 nm. El máximo de emisión de fluorescencia se observa a ~335 nm, lo que indica que los residuos de triptófano se encuentran en un entorno no polar, típico de los interiores de las proteínas más que de los entornos acuosos polares. Este resultado, junto con los resultados de los experimentos de CD (véase arriba), confirman que la sustancia farmacológica de la toxina B mutante retiene la estructura plegada compacta.

Se usó fluorescencia de la sonda extrínseca del ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS) para caracterizar posibles cambios conformacionales en la sustancia farmacológica de la toxina B mutante y la toxina B triple mutante tras cambios en el pH. Como se puede observar a partir de los resultados, esencialmente no hay aumento en la intensidad de fluorescencia del ANS cuando se titula la sustancia farmacológica de la toxina B mutante o la toxina B triple mutante con la sonda a pH 7,0, lo que sugiere que no hay superficies hidrófobas expuestas en las proteínas bajo estas condiciones. El cambio de pH a 2,6 conduce a un aumento espectacular en el rendimiento cuántico de fluorescencia de ANS al aumentar la concentración de la sonda en presencia de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante, hasta que el rendimiento cuántico de fluorescencia alcanza la saturación aparente. Este aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia de ANS indica que a pH bajo (2,6), la sustancia farmacológica de la toxina B mutante sufre un cambio conformacional inducido por el pH que expone las superficies hidrófobas. Dichos cambios conformacionales indican que la modificación e inactivación inducidas por EDC de la toxina B triple mutante no restringió la plasticidad conformacional de la sustancia farmacológica (DS) de la toxina B mutante.

Se evaluó el efecto del tratamiento con EDC sobre las propiedades hidrodinámicas de la toxina B triple mutante usando cromatografía de exclusión por tamaño en una columna G4000 SWXL. Se inyectaron la sustancia farmacológica de la toxina B mutante y la toxina B triple mutante en la columna G4000 SWXL equilibrada a pH 7,0, 6,0, 5,0. Los datos indican que no se pueden detectar diferencias en el radio de Stokes de la sustancia farmacológica de la toxina B mutante y la toxina B triple mutante mediante cromatografía de exclusión por tamaño,

por lo que el tratamiento con EDC no ha afectado drásticamente las propiedades hidrodinámicas y, en consecuencia, la forma molecular general de la proteína.

Se realizó un análisis adicional de la sustancia farmacológica de la toxina B triple mutante y la toxina B mutante usando la técnica de dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS). El tratamiento de la toxina B triple mutante con EDC dio como resultado la generación de una mezcla más heterogénea que se compone de varias especies multiméricas y monoméricas. Tal heterogeneidad refleja la introducción de un gran número de enlaces covalentes inter e intramoleculares inducidos por EDC entre carboxilos y aminas primarias de la proteína.

Los datos obtenidos proporcionan características físicas y químicas de la sustancia farmacológica de la toxina B triple mutante y la toxina B mutante (toxina B triple mutante tratada con EDC) y describen las características clave de su estructura primaria, secundaria y terciaria. Los datos generados demuestran que el tratamiento de la toxina B triple mutante con EDC dio como resultado una modificación covalente de su cadena polipeptídica pero no afectó a las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. El tratamiento con EDC conduce a entrecruzamiento intra e intermolecular. Los principales parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para la sustancia farmacológica de la toxina B mutante (así como para la toxina B triple mutante) se presentan en la Tabla 61.

Tabla 61: Principales parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) y la sustancia farmacológica de la toxina B mutante		
Parámetro	Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)	Sustancia farmacológica de la toxina B mutante
Numero de residuos de amino ácidos	2.365	2.365
Secuencia del extremo terminal N	SLVNRKQLEKMANVR (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 6)	SLVNRKQLEKMANVR (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 6)
Masa molar (de la secuencia de AA)	269,5 kDa	269,5 kDa
Masa molar (de SEC-MALLS)	255 kDa y ~1.754 kDa	264, 268, 706, y 2.211 kDa
Coeficiente de extinción a 280 nm	1,067 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,067 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
Platos teóricos	4,29	ND
Volumen molar específico parcial a 20 °C	0,734 cm ³ /g	0,734 cm ³ /g
Volumen anhidro/monómero	3,3 x 10 ⁻¹⁹ cm ³	3,3 x 10 ⁻¹⁹ cm ³
Coeficiente de sedimentación/monómero	9,1 ± 0,2 S	9,4 S
Relación de coeficiente de fricción (f/f ₀)	1,58 ± 0,03	1,53
Radio de Stokes /monómero	76,2	76,2
Fluorescencia máx. (λ _{ex} = 280 nm)	335 nm	335 nm
Bandas negativas de CD de UV cercano	290, 283, 276, 268, 262 nm	290, 283, 276, 268, 262 nm
Bandas negativas de CD de UV lejano	208 y 222 nm	208 y 222 nm
Puntos medios de las transiciones no plegadas de DSC T _{m1} y T _{m2} (PBS, pH 7,0)	48,8 ± 0,0 °C y 52,0 ± 0,1 °C	48,2 ± 0,3 °C y 54,3 ± 0,2 °C

Ejemplo 46: Fermentación por perfusión para el toxoide B (triple mutante)

Cultivos de semillas de toxoide B (triple mutante): se inocula cada botella de 1 litro que contiene 400 ml de medio con 1 ml de semilla, se incuba a 37 °C, en reposo durante la noche (aproximadamente 15 horas). La DO₆₀₀ final debe ser de 3,0 a 4,0. Volumen de trabajo: 3 litros (2,7 litros de medio + 300 ml de inóculo). Cada fermentador tenía 1 impulsor Rushton y un burbujeador tubular. Condiciones iniciales: Temperatura: 37 °C, flujo de N₂: -0,5 vvm, burbujeador. Controladores: pH controlado a 7,0 con NaOH 5N. Espuma controlada por adición automática de PPG-2000, con 0,25 ml/l añadidos al medio del fermentador antes de la esterilización.

Se realizó un cultivo de perfusión de *C. difficile* usando una pila de 2 casetes de láminas SARTOCON, tamaño de poro de 0,2 μm de material de filtro HYDROSART, área de superficie de 0,1 metros cuadrados por casete. Los 3 litros se agregaron a los fermentadores en los fermentadores de vidrio de 10 litros. La perfusión comenzó cuando la DO alcanza el objetivo durante 4 intervalos de ~2 horas de velocidad creciente tal como 0,75 l/h, 1,5 l/h, 2,25 l/h, 3 l/h, por ejemplo 1, Figura 28. La perfusión se iniciará con medio de fermentación cuando la DO alcance el objetivo durante 4 intervalos de ~2 horas de velocidad creciente tal como 0,75 l/h, 1,5 l/h, 3 l/h y 6 l/h, por ejemplo 2, Figura

29. A la señal de inicio de la perfusión, se puso en marcha la bomba de recirculación a la velocidad deseada con un flujo cruzado de 1,3 l/min.

Ejemplo 1, Figura 28: Se obtuvieron la DO 50 final y el título del toxoide B de 243 mg/l.

5 Ejemplo 2, Figura 29: Se obtuvieron la DO 59 final y el título del toxoide B de 306 mg/l.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo que comprende hidrolizado de soja, extracto de levadura, un protector celular y glucosa como fuente de carbono, en el que el medio comprende una bacteria *Clostridium difficile*, en el que la bacteria carece del polinucleótido endógeno que codifica una toxina, en el que la bacteria comprende un polinucleótido que codifica una toxina A o B mutante de *C. difficile* que es inmunogénica y exhibe citotoxicidad reducida en comparación con su forma de tipo silvestre y en la que la bacteria comprende además un promotor de ferredoxina (*fdx*) de *Clostridium sporogenes* que dirige la expresión de dicha toxina mutante.
2. El medio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho protector celular es polipropilenglicol 2000.
3. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que además comprende manitol.
4. El medio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un derivado de cloranfenicol.
5. El medio de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho derivado de cloranfenicol es tiamfenicol.
6. El medio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la bacteria se deriva de *C. difficile* VPI 11186.
7. El medio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la bacteria comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
8. Un procedimiento de cultivo de *Clostridium difficile* que comprende cultivar *C. difficile* en un medio, en el que el medio comprende hidrolizado de soja, extracto de levadura, un protector celular y glucosa como fuente de carbono, y en el que el medio comprende una bacteria de *Clostridium difficile* derivada de VPI 11186, en el que la bacteria carece del polinucleótido endógeno que codifica una toxina, en el que la bacteria comprende un polinucleótido que codifica una toxina A o B mutante de *C. difficile* que es inmunogénica y que exhibe citotoxicidad reducida en comparación con su forma de tipo silvestre, en el que la bacteria comprende además un promotor de ferredoxina (*fdx*) de *Clostridium sporogenes* que dirige la expresión de dicha toxina mutante.
9. Un procedimiento de producción de una toxina de *Clostridium difficile* que comprende cultivar *C. difficile* en un medio bajo condiciones adecuadas para producir una toxina y aislar la toxina del medio; en el que el medio comprende hidrolizado de soja, extracto de levadura, un protector celular y glucosa como fuente de carbono, y en el que el medio comprende una bacteria *Clostridium difficile* derivada de VPI 11186, en el que la bacteria carece del polinucleótido endógeno que codifica una toxina, en el que la bacteria comprende un polinucleótido que codifica una toxina A o B mutante de *C. difficile* que es inmunogénica y que exhibe citotoxicidad reducida en comparación con su forma de tipo silvestre, en el que la bacteria comprende además un promotor de ferredoxina (*fdx*) de *Clostridium sporogenes* que dirige la expresión de dicha toxina mutante.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en el que dicho protector celular es polipropilenglicol 2000.

FIG. 1A

```

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
*****

LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
*****

WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
*****

EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYSQINKPTVPT 200
*****

IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
*****

LNIYSQELLNRCNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFEFTI 300
LNIYSQELLNRCNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLAVAMPLPGIHSDFEFTI 300
LNIYSQELLNRCNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFEFTI 300
LNIYSQELLNRCNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFEFTI 300
LNIYSQELLNRCNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFEFTI 300
*****

SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
*****

```

FIG. 1B

SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400

QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 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

SKNPKNISIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNISIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNISIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNISIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNISIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650

TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGA 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700

FIG. 1C

```

NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEVRRINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEVRRINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEVRRINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKDSITIGANQYEVRRINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKDSITIGANQYEVRRINS 750
*****.*****

EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
*****

SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYEEKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYEEKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYEEKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYEEKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYEEKLEPVKNII 850
*****

HNSIDDLIDEFNLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
*****

RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
*****

QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
*****

NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPPTITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPPTITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPPTITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPPTITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPPTITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
*****

```

FIG. 1D

```

LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
*****

ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSES KKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSES KKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSES KKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSES KEYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSES KEYGPLKTEDDKILVPID 1150
*****;*****

DLVISEIDFNNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
***** *****

SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENNGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENNGT 1250
***;*****;*****;*****

RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTN IKIKLDK DTRNFI 1300
RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTN IKIKLDK DTRNFI 1300
RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTN IKIKLDK DTRNFI 1300
KL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTN TKIKLDK DTRNFI 1300
KL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTN TKIKLDK DTRNFI 1300
:***** *****

MPTITTTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISMNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISMNINLSKDDLWIFNID 1350
*****;***** *****

NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDN KD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDN KD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDN KD 1400
NEVREISIENGTIKKGNLIEDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDN KD 1400
NEVREISIENGTIKKGNLIEDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDN KD 1400
*****;*:*****

```

FIG. 1E

```

RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
*****

```

```

LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNGST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNGST 1500
*****

```

```

LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
*****

```

```

KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHNTSNFMNLFLENNISFWKLFQFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHNTSNFMNLFLENNISFWKLFQFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHNTSNFMNLFLENNISFWKLFQFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHNTSNFMNLFLENNISFWKLFQFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHNTSNFMNLFLENNISFWKLFQFENI 1600
*****

```

```

NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
*****

```

```

RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
*****

```

```

INTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKRWSTEGSDFILVR 1750
INTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKRWSTEGSDFILVR 1750
INTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKRWSTEGSDFILVR 1750
INTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKRWSTEGSDFILVR 1750
INTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKRWSTEGSDFILVR 1750
*****

```

FIG. 1F

```

YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
*****

NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850
*****

VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAALTSYKIINGKHFFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
*****

GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
*****

NEKYYFNPNNIAAAGVLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGVLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGVLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGVLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGVLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
*****

DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
*****

GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
*****

```

FIG. 1G

```

WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
*****;*****;

FYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
***** *****;*****;*****

KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNAAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNAAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
*****;***; *;***** *****

LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
*****

AIVYQNKFLTNGKKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
***** ***** *;****

TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGYTSINGKHFY 2400
TIDGKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASGYTIINGKHFY 2400
TIDGKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASGYTIINGKHFY 2400
****;*****;*****;***** *****

FNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGK 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2450
*****;*****;*****

```

FIG. 1H

```

YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
*****

```

```

STGYTIISGKHFYFNTDQIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIISGKHFYFNTDQIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIISGKHFYFNTDQIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIISGKHFYFNTDQIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIISGKHFYFNTDQIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
*****

```

```

YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWATIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWATIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
*****

```

```

NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650
NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650
*****

```

```

GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 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

```

MSLVNRKQLEKMANVRFRRTQEDEYVAILDAL EYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRRTQEDEYVAILDAL EYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRRTQEDEYVAILDAL EYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDAL EYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDAL EYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
*****

DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
*****

VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKT VVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFPRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKT VVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFPRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKT VVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFPRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTIVESATNDTLESFRENLDNPRFDYNKFYRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTIVESATNDTLESFRENLDNPRFDYNKFYRKRMEIY 180
*****

DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKVTENSGNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKVTENSGNDV 240
*****

RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLAVAMLEPGIQPDLFES 300
RNFEEFKGGESFKLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGVYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
RNFEEFKGGESFKLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGVYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
*****

IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMVLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMVLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
*****

SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
*****

DNDFNTTNTTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFNTTNTTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFNTTNTTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480

```

FIG. 2B

```

DNDENTTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDENTTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
*****;*****

LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKKNYFE 540
*****;***

GSLGEDDNLDIFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDIFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDIFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDIFSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDIFSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
*****

TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
*****

DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
*****;*****;*****;*****;*****;*****;**

DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRLINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISSKEYISF 780
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRLINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISSKEYISF 780
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRLINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISSKEYISF 780
DKVSELMPSISQDSIIVSANQYEVRLINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISSKEYISF 780
DKVSELMPSISQDSIIVSANQYEVRLINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISSKEYISF 780
**;*****

NPKENKITVKSKNLPPELSTLLQEI RNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPPELSTLLQEI RNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPPELSTLLQEI RNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKIIVKSKNLPPELSTLLQEI RNNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
NPKENKIIVKSKNLPPELSTLLQEI RNNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
***** *****;*****;*****;*****;*****;*****;***

IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLI ESISDALCDLKQONELED SHFISFEDIS ETDGEGFSIRF 900
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLI ESISDALCDLKQONELED SHFISFEDIS ETDGEGFSIRF 900
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLI ESISDALCDLKQONELED SHFISFEDIS ETDGEGFSIRF 900
IEEAKSLTSDSINYIKNEFKLI ESISDALYDLKQONELEESHFISFEDILETDGEGFSIRF 900
IEEAKSLTSDSINYIKNEFKLI ESISDALYDLKQONELEESHFISFEDILETDGEGFSIRF 900
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

```


FIG. 2D

```

GTYALSLSQYNMNIENLNENDTWVIDVDNVVRDVTIESDKIKKGLIENILSKLSIEDN 1380
GTYALSLSQYNMNIENLNENDTWVIDVDNVVRDVTIESDKIKKGLIENILSKLSIEDN 1380
*****.*.*.*:*****.***.***;*

KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTFSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKILTMANS 1440
KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTFSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKILTMANS 1440
****.******:*.*****:*****.***

NHIQQKIDYIGFNSSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPDVLISKVYMD 1500
NHIQQKIDYIGFNSSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPDVLISKVYMD 1500
NHIQQKIDYIGFNSSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPDVLISKVYMD 1500
NSVQQKIDYIGLNSSELQKNIPYSFMDDKGKENGFINCSTKEGLFVSELSDVVLISKVYMD 1500
NSVQQKIDYIGLNSSELQKNIPYSFMDDKGKENGFINCSTKEGLFVSELSDVVLISKVYMD 1500
*:******:*.*****:*.*****.******

DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLODEKTIKLNsvHlDES 1560
DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLODEKTIKLNsvHlDES 1560
DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLODEKTIKLNsvHlDES 1560
NSKPLFGYCSNDLKDVKVITKDDVILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLDEN 1560
NSKPLFGYCSNDLKDVKVITKDDVILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLDEN 1560
:*** ***:*****:*****:***:*****.*:***.

GVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESNMNIXSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESNMNIXSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESNMNIXSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNKKGSTNTSDSLMSFLESNMNIXSIFNSLQSNITKLILDNTFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNKKGSTNTSDSLMSFLESNMNIXSIFNSLQSNITKLILDNTFIISGTTSIGQ 1620
*****.*.*****:*****.* *****:***:*****

FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDKDNNIIPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDKDNNIIPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
*****.:*****:*****

LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPIYEANNTYPEVIVLDNTYISEKINININDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPIYEANNTYPEVIVLDNTYISEKINININDLSIRY 1740
*****.******:*.*****:***.***.******

VWSNDGNDFFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVEFKDKTLANKLSFNFSQKQDVPVSEIILSFT 1800
VWSNDGNDFFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVEFKDKTLANKLSFNFSQKQDVPVSEIILSFT 1800
VWSNDGNDFFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVEFKDKTLANKLSFNFSQKQDVPVSEIILSFT 1800
VWSNDGSDFFILMSTDEENKVSQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFSQKQDVSINKVISTFT 1800
VWSNDGSDFFILMSTDEENKVSQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFSQKQDVSINKVISTFT 1800
*****.******:*.*****:***.***.******

```

FIG. 2E

[illegible]

Fig 2F

```

KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
****.***** ****.*****.*****.***.***.*****.* **.*.*****

KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
* ***.***.*****

AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 2, 630)
AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 25, VPI10463)
AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 6)
AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 21, R20291)
AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 23, CD196)
*****

```

FIG. 3

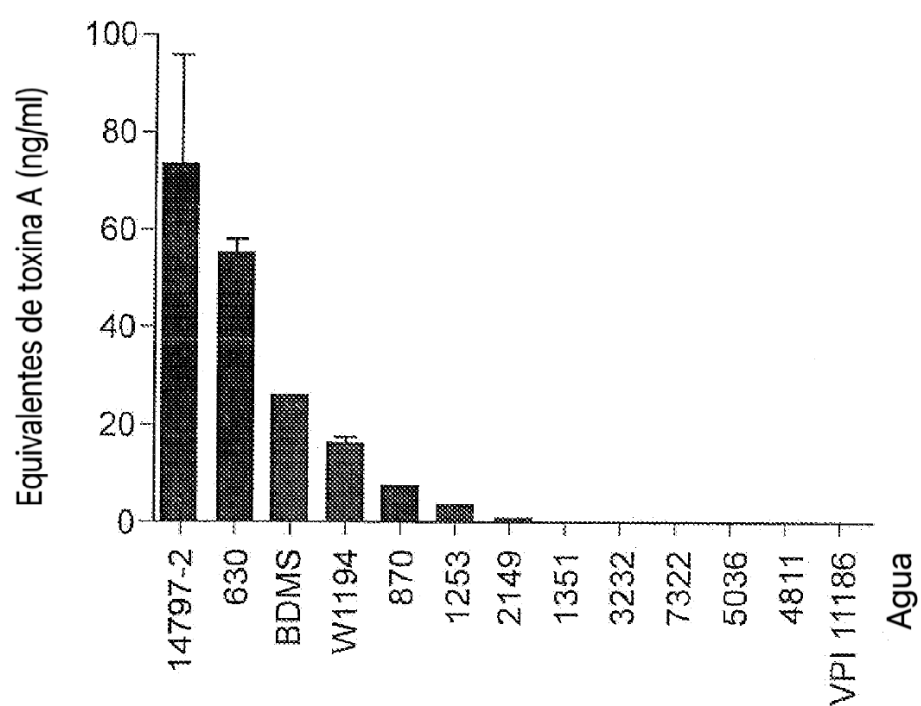


FIG. 4A

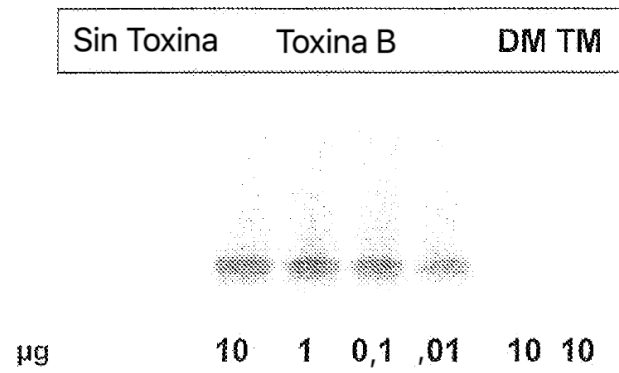


FIG. 4B

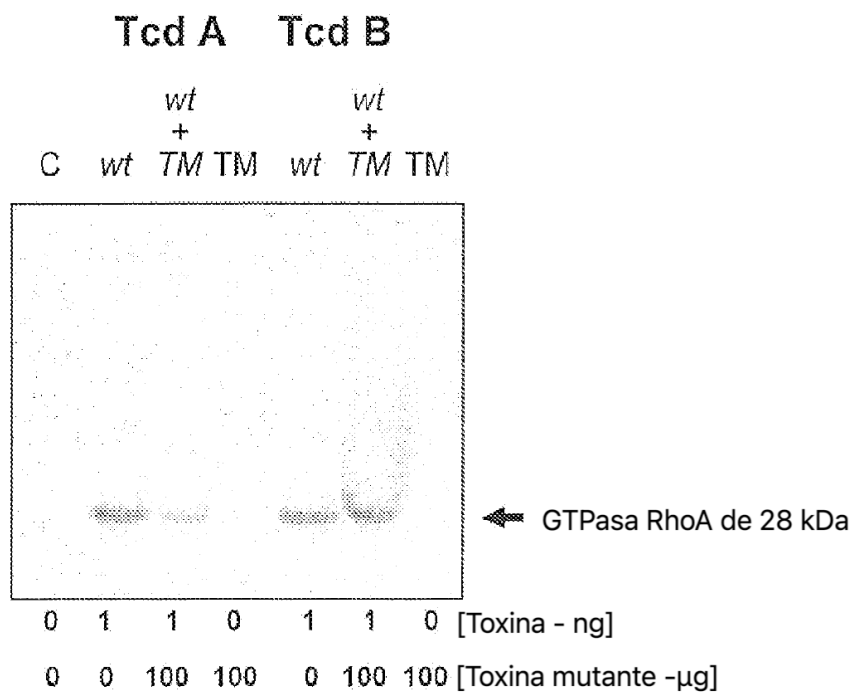


FIG. 5

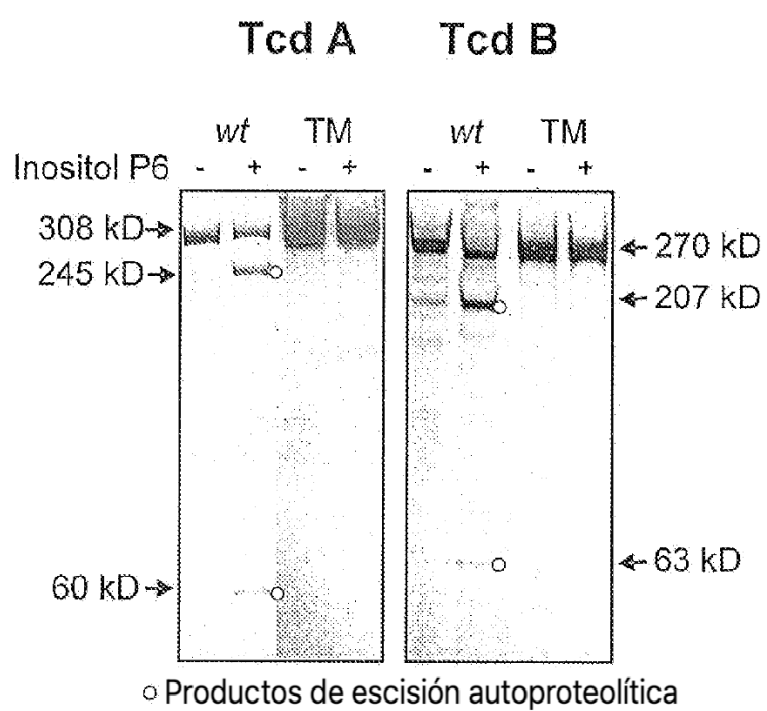


FIG. 6

