



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

(11) BR 122016023101-1 B1



(22) Data do Depósito: 07/10/2013

(45) Data de Concessão: 22/03/2022

(54) Título: POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA QUE O COMPREENDE, BEM COMO CÉLULA RECOMBINANTE DERIVADA DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

(51) Int.Cl.: C12N 1/20; C07K 14/33.

(30) Prioridade Unionista: 21/10/2012 US 61/716,605.

(73) Titular(es): PFIZER INC..

(72) Inventor(es): KATHRIN UTE JANSEN; ANNALIESA SYBIL ANDERSON; ROBERT G.K. DONALD; MICHAEL JAMES FLINT; NARENDER KUMAR KALYAN; JASON ARNOLD LOVTIN; MANINDER K SIDHU; JUSTIN KEITH MORAN; MARK EDWARD RUPPEN; WEIQIANG SUN.

(86) Pedido PCT: PCT IB2013059183 de 07/10/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/060898 de 24/04/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/10/2016

(62) Pedido Original do Dividido: BR112015008844-9 - 07/10/2013

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA QUE O COMPREENDE, BEM COMO CÉLULA RECOMBINANTE DERIVADA DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE A presente invenção refere-se a polipeptídeos compreendendo sequência de aminoácidos revelada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 761, onde o poli-peptídeo que compreende pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido é modificado quimicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) ou N-Hi-droxisuccinimida (NHS), bem como a composição imunogênica compreendendo os referidos polipeptídeos e a célula recombinante ou progênie da mesma compreendendo uma sequência de ácido nucléico que codifica os referidos polipeptídeos. A célula recombinante pode ser derivada de uma célula de Clostridium difficile, em particular, Clostridium difficile 1351, Clostridium difficile 3232, Clostridium difficile 7322, Clostridium difficile 5036, Clostridium difficile 4811, e Clostridium difficile VP I 11186. Os polipeptídeos e composições podem ser utilizados na cultura de C. difficile e na produção de toxinas C. difficile.

“POLIPEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA QUE O COMPREENDE, BEM COMO CÉLULA RECOMBINANTE DERIVADA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*”.

Dividido do BR112015008844-9, depositado em 07/10/2013.

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício do U.S. Provisional Patent Application 61/716,605, depositado em 21 de outubro de 2012, o qual está aqui incorporado para referência em sua totalidade.

CAMPO

[002] A presente invenção é direcionada a composições e métodos relacionados às toxinas de *Clostridium difficile* mutantes.

ANTECEDENTES

[003] O *Clostridium difficile* (*C. difficile*) é uma bactéria anaeróbica gram-positiva que é associada com as doenças gastrointestinais em humanos. A colonização do *C. difficile* usualmente ocorre no cólon se a flora intestinal natural é diminuída pelo tratamento com antibióticos. Uma infecção pode levar a uma diarreia associada aos antibióticos e algumas vezes a colite pseudomembranosa através da secreção das toxinas de glicosilação, toxina A e toxina B (308 e 270 kDa, respectivamente), que são fatores de virulência primária do *C. difficile*.

[004] A toxina A e a toxina B são codificadas dentro do local de patogenicidade 19 kb (PaLoc) pelos genes *tcdA* e *tcdB*, respectivamente, as cepas de *C. difficile* tem este local substituído por uma sequência de par base 115 alternativa.

[005] Ambas a toxina A e a toxina B são citotoxinas potentes. Estas proteínas são glucosiltransferases homólogas que inativam GTPases pequenos da família Rho/Rac/Ras. O rompimento resultante na sinalização causa uma perda das junções célula-célula, desregulação do citoesqueleto de actina, e/ou apoptose, resultando

em uma diarreia secretória profunda que é associada com as infecções por *Clostridium difficile* (CDI).

[006] Na última década, os números e a gravidade dos surtos de *C. difficile* em hospitais, casas de repouso, e outras unidades de cuidados a longo prazo aumentaram dramaticamente. Os fatores chave nesta escalção incluem o aparecimento de cepas patogênicas hipervirulentas, uso elevado de antibióticos, métodos de detecção elevados, e exposição elevada a esporos nas unidades de saúde.

[007] O metronidazolo e a vancomicina representam o padrão atualmente aceito de cuidados para o tratamento com antibióticos para a doença associada ao *C. difficile* (CDAD). Entretanto, cerca de 20% dos pacientes recebendo tal tratamento vivenciam uma recorrência da infecção após um primeiro episódio de CDI, e até cerca de 50% destes pacientes sofrem de recorrências adicionais. O tratamento das recorrências representa um desafio muito significativo, e a maioria das recorrências usualmente ocorrem dentro de um mês do episódio anterior.

[008] Portanto, há uma necessidade por métodos e composições terapêuticas e/ou imunogênicas do mesmo direcionadas ao *C. difficile*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] Estes e outros objetos são proporcionados aqui pela invenção.

[010] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma toxina *C. difficile* mutante A. A toxina mutante A inclui uma mutação nas posições de resíduos 285, 287, 700, 972, e 978 quando comparado a uma toxina do tipo selvagem A. Em uma modalidade, a toxina mutante A inclui a SEQ ID NO: 183. Em uma modalidade, a toxina mutante A é menos citotóxica do que a toxina do tipo selvagem A correspondente. Em uma modalidade, a toxina mutante A inclui pelo menos um resíduo de aminoácido que é quimicamente modificado. Em um aspecto, a

invenção refere-se a um polipeptídio isolado que inclui a SEQ ID NO: 183.

[011] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma toxina *C. difficile* mutante B. A toxina mutante B inclui uma mutação nas posições de resíduos 286, 288, 698, 970, e 976 quando comparado a uma toxina do tipo selvagem B. Em uma modalidade, a toxina mutante B inclui a SEQ ID NO: 184. Em uma modalidade, a toxina mutante B é menos citotóxica do que a toxina do tipo selvagem B correspondente. Em uma modalidade, a toxina mutante B inclui pelo menos um resíduo de aminoácido que é quimicamente modificado. Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio isolado que inclui a SEQ ID NO: 184.

[012] A invenção ainda refere-se a composições e métodos para o uso na cultura de *C. difficile* e na produção de toxinas *C. difficile*. Em um aspecto, a invenção refere-se a um meio de cultura incluindo um vegetal hidrolisado e uma célula de *C. difficile*. Em uma modalidade preferida, o hidrolisado é um hidrolisado de soja. Mais preferencialmente, o hidrolisado de soja é um hidrolisado de soja SE50MK.

[013] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um meio de cultura incluindo uma fonte de nitrogênio e uma célula de *C. difficile*. Em uma modalidade, a fonte de nitrogênio é um extrato de levedura. Preferencialmente, o extrato de levedura é um HY YEST 412 (Kerry Biosciences).

[014] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um meio de cultura incluindo um vegetal hidrolisado, um extrato de levedura, e uma célula de *C. difficile*. Em uma modalidade, o meio não contém uma fonte de carbono.

[015] Em uma modalidade preferida, o meio ainda inclui uma fonte de carbono. Os inventores descobriram que a fermentação do *C.*

difficile em um meio de cultura inclui pelo menos uma fonte de carbono proporcionou valores altos de OD₆₀₀ e altos rendimentos de produção de toxina, quando comparado a fermentação sem uma fonte de carbono. Em uma modalidade, a fonte de carbono é glicose, manitol, frutose e/ou manose.

[016] Em uma modalidade, a célula de *C. difficile* não é geneticamente modificada. Em outra modalidade, a célula de *C. difficile* é uma célula de *C. difficile* recombinante. Em uma modalidade, a célula de *C. difficile* carece de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina. Em outra modalidade, a célula inclui um promotor constitutivo. Em uma modalidade preferida, o promotor é um promotor de ferredoxina de *Clostridium sporogenes* (fdx). Em uma outra modalidade, a célula não inclui um promotor cromossômico regulado nativo.

[017] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para cultivar *C. difficile*. O método inclui cultivar uma célula *C. difficile* em um meio. Em uma modalidade, o meio inclui hidrolisado de soja e/ou extrato de levedura. Em uma modalidade preferida, o meio ainda inclui uma fonte de carbono. Preferencialmente, a fonte de carbono é glicose.