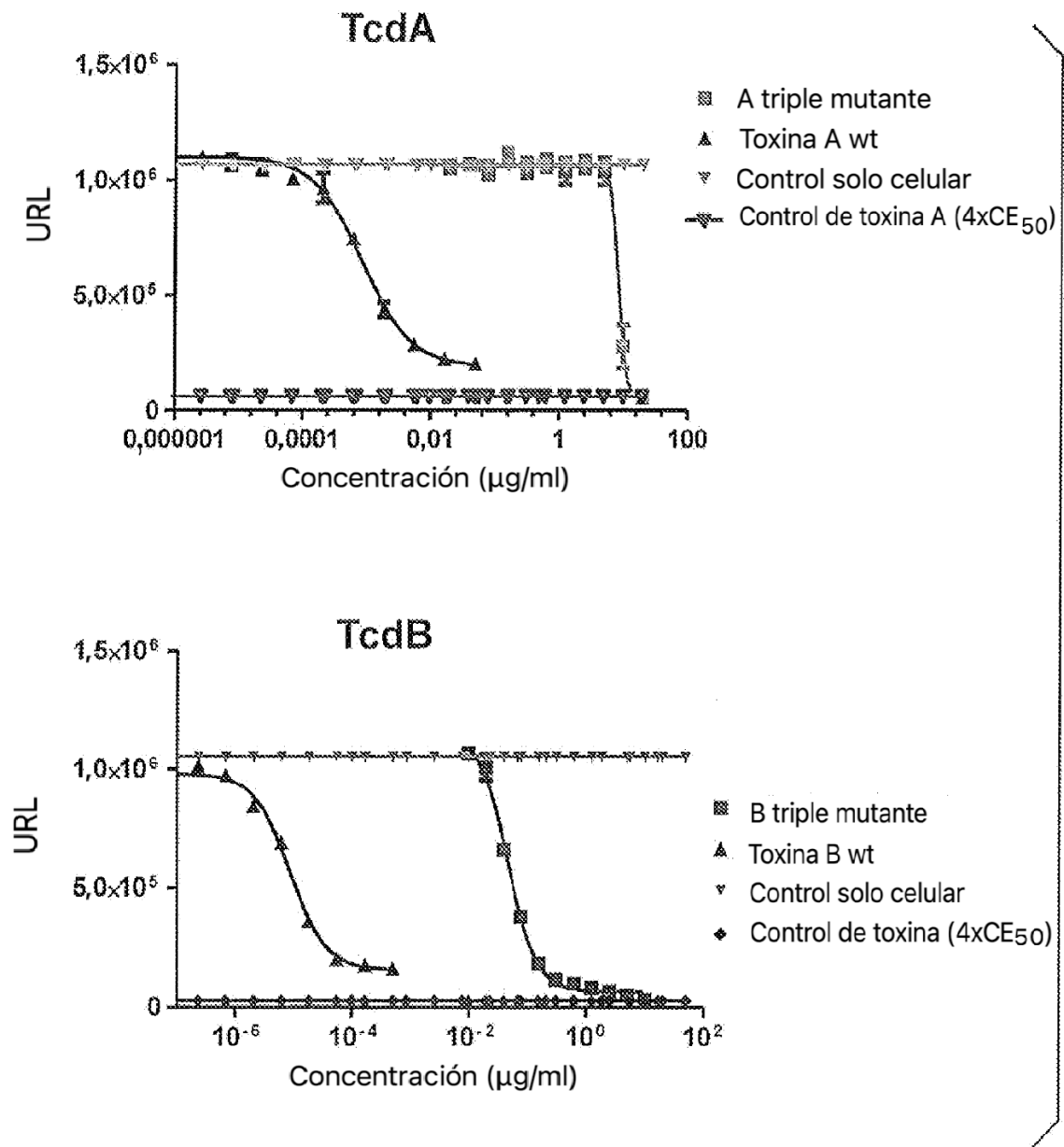
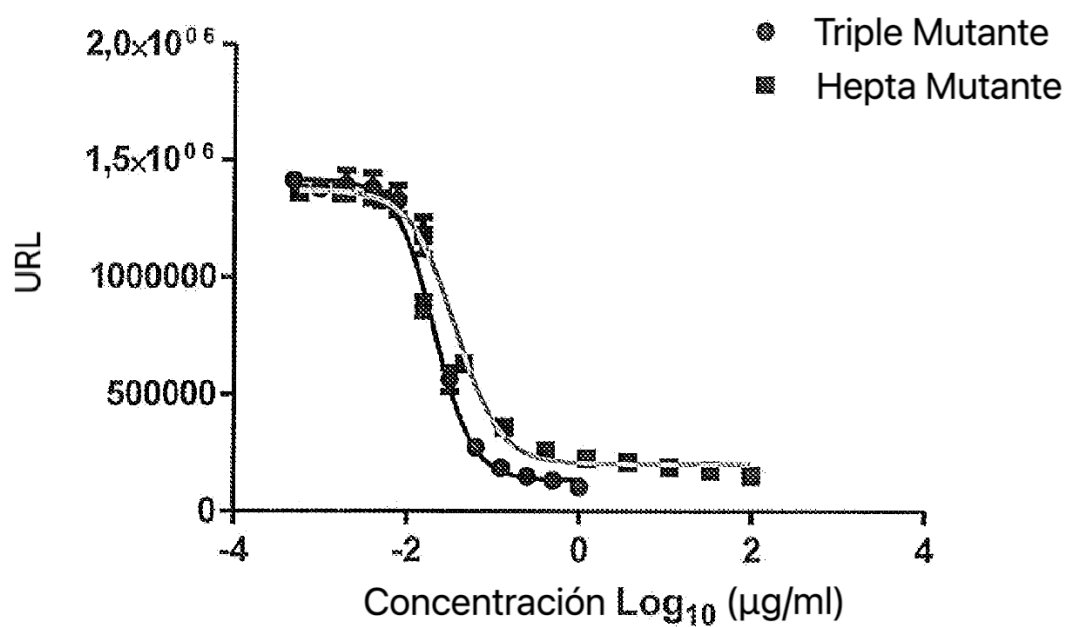


FIG. 7



	Triple Mutante	Hepta Mutante
CE_{50}	0,02078	0,03590

FIG. 8

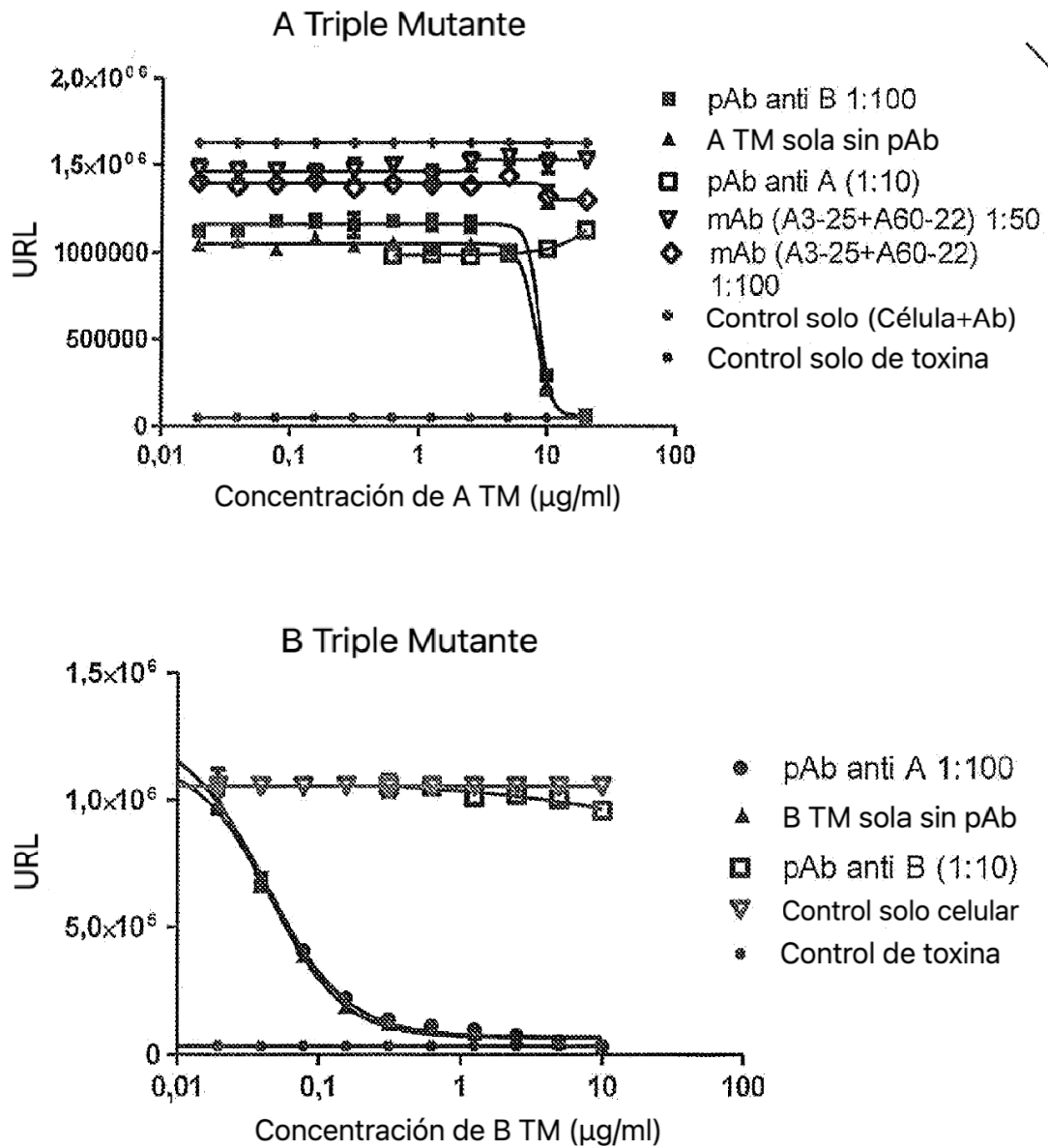
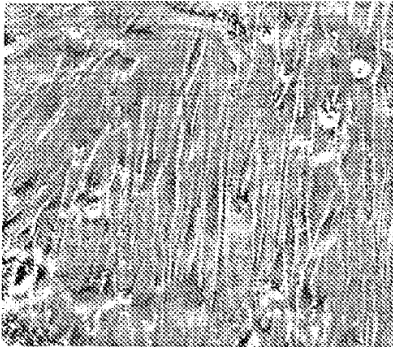
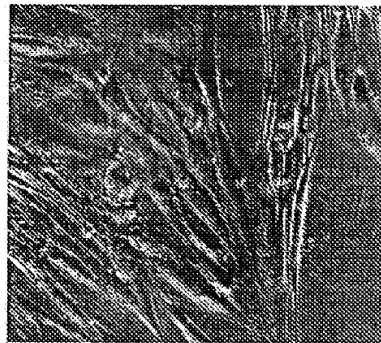


FIG. 9

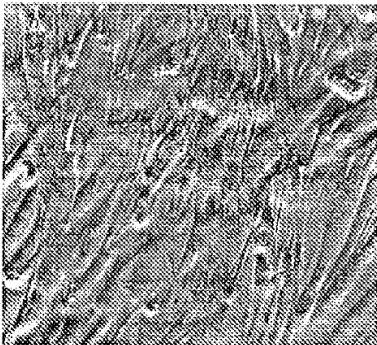
A



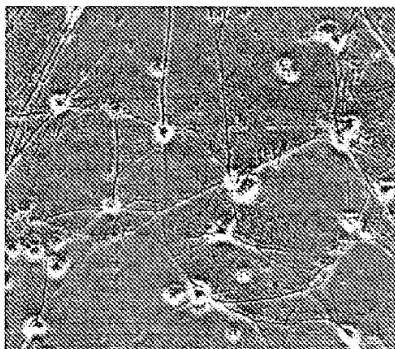
B



C



D



E

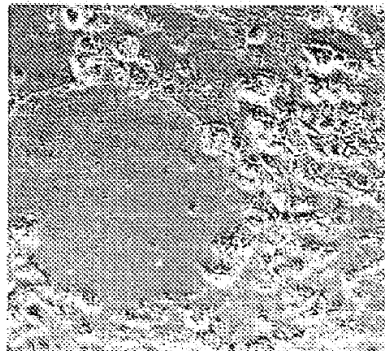


FIG. 10

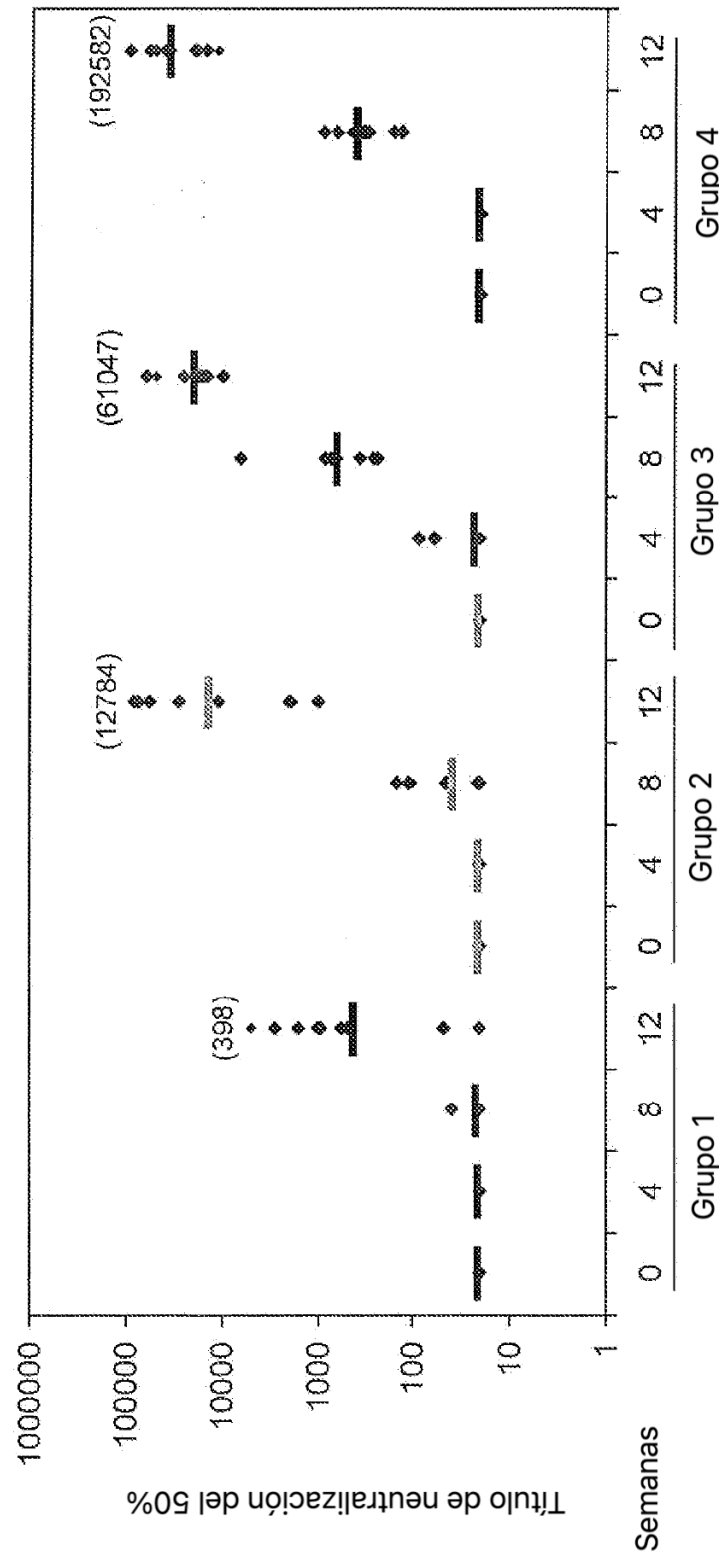


FIG. 11A

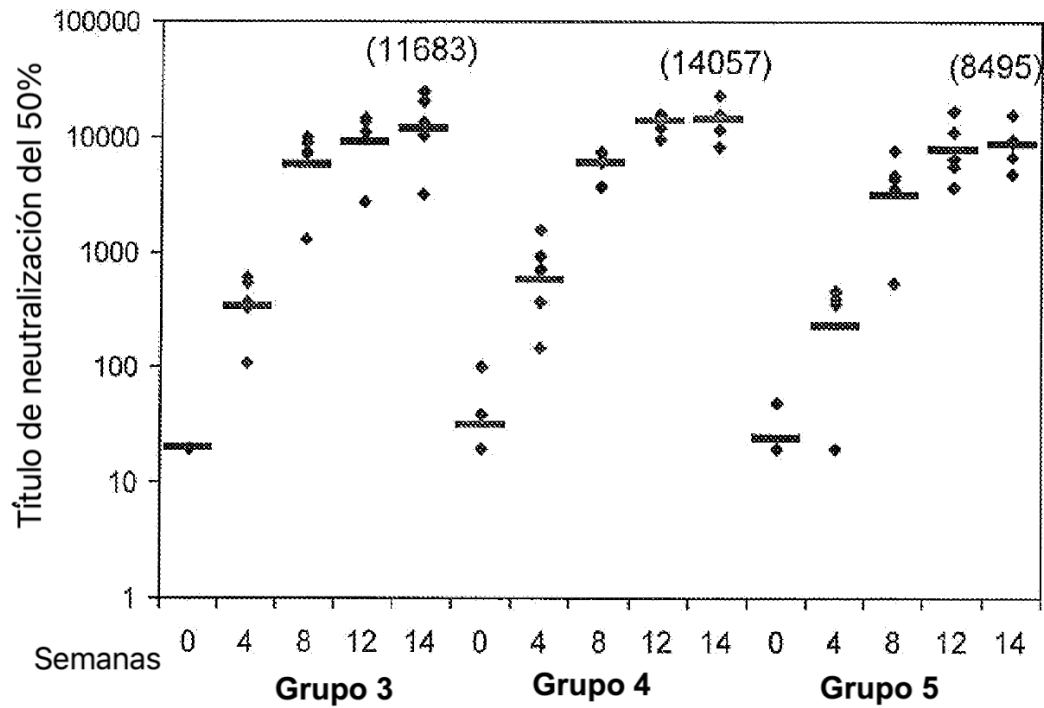


FIG. 11B

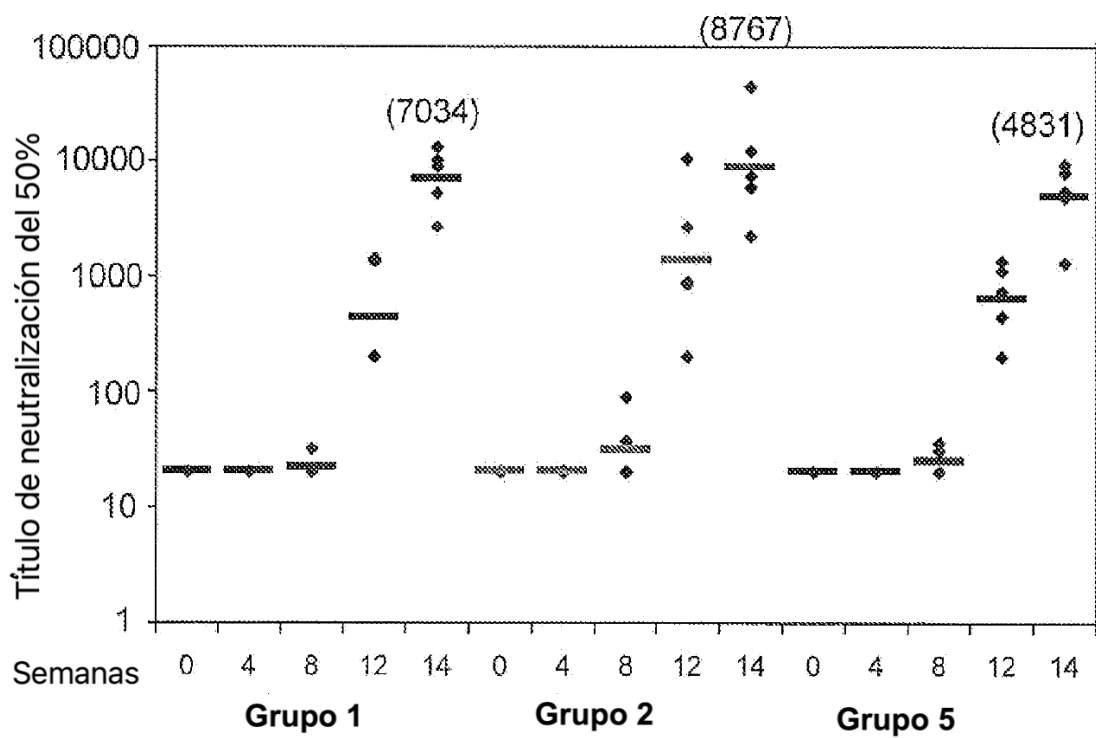


FIG. 12