[018] Em uma modalidade, a etapa de culturação é realizada sob condições anaeróbicas.

[019] Em uma modalidade, o *C. difficile* cresce como uma cultura de semente. Em uma modalidade, a cultura de semente é iniciada pela inoculação a partir da cultura armazenada que cresceu no meio.

[020] Em uma modalidade, o *C. difficile* cresce como uma cultura de fermentação. Em uma modalidade, a cultura de fermentação foi inoculada a partir de uma cultura de semente que cresceu no meio. Em um aspecto alternativo, a invenção refere-se aos métodos para cultivar o *C. difficile*. O método inclui cultivar uma célula *C. difficile* em

um meio de anticorpo monoclonal.

[021] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir uma toxina *C. difficile*. O método inclui cultivar uma célula *C. difficile* em um meio. O método ainda inclui isolar uma toxina *C. difficile* a partir de tal meio.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[022] A figura 1 A-H: alinhamento da sequência da toxina *C. difficile* do tipo selvagem A a partir das cepas 630, VPI10463, R20291, CD196, e uma toxina mutante A tendo uma SEQ ID NO: 4, usando um alinhamento CLUSTALW, parâmetros de padrão.

[023] A figura 2 A-F: alinhamento da sequência da toxina *C. difficile* do tipo selvagem B a partir das cepas 630, VPI10463, R20291, CD196, e uma toxina mutante B tendo uma SEQ ID NO: 6, usando um alinhamento CLUSTALW, parâmetros de padrão.

[024] A figura 3: um gráfico mostrando a identificação das cepas de *C. difficile* de toxina negativa do tipo selvagem. O meio de cultura das 13 cepas de *C. difficile* foi testado por ELISA para a toxina A. como ilustrado, sete cepas expressaram a toxina A e 6 cepas não (cepas 1351, 3232, 7322, 5036, 4811 e VPI 11186).

[025] A figura 4 A e B: resultados de SDS-PAGE ilustrando que o mutante triplo A (SEQ ID NO: 4), o mutante duplo (SEQ ID NO: 5), e o mutante triplo B (SEQ ID NO: 6) não glicosila o Rac1 ou o RhoA GTPases em um ensaio de glicosilação in vitro com um UDP-¹⁴C-glicose; sendo que 10 µg a 1 ng da toxina do tipo selvagem B não glicosila o Rac1.

[026] A figura 5: um Western blot indicando a revogação da atividade de protease de cisteína nas toxinas mutantes A e B (SEQ ID Nos: 4 e 6, respectivamente), quando comparado a observação dos fragmentos clivados das toxinas do tipo selvagem A e B (SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente). Veja o exemplo 13.

[027] A figura 6: gráfico mostrando que as toxinas mutantes triplas A e B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) exibe uma toxicidade residual quando testada em altas concentrações (por exemplo, cerca de 100 µg/ml) por um ensaio de toxicidade in vitro em células IMR-90.

[028] A figura 7: gráfico mostrando que os valores EC₅₀ são similares para a toxina mutante tripla B (SEQ ID No:6) e para a toxina mutante hepta B (SEQ ID NO:8).

[029] A figura 8: gráfico representando os resultados a partir dos testes de toxicidade in vitro em que os níveis de ATP (RLUs) são plotados contra as concentrações elevadas do mutante triplo TcdA (SEQ ID NO:4) (painel superior) e o mutante triplo TcdB (SEQ ID NO: 6) (painel inferior). A toxicidade residual da toxina mutante A e B pode ser completamente revogada com os anticorpos neutralizantes específicos para a toxina A (painel superior-pAb A e mAbs A3-25 + A60-22) e a toxina mutante B (painel inferior-pAb B).

[030] A figura 9: imagens da morfologia de célula IMR-90 em 72 horas após o tratamento. O painel A mostra células de controle tratadas simuladas. O painel B mostra a morfologia de células seguidas do tratamento com um mutante não ativado de formalinaa TcdB (SEQ ID NO: 6). O painel C mostra a morfologia da célula seguida do tratamento com um mutante inativado EDC TcdB (SEQ ID NO: 6). O painel D mostra a morfologia da célula seguida do tratamento com uma toxina do tipo selvagem B (SEQ ID NO: 2). O painel E mostra a morfologia da célula seguida do tratamento com um mutante triplo TcdB (SEQ ID NO: 6). Os resultados similares são observados para os tratamentos com TcdA.