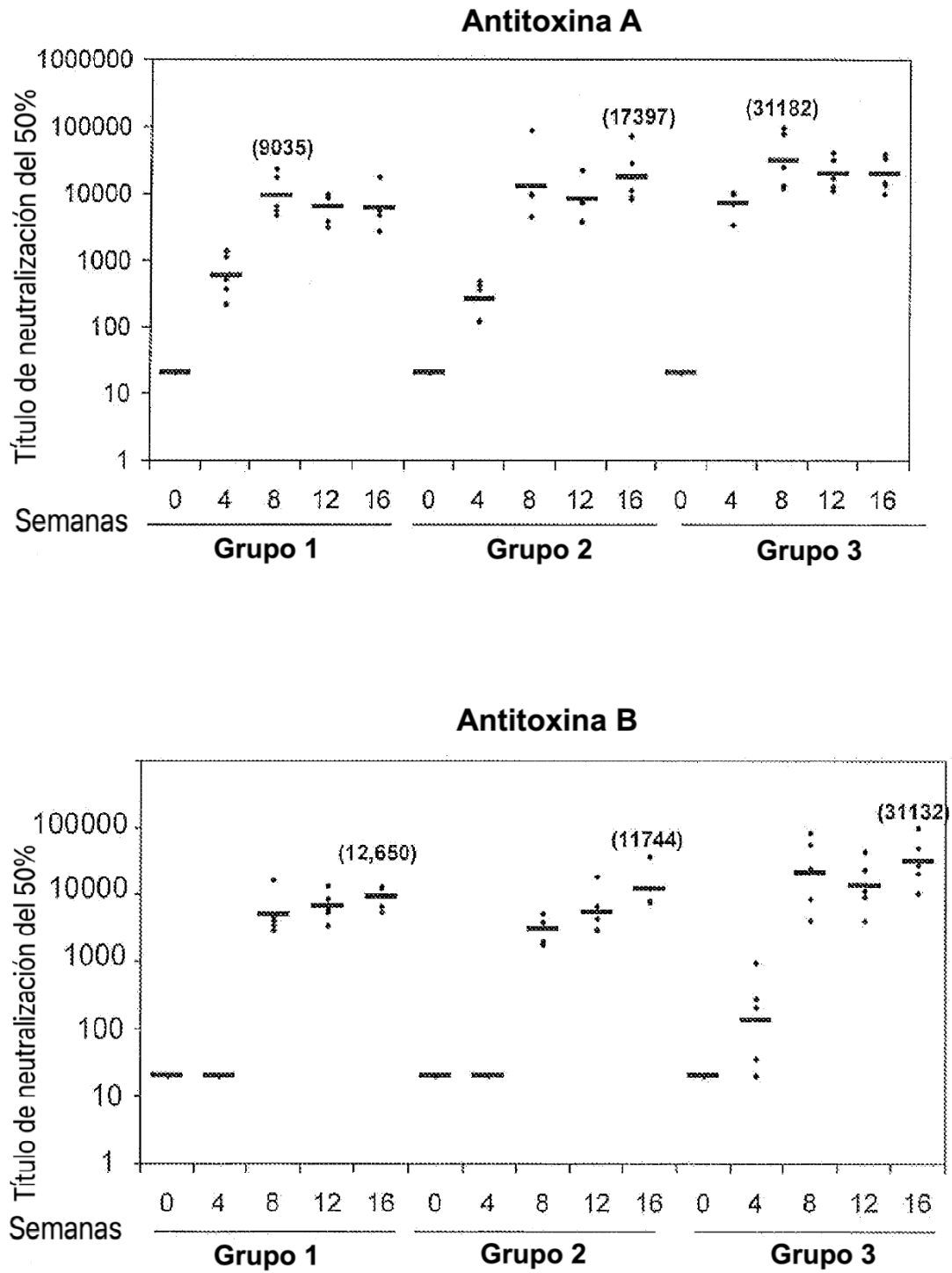
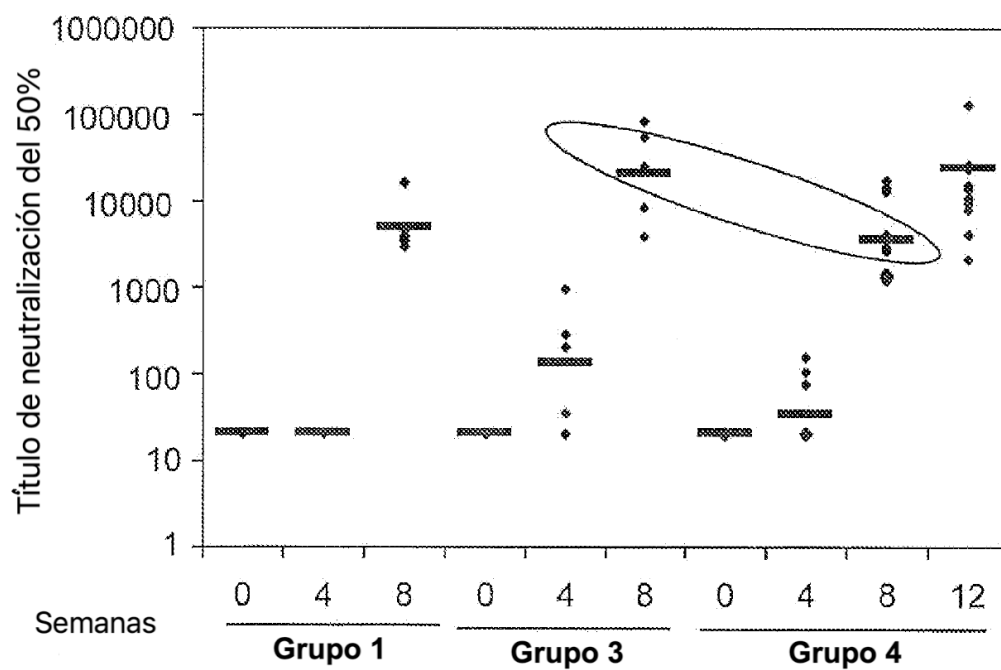
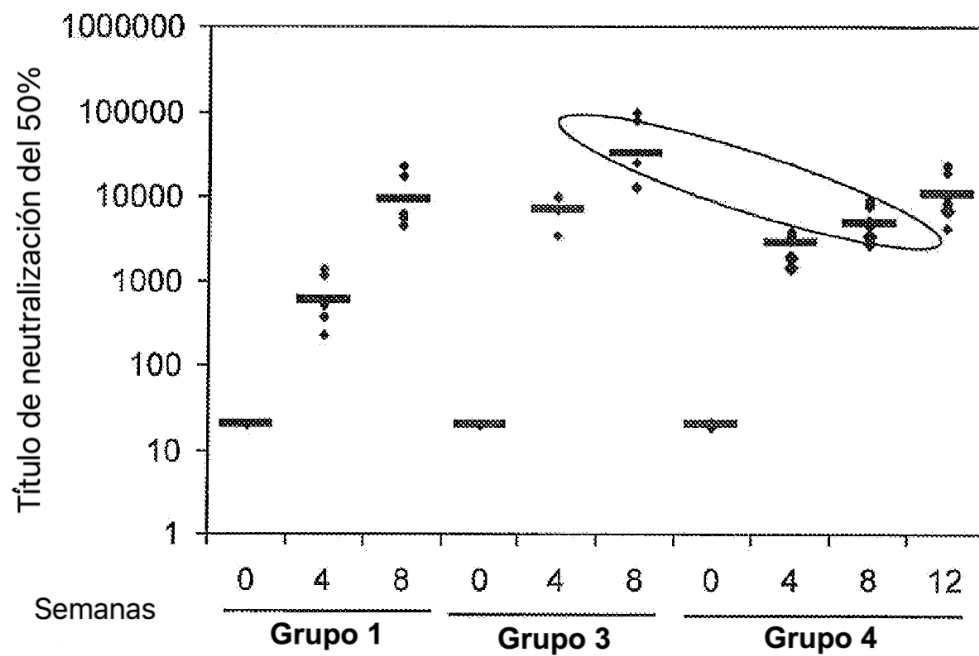


FIG. 13



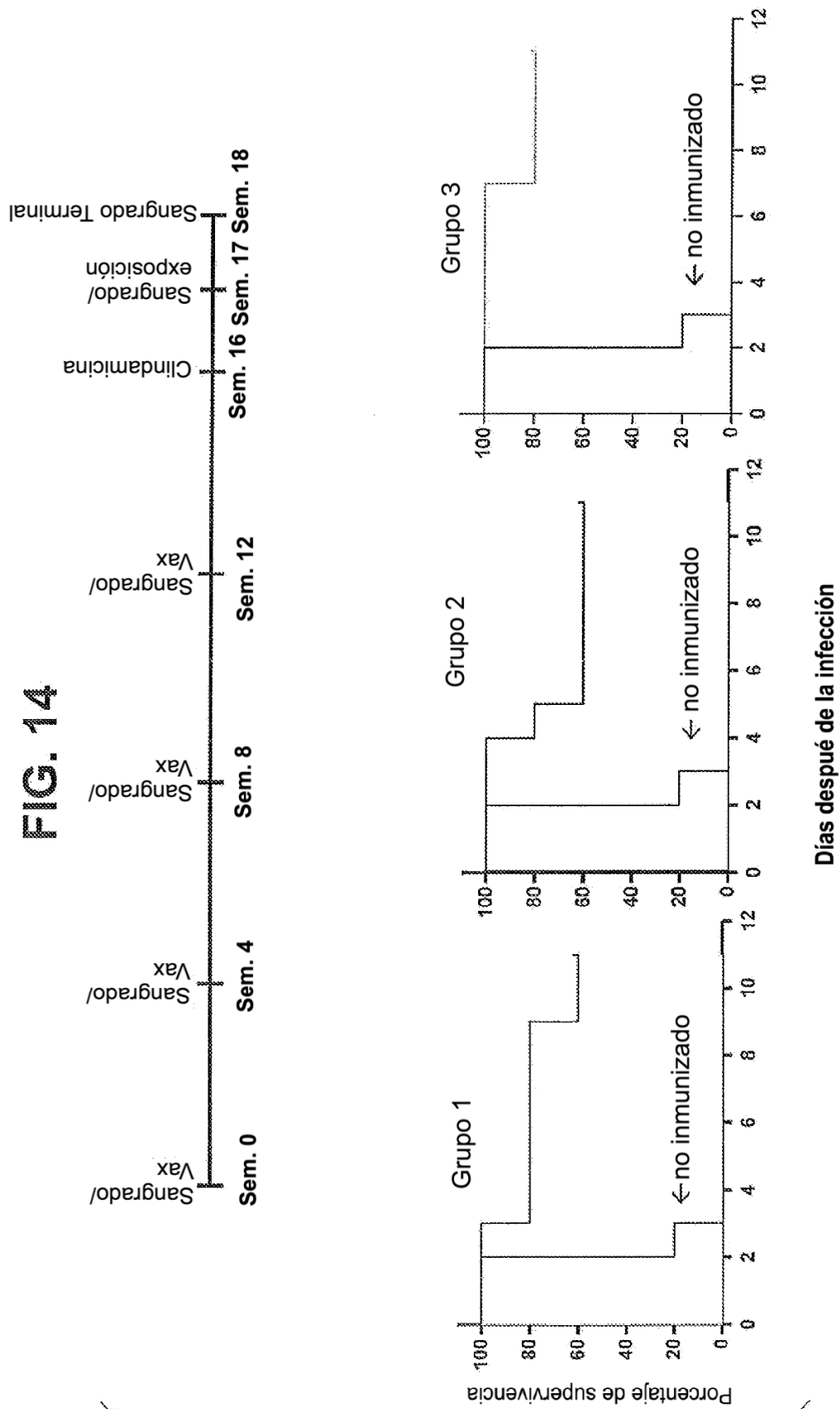
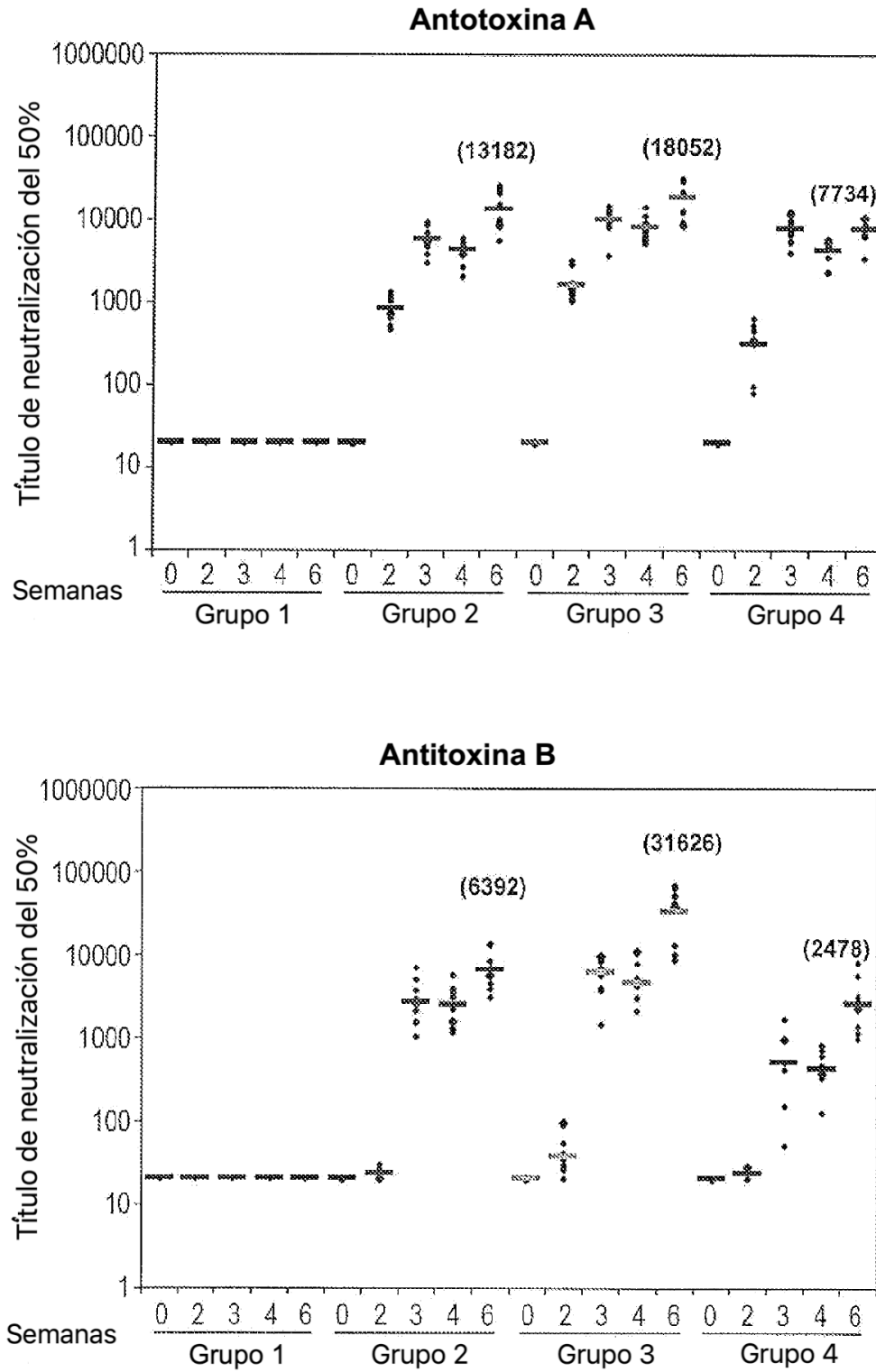


FIG. 15



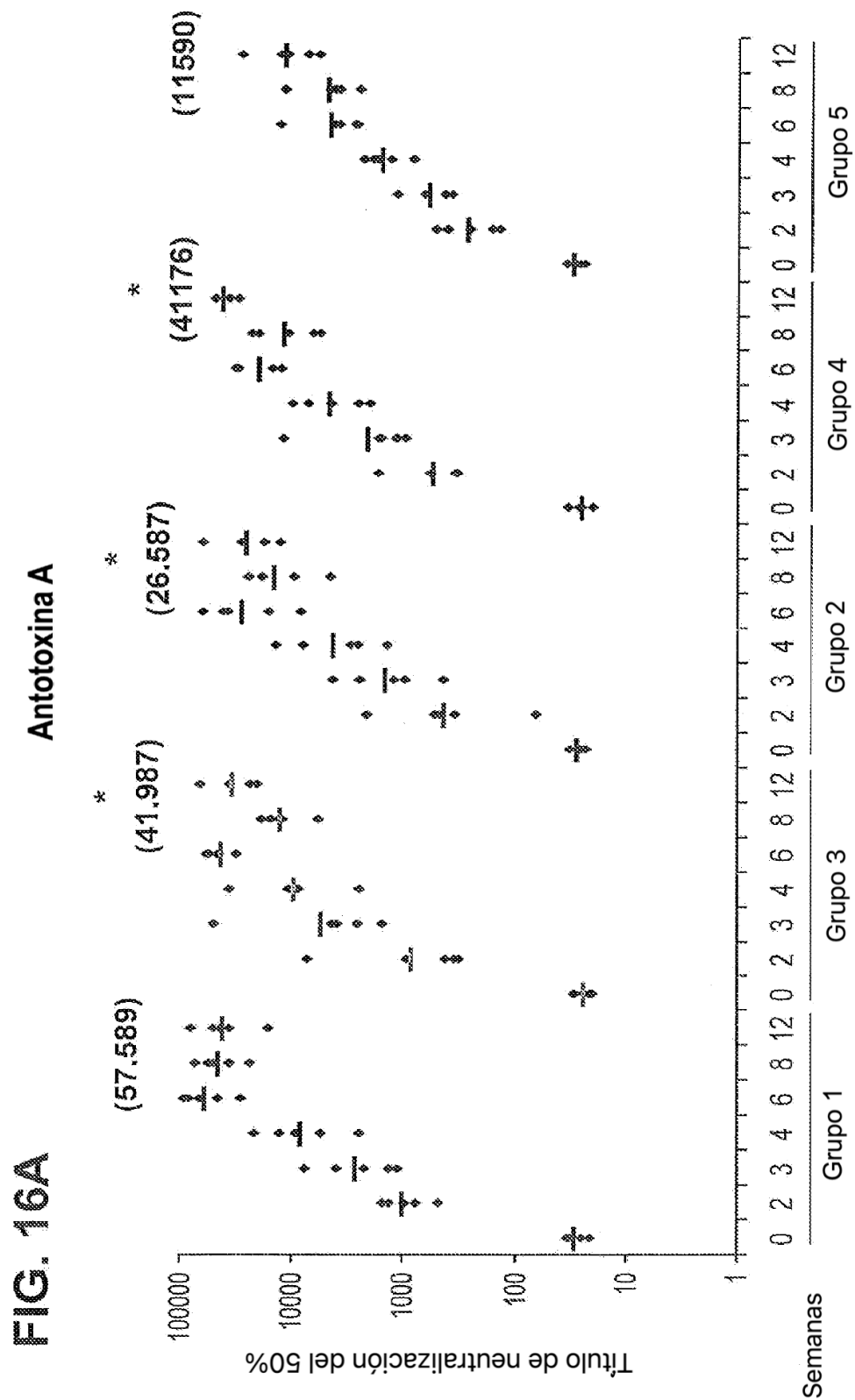


FIG. 16B

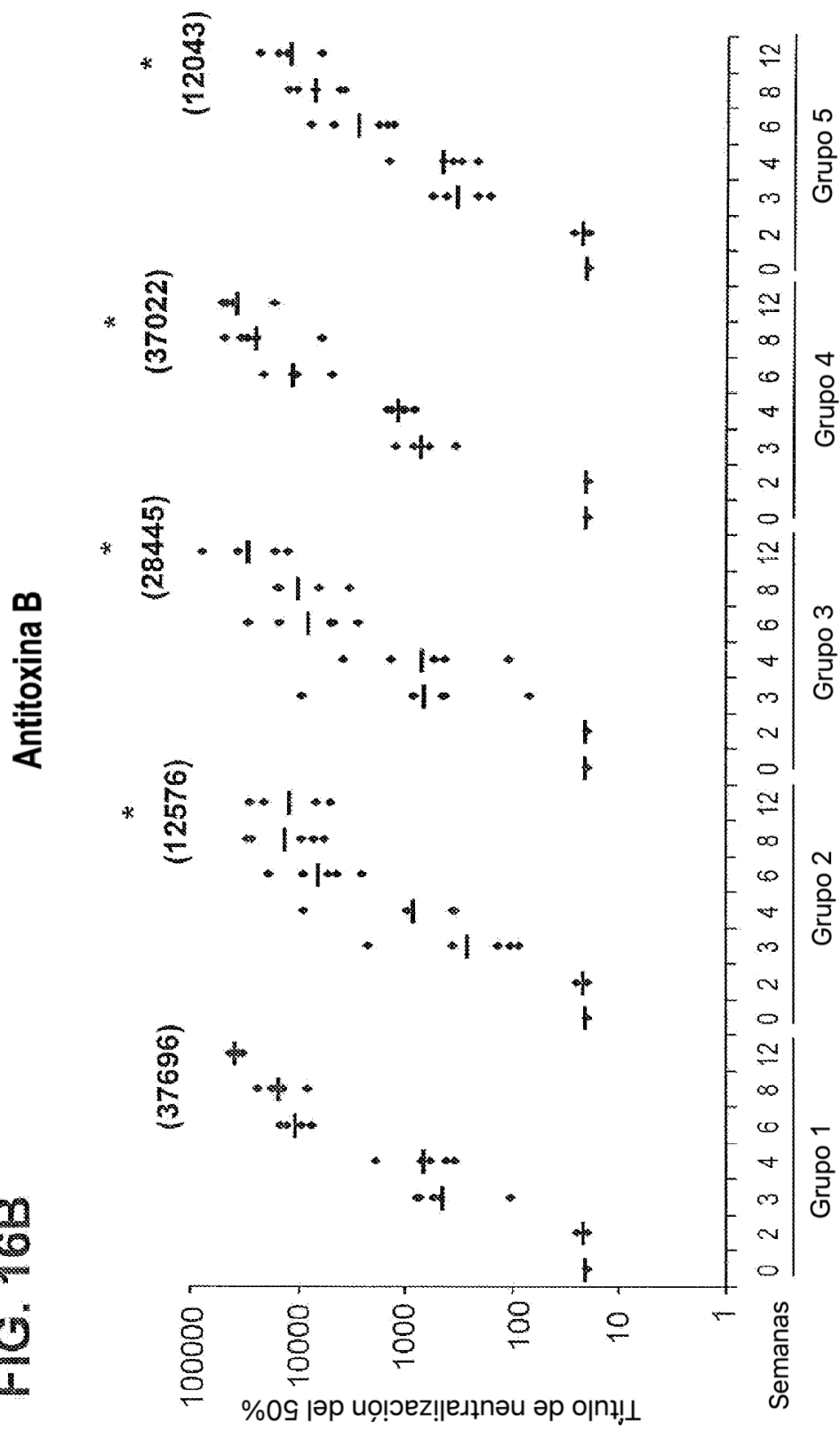


FIG. 17

Cadena Ligera Variable (muK)

MKLPVRLLVLMFWIPGSSSDVVMTHHTPLSLPVSLGDQASMSCRS
SQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLISKVSNRFSGVPDRFSG
 SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTYFPYTFGGGTREIKRAD
AAPTVSIFPPSS (SEQ ID NO: 36)

Cadena Pesada Variable (mlgE)

MYLGLNCVFIVLLKGVQSEVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS
GFTFTNYWMNWVRQSPEKGLEWIAEIRLKSHNYATHFAESVKG
 RFTISRDDSKSAVSLQMTNLTPEDTGIFYCTWDYYGNPAFVYWG
QGTLVTVSAASIRNPQLYPLKPKGTASMTLGCLVKDYFPGPVT
VTWYSDSLNMSTVN (SEQ ID NO: 37)

FIG. 18

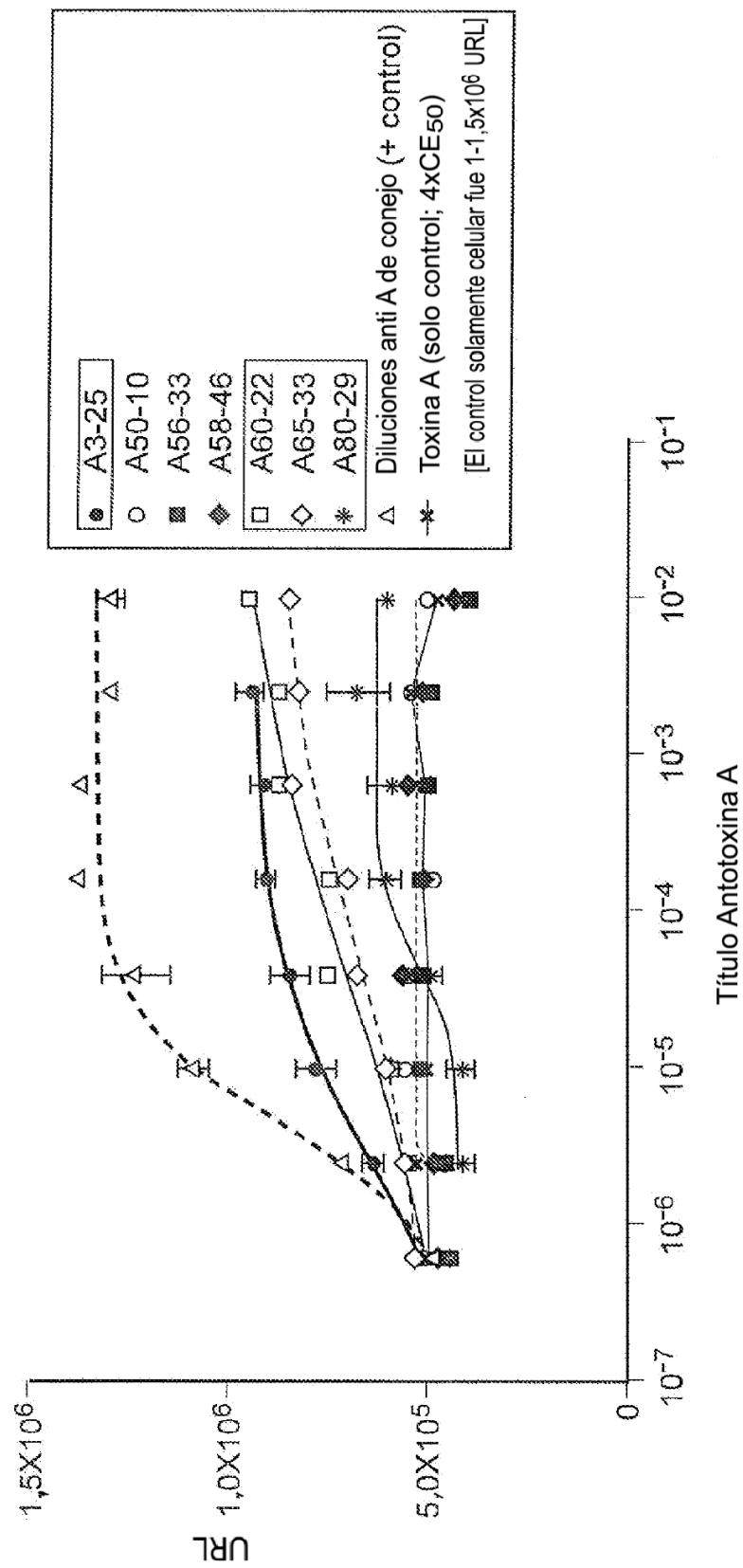


FIG. 19

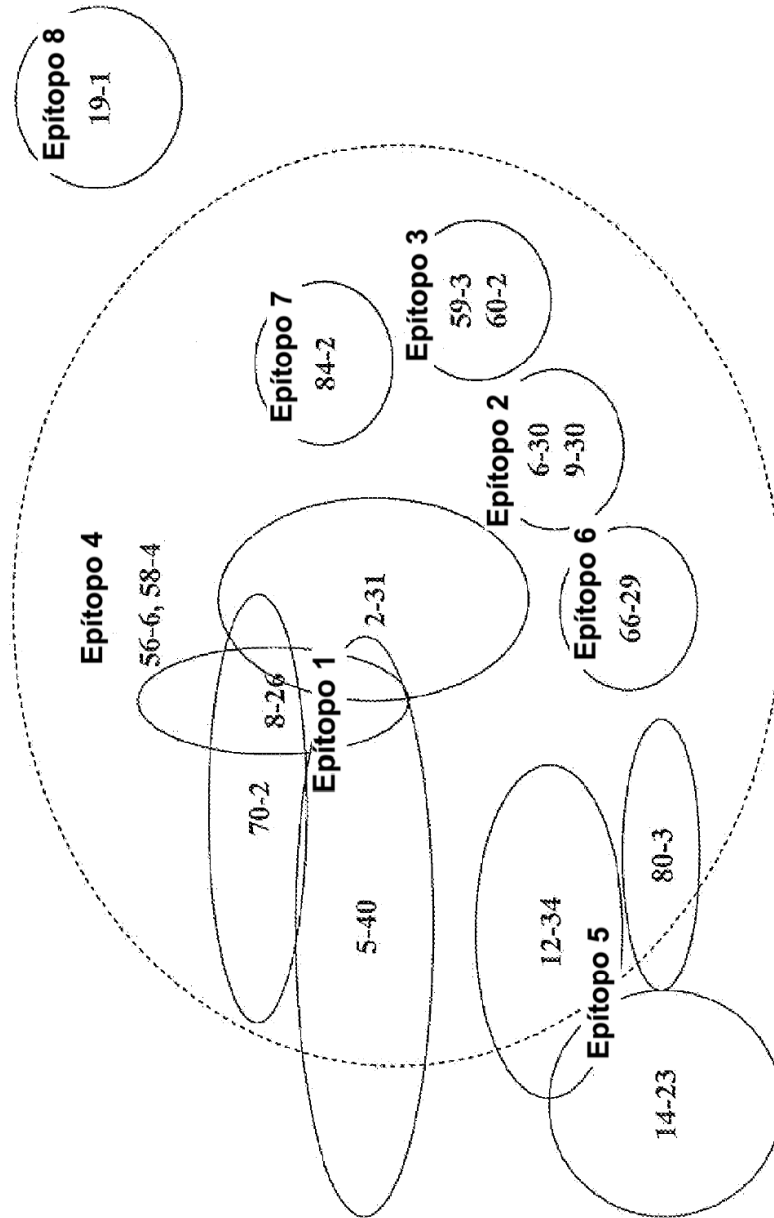


FIG. 20A

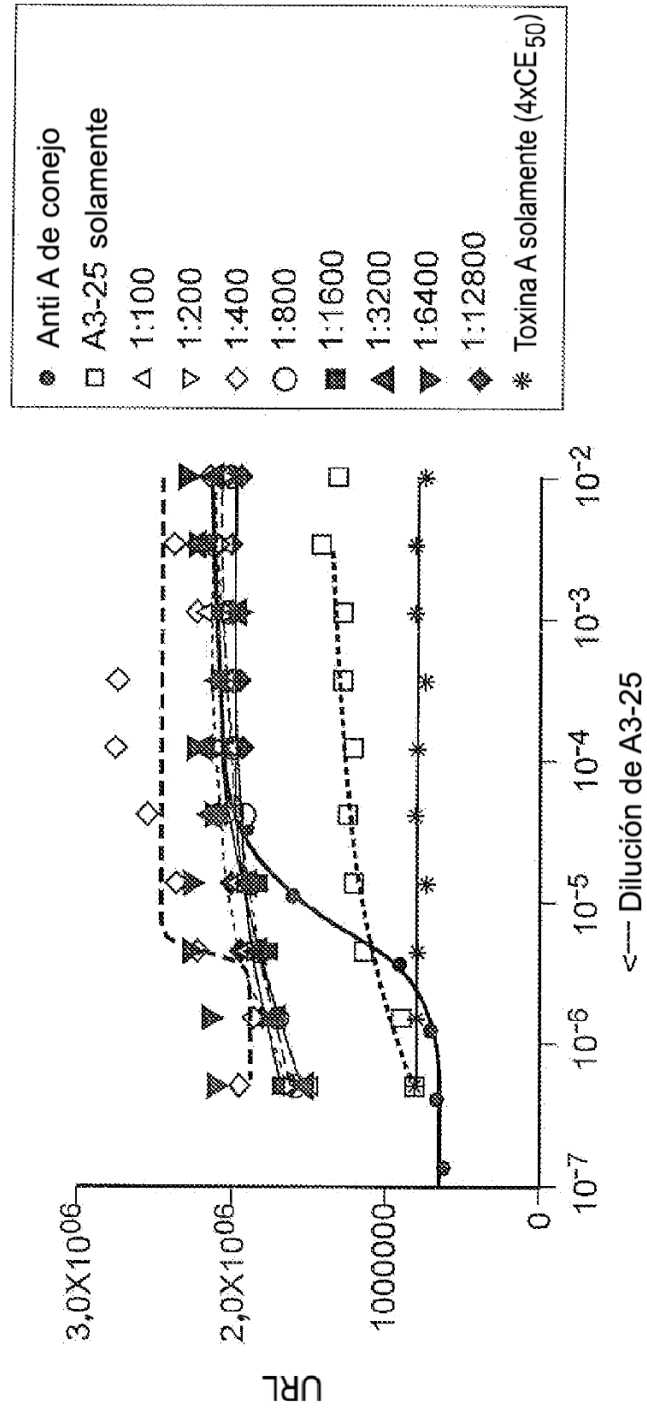


FIG. 20B

Neutralización de la toxina A por el mAb A3-25 más diluciones de A65-33

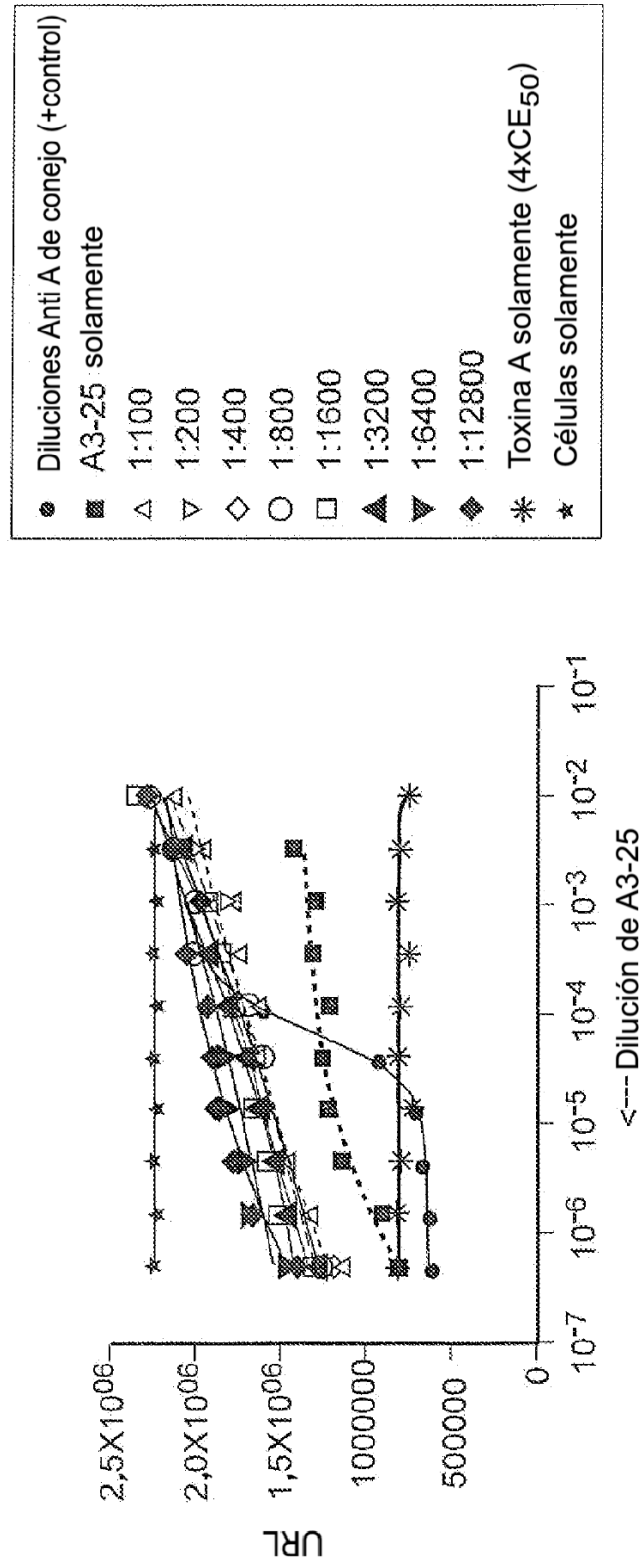


FIG. 20C

Neutralización de la toxina A por el mAb A3-25 más diluciones de A80-29

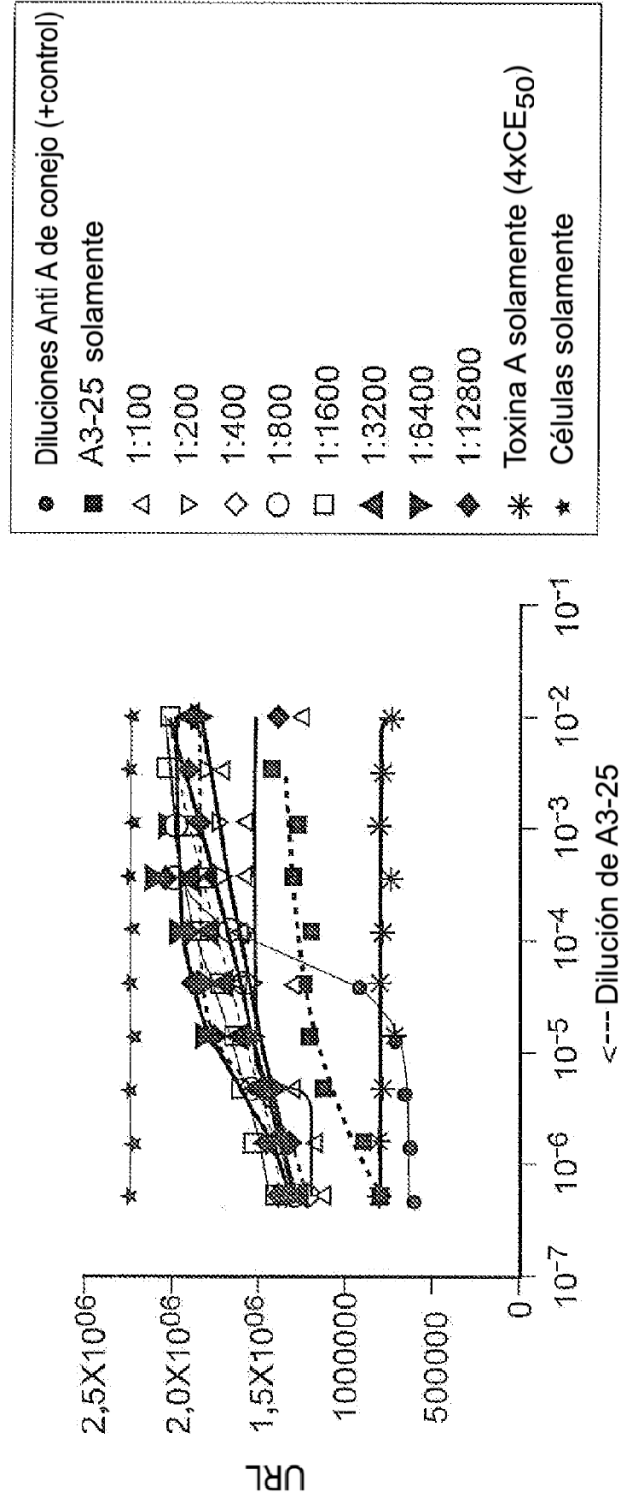