[031] A figura 10: gráfico mostrando um anticorpo neutralizando os títulos como descrito no exemplo 25 (estudo muCdiff2010-06).

[032] A figura 11 A-B: gráfico mostrando um anticorpo

neutralizando os títulos como descrito no exemplo 26 (estudo muCdiff2010-07).

[033] A figura 12: gráfico mostrando as respostas dos anticorpos de neutralização contra as toxinas A e B em ramisters após quatro horas de imunizações como descrito no Exemplo 27 (estudo hamC.*difficile*2010-02).

[034] As figuras 13 A-B: gráfico mostrando a resposta de anticorpo de neutralização em ramisters após a vacinação com as toxinas mutantes genéticas inativadas quimicamente e toxóides da Lista Biológica, como descrito no Exemplo 27 (estudo hamC.*difficile*2010-02).

[035] A figura 14: curvas de sobrevivência para os três grupos imunizados de ramisters quando comparado aos controles não imunizados, descritos no Exemplo 28 (estudo hamC.*difficile*2010-02, continuado).

[036] A figura 15: gráfico mostrando a resposta de anticorpo de neutralização relativo contra as formulações diferentes de toxinas mutantes de *C. difficile* em ramisters (estudo hamC.*difficile*2010-03), como descrito no Exemplo 29.

[037] As figuras 16 A-B: gráficos mostrando uma resposta de anticorpo de neutralização relativo forte contra as toxinas mutantes genéticas inativadas quimicamente A e B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) em macacos cinomolgos, como descrito no Exemplo 30.

[038] A figura 17: sequências de aminoácidos de regiões variáveis de cadeias leve (VL) e pesada (HL) de A3-25 mAb IgE. Peptídeo de sinal-destacado; CDRs- em itálico e sublinhado; região constante- em negrito e sublinhado (sequência completa não mostrada).

[039] A figura 18: gráfico mostrando a titulação de anticorpos

monoclonais de toxina A individuais em um ensaio de neutralização de toxina usando níveis de ATP (quantificados por RLU-unidades de luz) como um indicador de viabilidade celular. Em comparação ao controle de toxina ($4 \times EC_{50}$), mAbs A80-29, A65-33, A60-22 e A3-25 aumentaram os efeitos de neutralização na toxina A com concentração, mas não ao nível do controle anti-toxina A de coelho positivo. mAbs A50-10, A56-33, e A58-46 não neutralizaram a toxina A. O único controle de célula foi $1 - 1,5 \times 10^6$ RLUs.

[040] A figura 19: mapeamento de 8 grupos de epítomos da toxina B mAbs pela BiaCore.

[041] A figura 20 A-C: atividades de neutralização sinérgicas de combinações de toxina A mAbs: adicionando diluições diferentes de anticorpos neutralizantes A60-22, A65-33, e A80-29 para aumentar as concentrações de A3-25 mAb aumentaram sinérgicamente a neutralização da toxina A independentemente da diluição. O RLUs de controle apenas da toxina A ($4 \times EC_{50}$) é ilustrado ($< 0,3 \times 10^6$) e os controles apenas de célula foram $2 - 2,5 \times 10^6$ RLUs como retratado nos gráficos mostrados na figura 20B e na figura 20C.

[042] A figura 21: atividades de neutralização sinérgica da toxina B mAbs: neutralização da toxina B por mAbs 8-26, B60-2 e B59-3 ilustrado na figura 21A. A neutralização da toxina B é sinérgicamente aumentada após a combinação de B8-26 com diluições de B59-3 (figura 21B).

[043] A figura 22: Western blot mostrando que a expressão Rac1 GTPases é reduzida nos extratos da toxina mutante genética B (SEQ ID NO: 6) de 24 a 96 horas, mas não nos extratos da toxina do tipo selvagem B (SEQ ID NO: 2) tratados. As manchas também mostraram que Rac1 é glicosilado nos extratos tratados de toxina B, mas não nos extratos tratados de toxina mutante genética B.

[044] A figura 23 A-K: gráfico representando os resultados a partir

de testes *in vitro* em que os níveis de ATP (RLUs) são plotados ao contrário aumentando as concentrações do meio de cultura de *C. difficile* e conjunto de soro pool (■); toxina crua (colheita de cultura) da cepa respectiva e do conjunto de soro de ramister (●); toxina purificada (toxina comercial obtida pela List Biologicals) e o conjunto de soro de ramister (▲); toxina crua (▼), controle; e toxina purificada (◆), controle. As toxinas das cepas respectivas foram adicionadas as células em valores $4 \times EC_{50}$. A figura 23 mostra que a composição imunogênica incluindo o TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) e o TcdB mutante (SEQ ID NO: 6), sendo que as toxinas mutantes foram inativadas com EDC, de acordo com, por exemplo, o Exemplo 29, Tabela 15, descrita aqui, os anticorpos de neutralização induzidos que exibiram uma atividade de neutralização contra as toxinas a partir de pelo menos as 16 cepas de CDC diferentes seguintes de *C. difficile*, em comparação ao controle apenas da toxina respectiva: 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).

[045] A figura 24: ilustração de uma inativação EDC/NHS exemplar de toxinas de *C. difficile* mutantes, resultando em pelo menos três tipos possíveis de modificações: ligadas em cruz, adutos de glicina, e adutos de beta-alanina. O painel A ilustra ligações cruzadas. Os resíduos carboxílicos de toxinas mutantes triplas são ativados pela adição de EDC e NHS. Os ésteres ativados reagem com as aminas primárias para formar as ligações de amida estáveis, resultando em ligações em cruz intermoleculares. O painel B ilustra a formação de adutos de glicina. Após a inativação, os ésteres ativados residuais são temperados pela adição de glicina para formar as ligações de amida estáveis. O painel C ilustra a formação de adutos de

beta-alanina. Três moles de NHS podem reagir com mole de EDC para formar uma beta-alanina ativada. Este então reage com as aminas primárias para formar as ligações de amida estáveis.

[046] A figura 25: ilustração de uma inativação EDC/NHS exemplar de toxinas *C. difficile* mutantes, resultando em pelo menos um dos seguintes tipos de modificações: (A) ligadas em cruz, (B) adutos de glicina, e (C) adutos de beta-alanina.

[047] Figura 26: gráfico representando os resultados a partir de um ensaio de toxicidade in vitro em que os níveis de ATP (RLUs) (72 hr ATP) são plotadas ao contrário aumentando as concentrações de TcdB do tipo selvagem, comercialmente obtida pela List Biologicals (□), TcdB mutante triplo (SEQ ID NO: 86)(●), e TcdB mutante penta (SEQ ID NO: 184) (■). As células IMR-90 (★) foram usadas como controle.

[048] A figura 27: mostrando uma inibição competitiva de toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 86)-citotoxicidade mediada pela toxina mutante penta B (SEQ ID NO: 184) nas células IMR -90, (72 hr ATP ensaio). –●– representa a toxina mutante penta B (SEQ ID NO: 184)(“PM-B”); –▲– representa a mutante tripla (TM) em 200 ng/mL.

[049] A figura 28: gráfico mostra o OD final e o resultado de título de toxina mutante tripla B (mg/l) seguindo uma fermentação de perfusão (CDF-5126). –●– representa OD_{600 nm}; –▲– representa a taxa de fluxo de perfusão (volumes do fermentador/2,0h); –■– representa glicose (g/L); –●– representa o toxóide B (mutante triplo, SEQ ID NO: 86).

[050] A figura 29: gráfico mostrando o OD final e o resultado de título de toxina mutante tripla B (mg/l) a partir de outra cultura de perfusão (CDF-5127). –●– representa OD_{600 nm}; –▲– representa a taxa de fluxo de perfusão (volumes do fermentador/2,0h); –■– representa glicose (g/L); –●– representa um toxóide B (mutante triplo,

SEQ ID NO: 86).