FIG. 21A

Neutralización de la Toxina B por Sueros de Referencia y Diferentes mAb

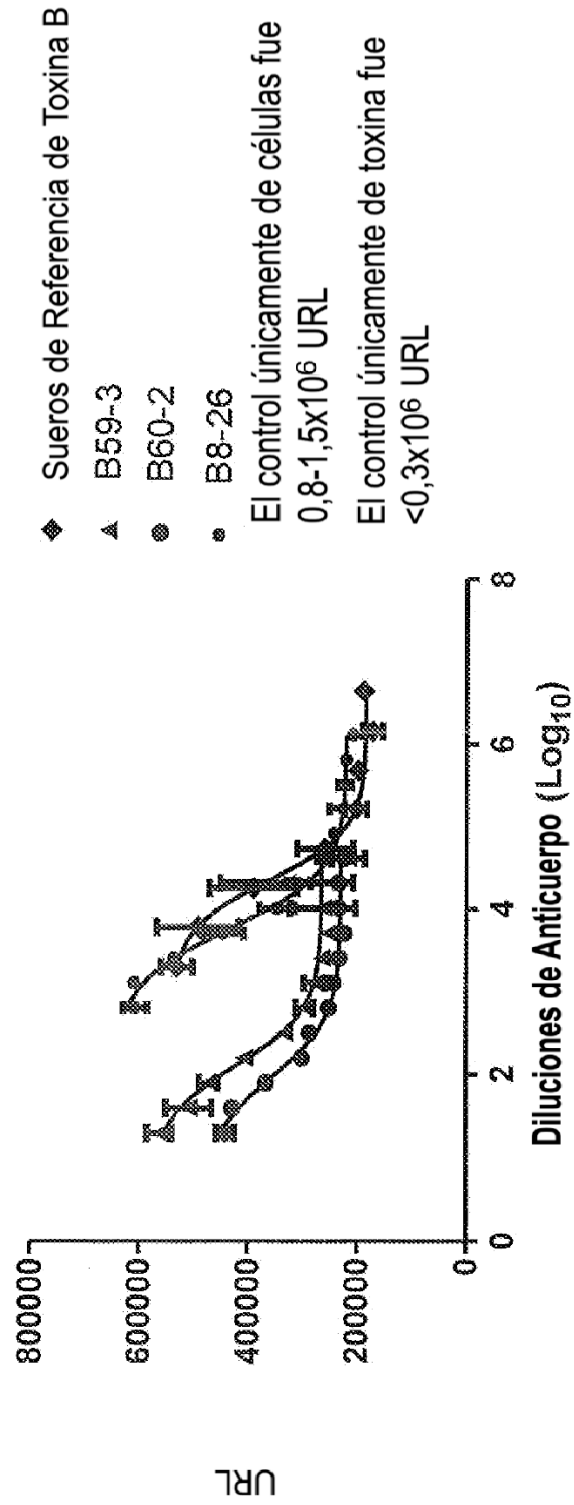


FIG. 21B

Neutralización de la Toxina B por mAb B8-26 más diluciones de B59-3

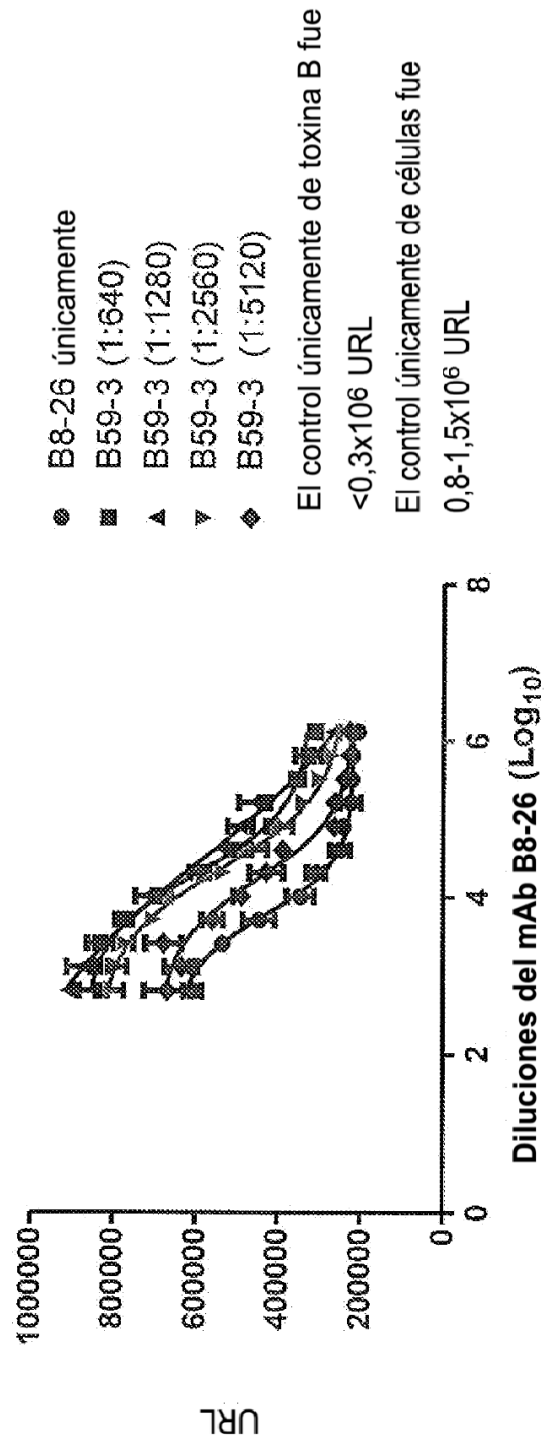


FIG. 22

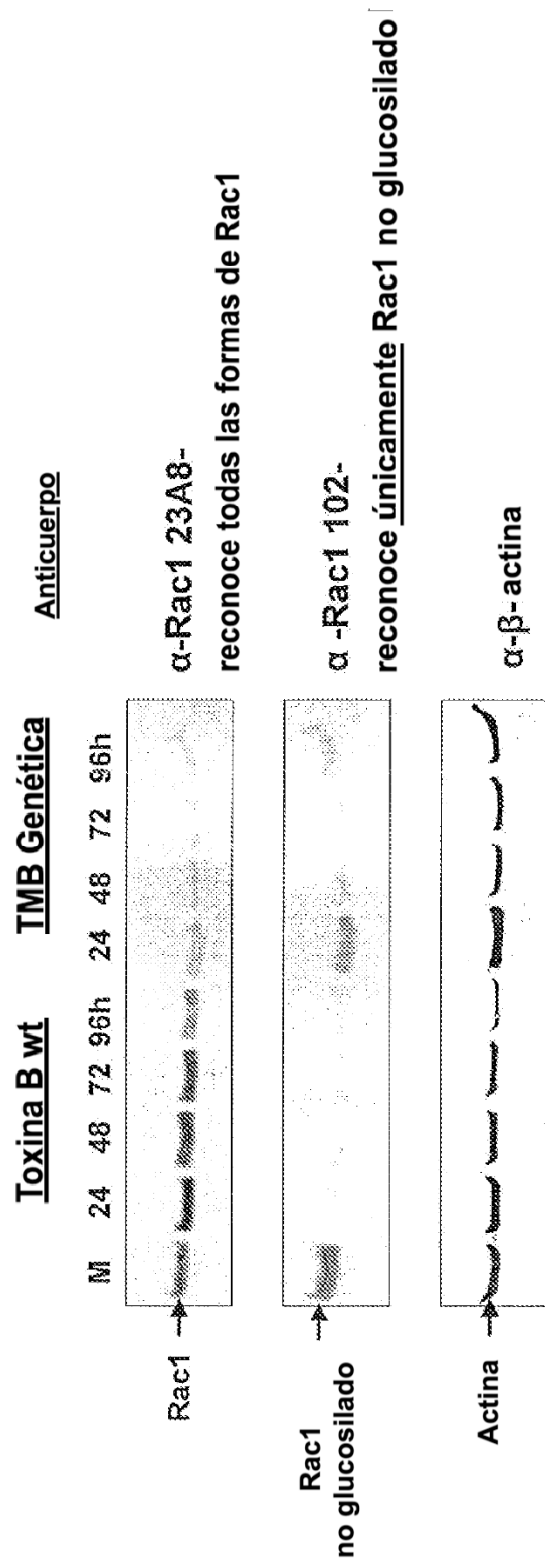


FIG. 23A

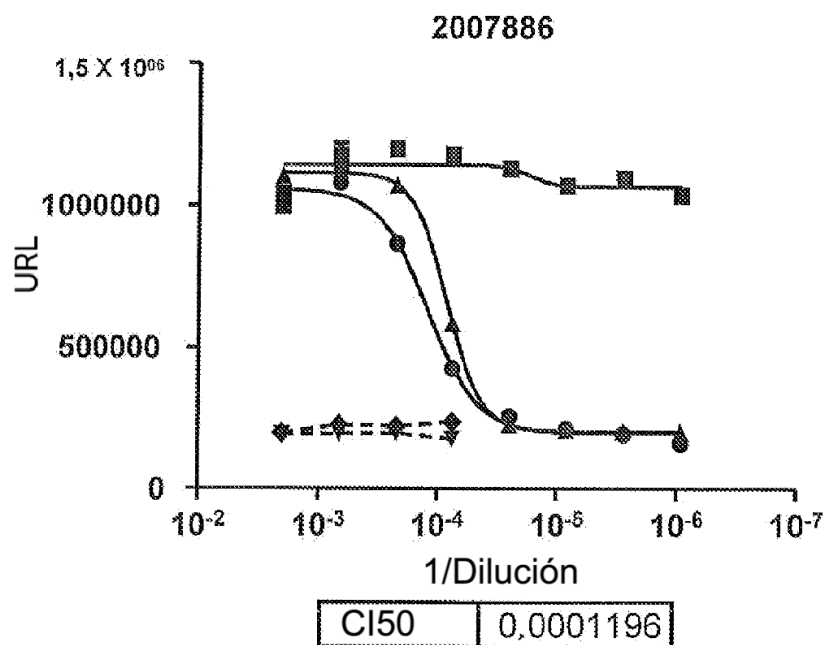


FIG. 23B

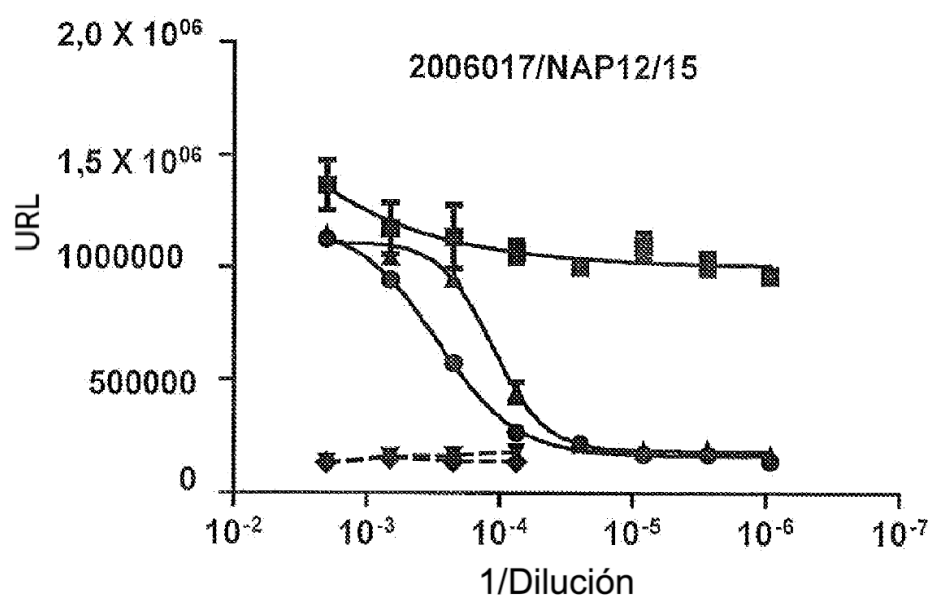


FIG. 23C

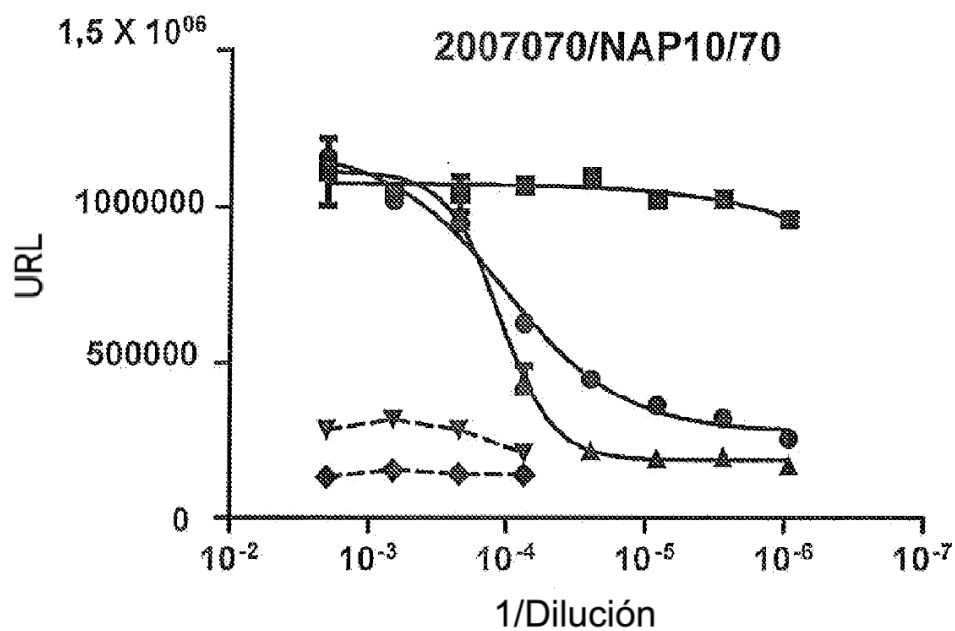


FIG. 23D

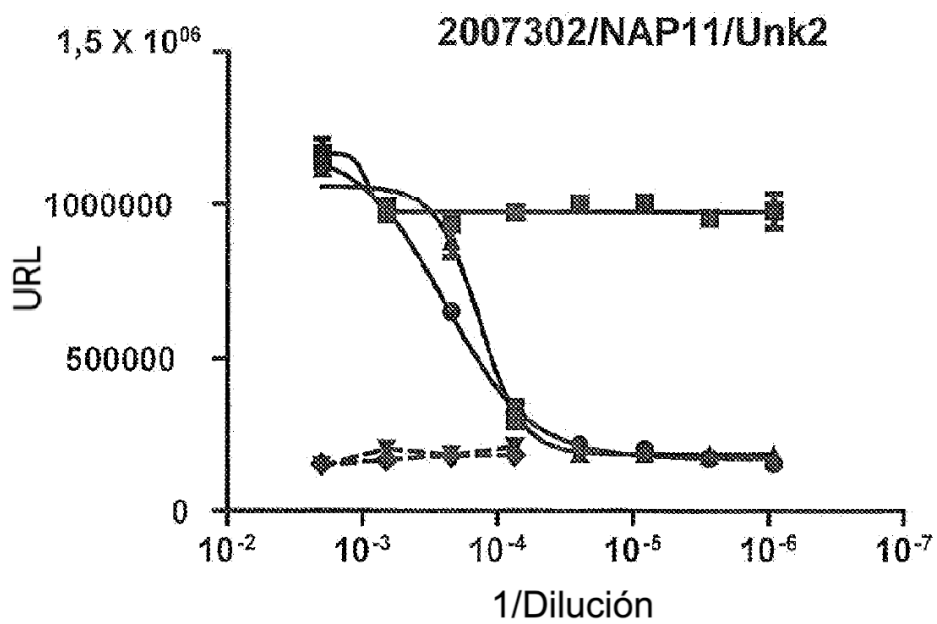


FIG. 23E

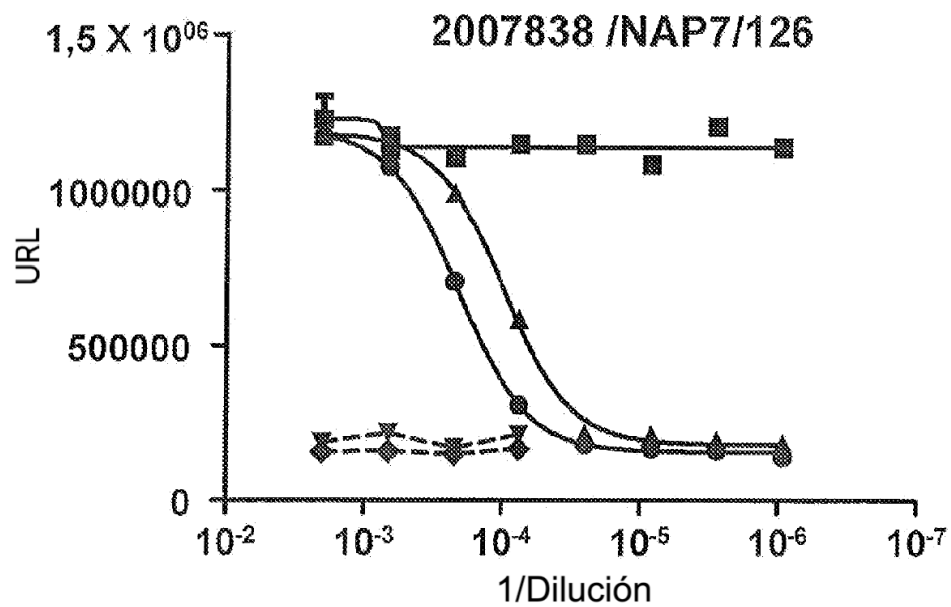


FIG. 23F

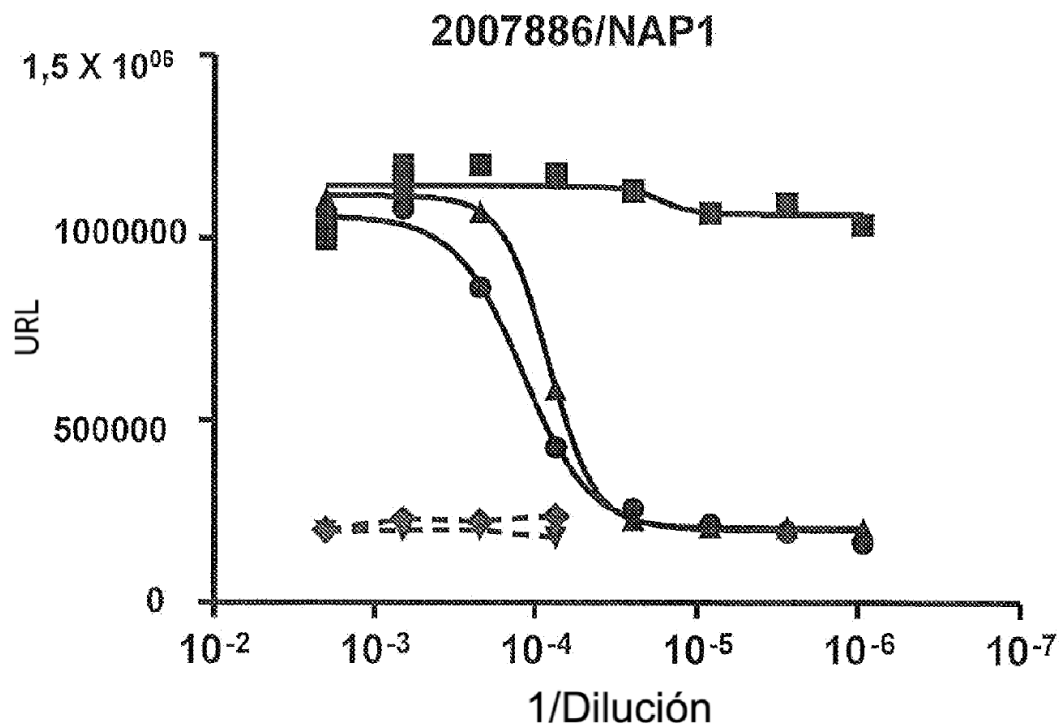