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

[051] SEQ ID NO: 1 estabelece a sequência de aminoácido para a toxina 630 C. difficile do tipo selvagem A (TcdA).

[052] SEQ ID NO: 2 estabelece a sequência de aminoácido para a toxina 630 C. difficile do tipo selvagem B (TcdB).

[053] SEQ ID NO: 3 estabelece a sequência de aminoácido para o TcdA mutante tendo uma mutação nas posições 285 e 287, quando comparado a SEQ ID NO: 1.

[054] SEQ ID NO: 4 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdA mutante tendo uma mutação nas posições 285, 287, e 700, quando comparado a SEQ ID NO: 1.

[055] SEQ ID NO: 5 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdB mutante tendo uma mutação nas posições 286 e 288, quando comparado a SEQ ID NO: 2.

[056] SEQ ID NO: 6 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdB mutante tendo uma mutação nas posições 286, 288, e 698, quando comparado a SEQ ID NO: 2.

[057] SEQ ID NO: 7 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdA mutante tendo uma mutação nas posições 269, 272, 285, 287, 460, 462, e 700, quando comparado a SEQ ID NO: 1

[058] SEQ ID NO: 8 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdB mutante tendo uma mutação nas posições 270, 273, 286, 288, 461, 463, e 698, quando comparado a SEQ ID NO: 2

[059] SEQ ID NO: 9 estabelece uma sequência de DNA codificando a toxina 630 C. difficile do tipo selvagem A (TcdA).

[060] SEQ ID NO: 10 estabelece uma sequência de DNA codificando a toxina 630 C. difficile do tipo selvagem B (TcdB).

[061] SEQ ID NO: 11 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 3

- [062] SEQ ID NO: 12 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 4
- [063] SEQ ID NO: 13 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 5
- [064] SEQ ID NO: 14 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 6
- [065] SEQ ID NO: 15 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA R20291 C. difficile do tipo selvagem.
- [066] SEQ ID NO: 16 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 15.
- [067] SEQ ID NO: 17 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA CD196 C. difficile do topo selvagem.
- [068] SEQ ID NO: 18 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 17.
- [069] SEQ ID NO: 19 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA VPI10463 C. difficile do tipo selvagem.
- [070] SEQ ID NO: 20 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 19.
- [071] SEQ ID NO: 21 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB R20291 C.difficile do tipo selvagem.
- [072] SEQ ID NO: 22 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 21.
- [073] SEQ ID NO: 23 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB CD196 C.difficile do tipo selvagem.
- [074] SEQ ID NO: 24 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 23.
- [075] SEQ ID NO: 25 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB VPI10463 C.difficile do tipo selvagem.
- [076] SEQ ID NO: 26 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 25.

[077] SEQ ID NO: 27 estabelece uma sequência de DNA de um local de patogenicidade do VPI10463 *C.difficile* do tipo selvagem.

[078] SEQ ID NO: 28 estabelece a sequência de aminoácido para os resíduos 101 a 293 da SEQ ID NO: 1.

[079] SEQ ID NO: 29 estabelece a sequência de aminoácido para resíduos 1 a 542 da SEQ ID NO: 1.

[080] SEQ ID NO: 30 estabelece a sequência de aminoácido para resíduos 101 a 293 da SEQ ID NO: 2.

[081] SEQ ID NO: 31 estabelece a sequência de aminoácido para resíduos 1 a 543 da SEQ ID NO: 2.

[082] SEQ ID NO: 32 estabelece a sequência de aminoácido para resíduos 543 a 809 da SEQ ID NO: 1.

[083] SEQ ID NO: 33 estabelece a sequência de aminoácido para resíduos 544 a 767 da SEQ ID NO: 2.

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

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

[086] SEQ ID NO: 36 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia leve variável de anticorpo de neutralização do TcdA *C. difficile* (A3-25 mAb).

[087] SEQ ID NO: 37 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização do TcdA *C. difficile* (A3-25 mAb).

[088] SEQ ID NO: 38 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia leve variável do anticorpo de neutralização de TcdA *C. difficile* (A3-25 mAb).

[089] SEQ ID NO: 39 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia leve variável de anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdA (A3-25 mAb).

[090] SEQ ID NO: 40 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia leve variável de anticorpo de neutralização de TcdA *C. difficile* (A3-25 mAb).

[091] SEQ ID NO: 41 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia pesada variável de anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdA (A3-25 mAb).

[092] SEQ ID NO: 42 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia pesada variável de anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdA (A3-25 mAb).

[093] SEQ ID NO: 43 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia pesada variável de anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdA (A3-25 mAb).

[094] SEQ ID NO: 44 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 3.

[095] SEQ ID NO: 45 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 4.

[096] SEQ ID NO: 46 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 5.

[097] SEQ ID NO: 47 estabelece uma sequência de DNA codificando a SEQ ID NO: 6.

[098] SEQ ID NO: 48 estabelece uma sequência de nucleotídeo oligonucleotídeo imunoestimulatório ODN CpG 24555.

[099] SEQ ID NO: 49 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB *C. difficile* (B8-26 mAb).

[0100] SEQ ID NO: 50 estabelece a sequência de aminoácido para o peptídeo de sinal de uma cadeia pesada variável de um anticorpo de

neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0101] SEQ ID NO: 51 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0102] SEQ ID NO: 52 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0103] SEQ ID NO: 53 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0104] SEQ ID NO: 54 estabelece a sequência de aminoácido para a região constante da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0105] SEQ ID NO: 55 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0106] SEQ ID NO: 56 estabelece a sequência de aminoácido para o peptídeo de sinal da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0107] SEQ ID NO: 57 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0108] SEQ ID NO: 58 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0109] SEQ ID NO: 59 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B8-26 mAb).

[0110] SEQ ID NO: 60 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C.

difficile (B59-3 mAb).

[0111] SEQ ID NO: 61 estabelece a sequência de aminoácido para o peptídeo de sinal da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0112] SEQ ID NO: 62 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0113] SEQ ID NO: 63 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0114] SEQ ID NO: 64 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0115] SEQ ID NO: 65 estabelece a sequência de aminoácido para a região constante da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0116] SEQ ID NO: 66 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0117] SEQ ID NO: 67 estabelece a sequência de aminoácido para o peptídeo de sinal da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0118] SEQ ID NO: 68 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0119] SEQ ID NO: 69 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0120] SEQ ID NO: 70 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de

TcdB C. difficile (B59-3 mAb).

[0121] SEQ ID NO: 71 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0122] SEQ ID NO: 72 estabelece a sequência de aminoácido para o peptídeo de sinal da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0123] SEQ ID NO: 73 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0124] SEQ ID NO: 74 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0125] SEQ ID NO: 75 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0126] SEQ ID NO: 76 estabelece a sequência de aminoácido para a região constante da cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0127] SEQ ID NO: 77 estabelece a sequência de aminoácido para a cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0128] SEQ ID NO: 78 estabelece a sequência de aminoácido para o peptídeo de sinal da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0129] SEQ ID NO: 79 estabelece a sequência de aminoácido para CDR1 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0130] SEQ ID NO: 80 estabelece a sequência de aminoácido para CDR2 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de

TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0131] SEQ ID NO: 81 estabelece a sequência de aminoácido para CDR3 da cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de TcdB C. difficile (B9-30 mAb).

[0132] SEQ ID NO: 82 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdB mutante, sendo que um resíduo nas posições 102, 270, 273, 286, 288, 384, 461, 463, 520, 543, 544, 587, 600, 653, 698, e 751 podem ser qualquer aminoácido.

[0133] SEQ ID NO: 83 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdA mutante tendo uma mutação nas posições 269, 272, 285, 287, 460, 462, e 700, quando comparado a SEQ ID NO: 1, sendo que a metionina na posição 1 é ausente.

[0134] SEQ ID NO: 84 estabelece a sequência de aminoácido para a toxina C. difficile mutante A tendo uma mutação nas posições 285, 287, e 700, quando comparado a SEQ ID NO: 1, sendo a metionina na posição 1 é ausente.