FIG. 23G

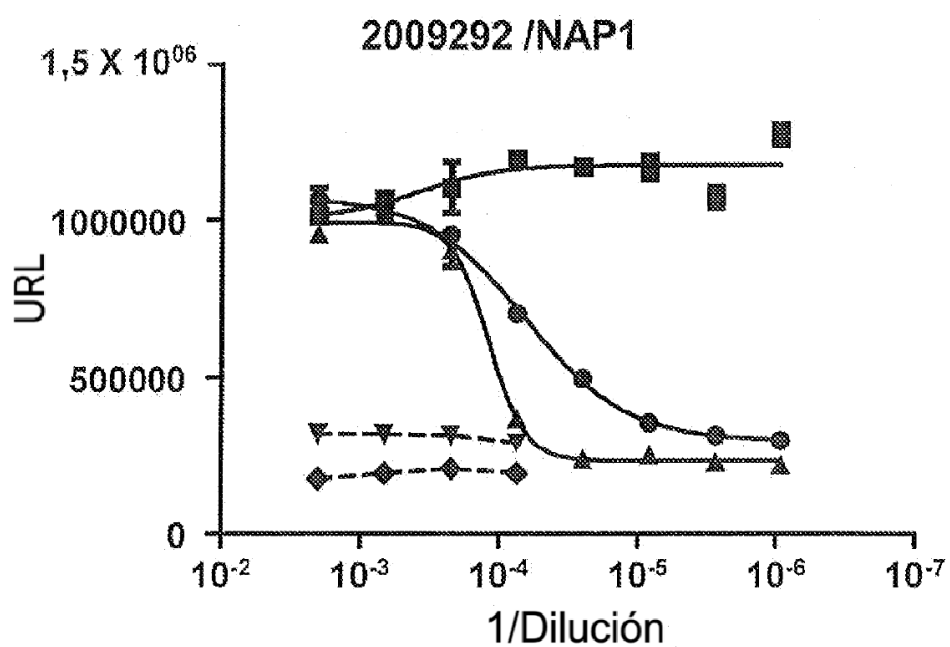


FIG. 23H

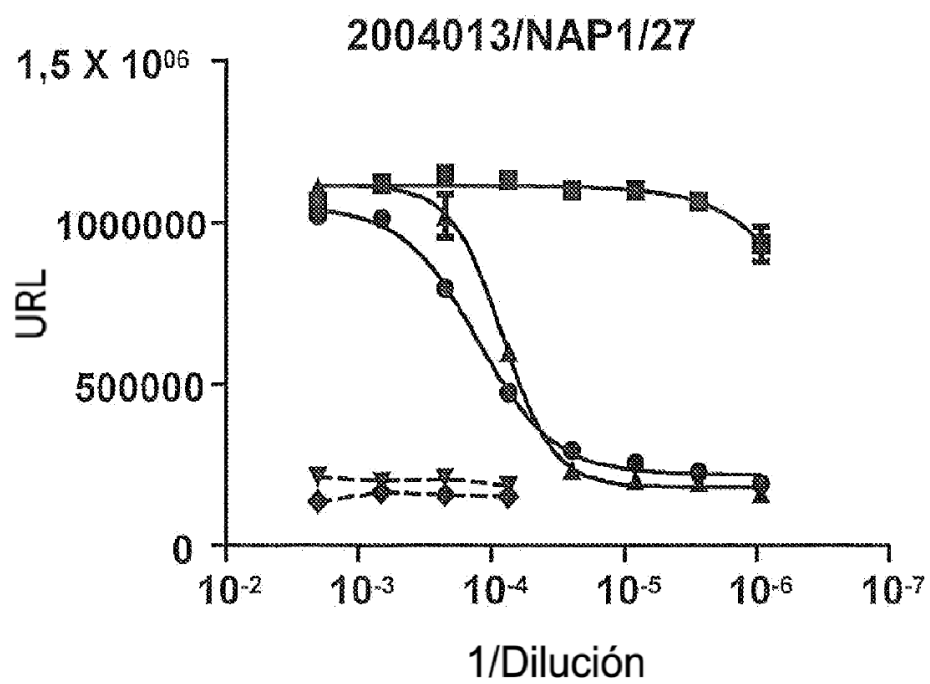


FIG. 23 I

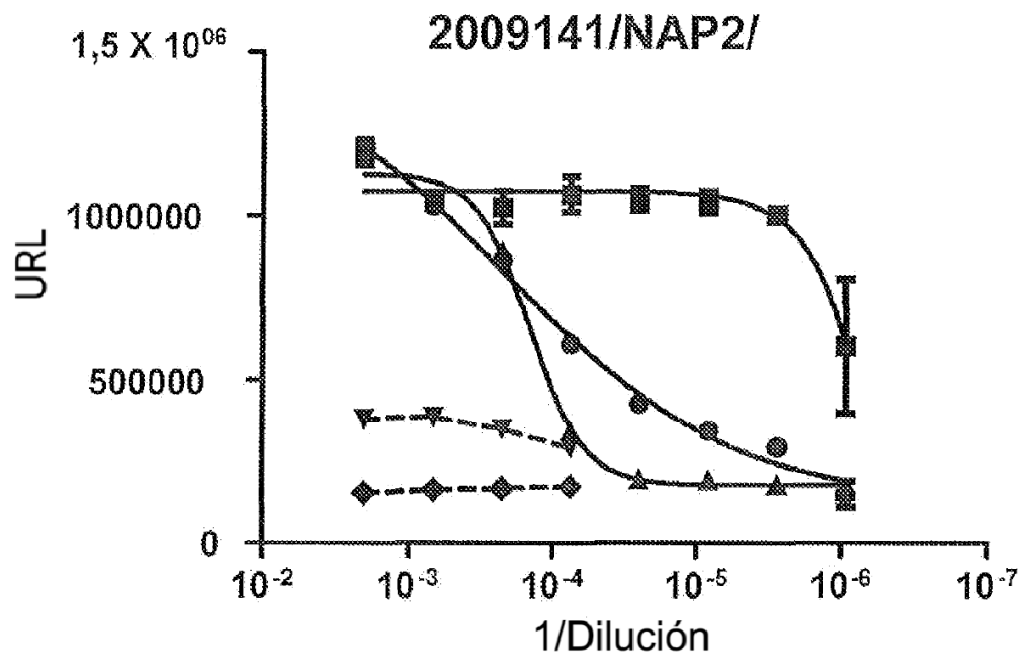


FIG. 23J

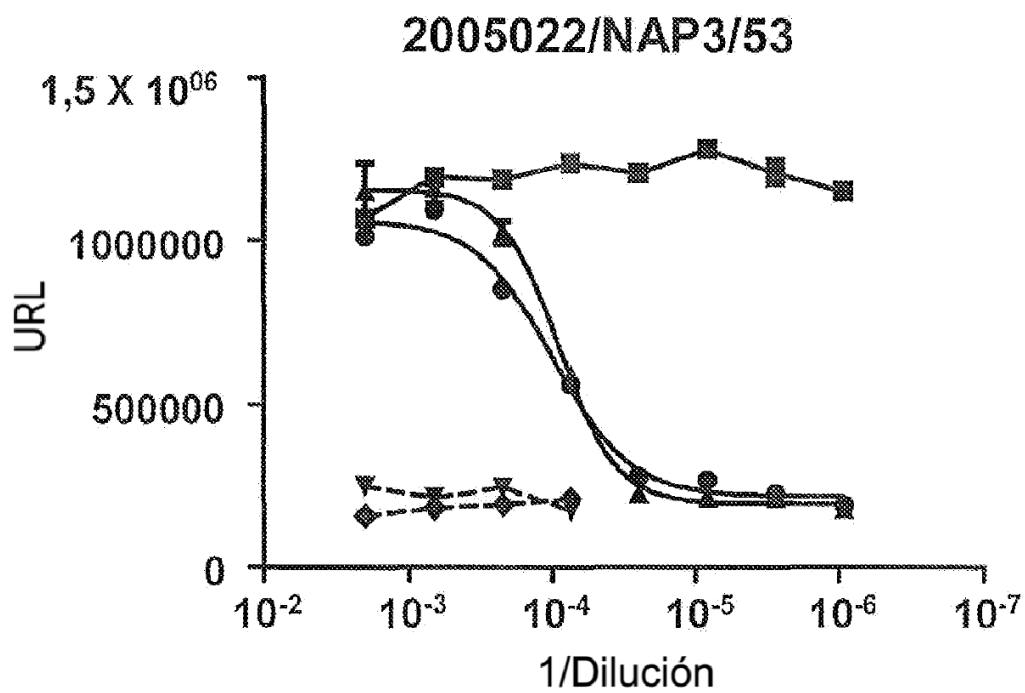
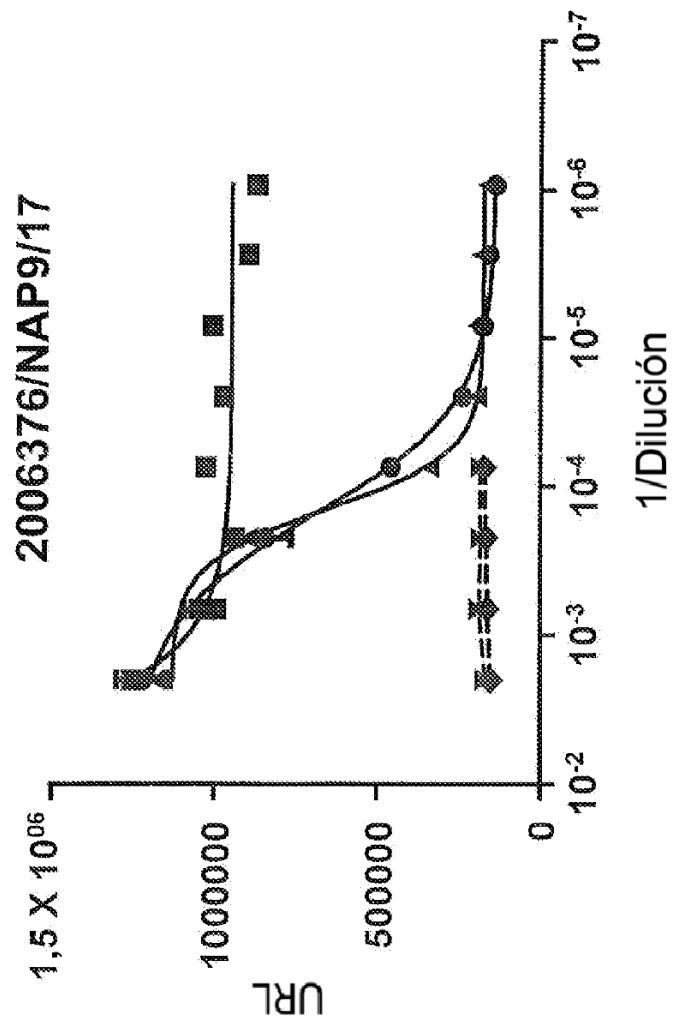
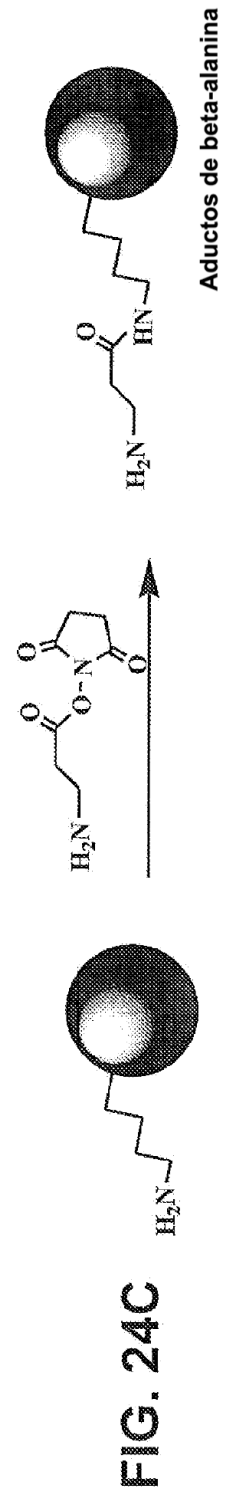
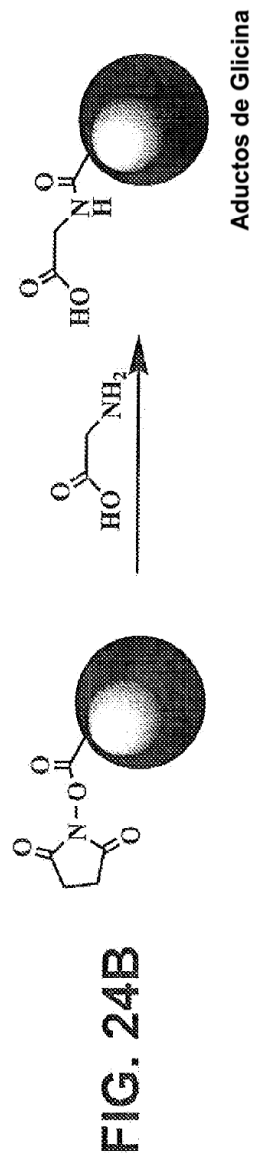
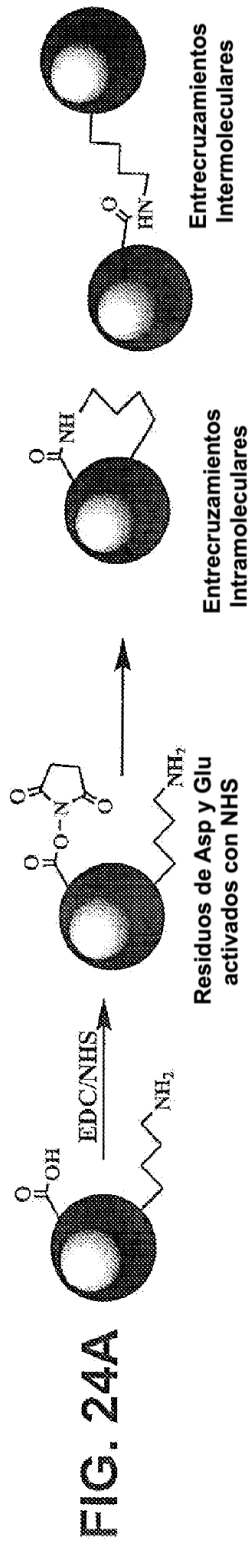


FIG. 23K





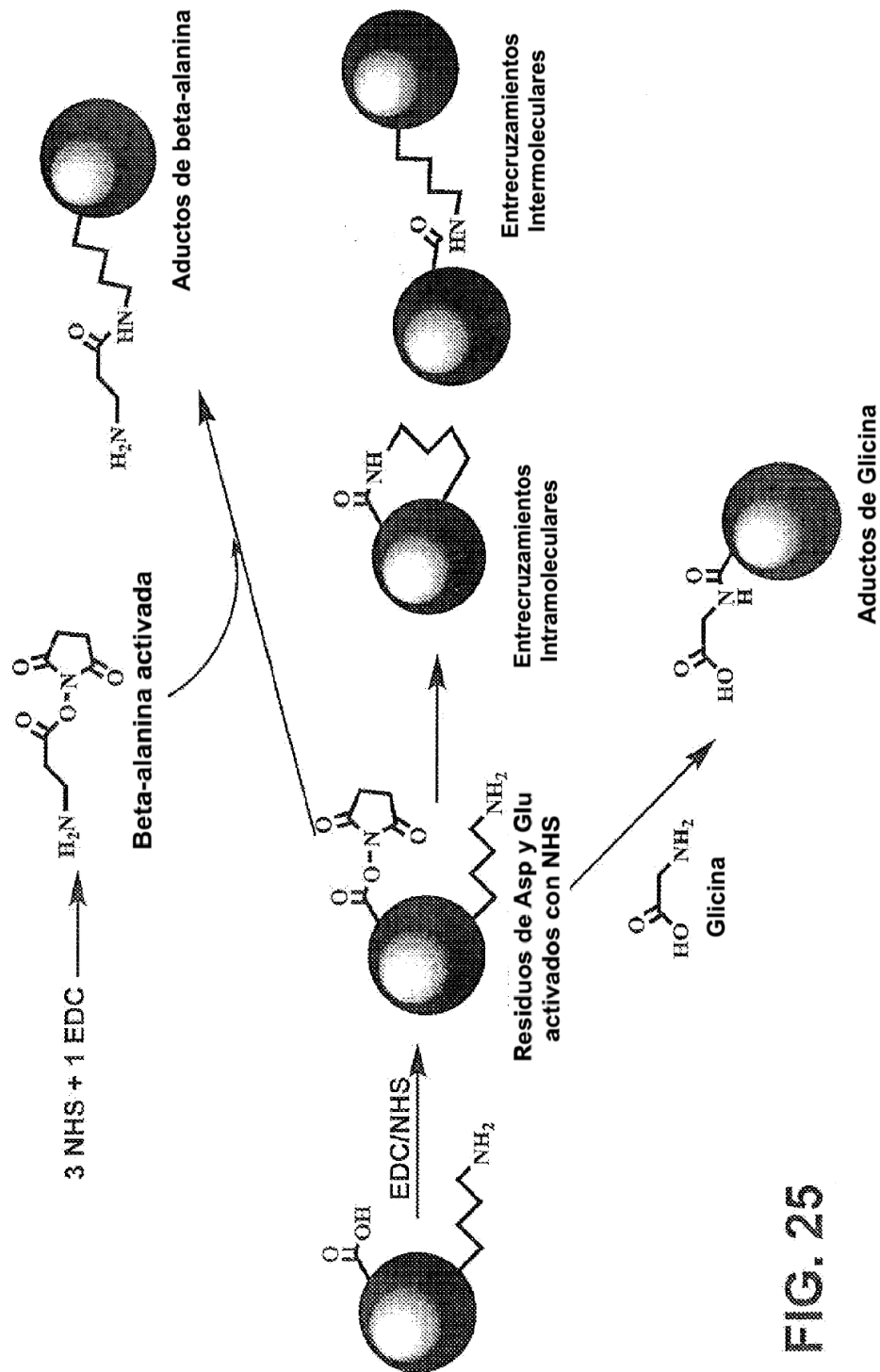


FIG. 25

FIG. 26

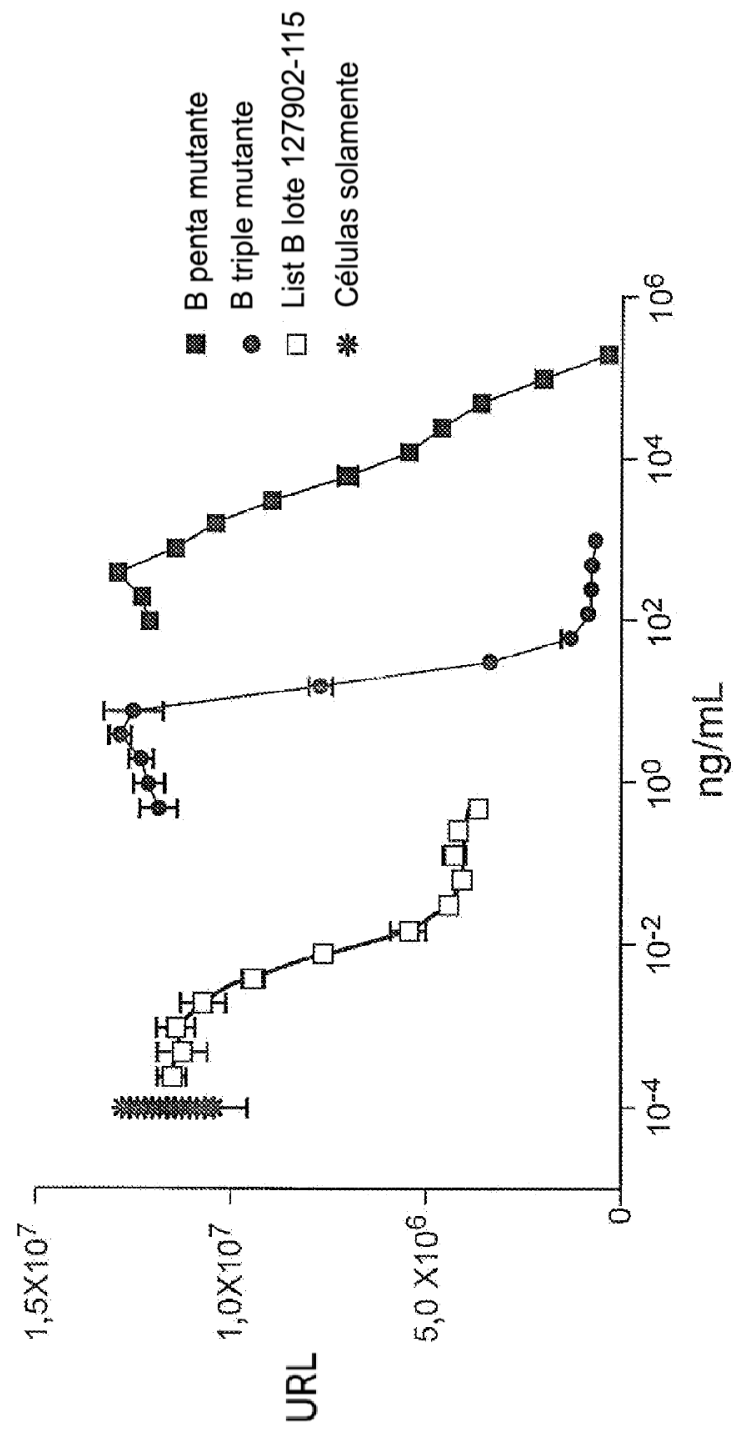


FIG. 27

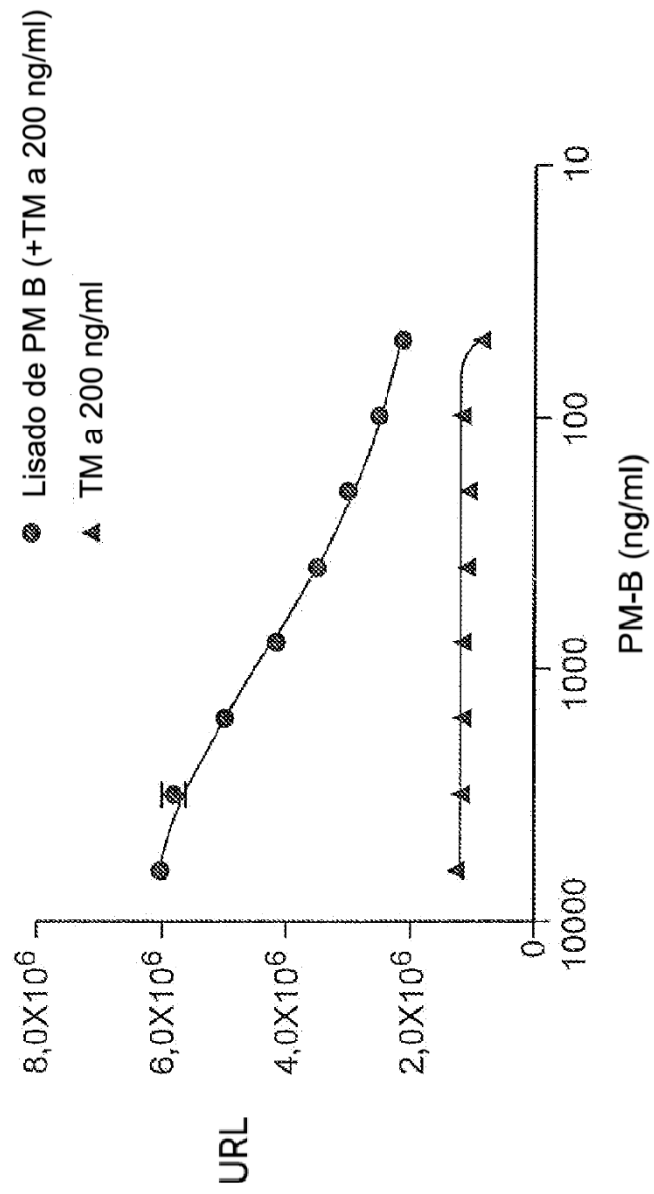


FIG. 28

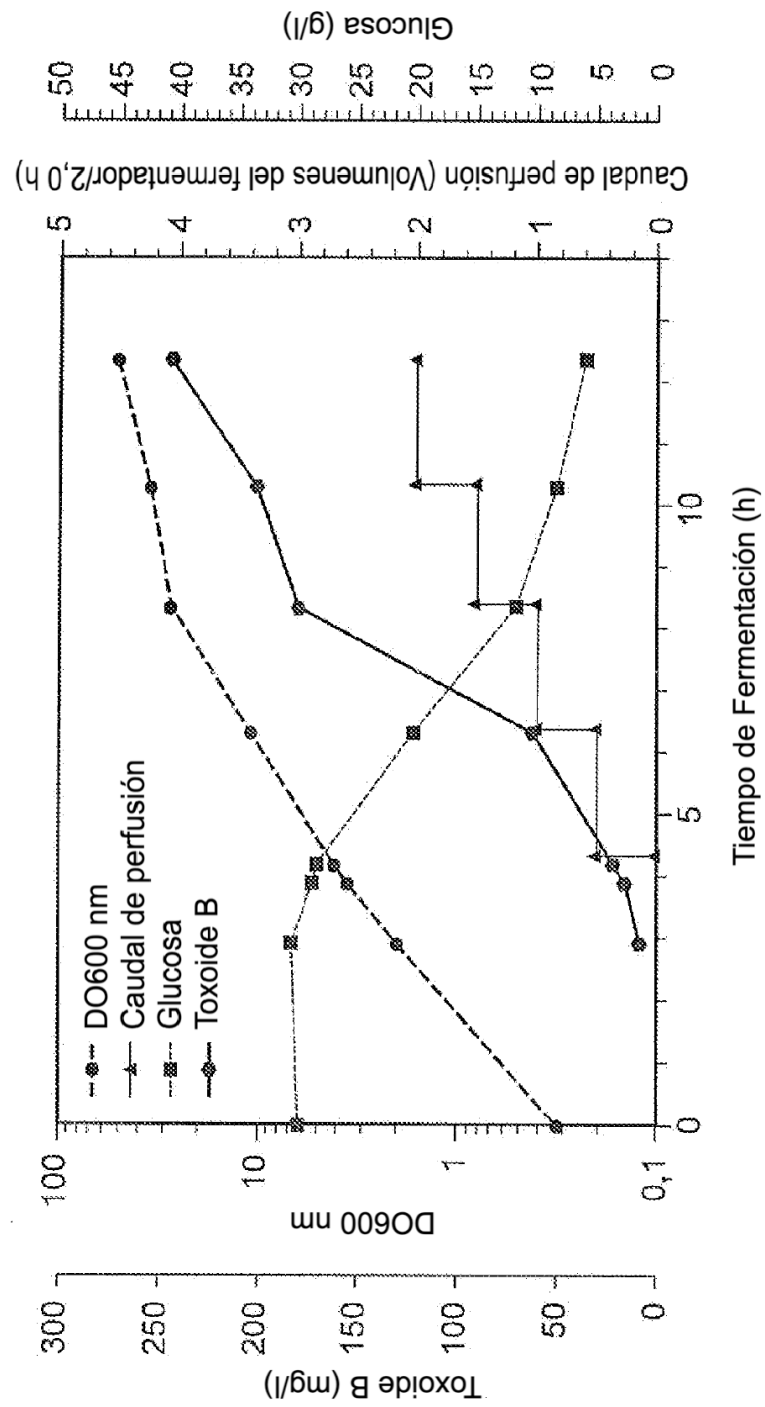


FIG. 29