[0135] SEQ ID NO: 85 estabelece a sequência de aminoácido para a toxina C. difficile mutante B tendo uma mutação nas posições 270, 273, 286, 288, 461, 463, e 698, quando comparado a SEQ ID NO: 2, sendo que a metionina na posição 1 é ausente.

[0136] SEQ ID NO: 86 estabelece a sequência de aminoácido para a toxina C. difficile mutante B tendo uma mutação nas posições 286, 288, e 698, quando comparado a SEQ ID NO: 2, sendo que a metionina na posição 1 é ausente.

[0137] SEQ ID NO: 87 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2004013 C. difficile do tipo selvagem.

[0138] SEQ ID NO: 88 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2004111 C. difficile do tipo selvagem.

[0139] SEQ ID NO: 89 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2004118 C. difficile do tipo selvagem.

- [0140] SEQ ID NO: 90 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2004205 C. difficile do tipo selvagem.
- [0141] SEQ ID NO: 91 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2004206 C. difficile do tipo selvagem.
- [0142] SEQ ID NO: 92 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2005022 C. difficile do tipo selvagem.
- [0143] SEQ ID NO: 93 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2005088 C. difficile do tipo selvagem.
- [0144] SEQ ID NO: 94 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2005283 C. difficile do tipo selvagem.
- [0145] SEQ ID NO: 95 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2005325 C. difficile do tipo selvagem.
- [0146] SEQ ID NO: 96 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2005359 C. difficile do tipo selvagem.
- [0147] SEQ ID NO: 97 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2006017 C. difficile do tipo selvagem.
- [0148] SEQ ID NO: 98 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2007070 C. difficile do tipo selvagem.
- [0149] SEQ ID NO: 99 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2007217 C. difficile do tipo selvagem.
- [0150] SEQ ID NO: 100 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2007202 C. difficile do tipo selvagem.
- [0151] SEQ ID NO: 101 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2007816 C. difficile do tipo selvagem.
- [0152] SEQ ID NO: 102 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2007838 C. difficile do tipo selvagem.
- [0153] SEQ ID NO: 103 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2007858 C. difficile do tipo selvagem.
- [0154] SEQ ID NO: 104 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2007886 C. difficile do tipo selvagem.

- [0155] SEQ ID NO: 105 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2008222 C. difficile do tipo selvagem.
- [0156] SEQ ID NO: 106 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2009078 C. difficile do tipo selvagem.
- [0157] SEQ ID NO: 107 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2009087 C. difficile do tipo selvagem.
- [0158] SEQ ID NO: 108 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2009141 C. difficile do tipo selvagem.
- [0159] SEQ ID NO: 109 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 2009292 C. difficile do tipo selvagem.
- [0160] SEQ ID NO: 110 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2004013 C. difficile do tipo selvagem.
- [0161] SEQ ID NO: 111 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2004111 C. difficile do tipo selvagem.
- [0162] SEQ ID NO: 112 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2004118 C. difficile do tipo selvagem.
- [0163] SEQ ID NO: 113 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2004205 C. difficile do tipo selvagem.
- [0164] SEQ ID NO: 114 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2004206 C. difficile do tipo selvagem.
- [0165] SEQ ID NO: 115 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2005022 C. difficile do tipo selvagem.
- [0166] SEQ ID NO: 116 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2005088 C. difficile do tipo selvagem.
- [0167] SEQ ID NO: 117 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2005283 C. difficile do tipo selvagem.
- [0168] SEQ ID NO: 118 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2005325 C. difficile do tipo selvagem.
- [0169] SEQ ID NO: 119 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2005359 C. difficile do tipo selvagem.

- [0170] SEQ ID NO: 120 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2006017 C. difficile do tipo selvagem.
- [0171] SEQ ID NO: 121 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2006376 C. difficile do tipo selvagem.
- [0172] SEQ ID NO: 122 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2007070 C. difficile do tipo selvagem.
- [0173] SEQ ID NO: 123 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2007217 C. difficile do tipo selvagem.
- [0174] SEQ ID NO: 124 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2007302 C. difficile do tipo selvagem.
- [0175] SEQ ID NO: 125 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2007816 C. difficile do tipo selvagem.
- [0176] SEQ ID NO: 126 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2007838 C. difficile do tipo selvagem.
- [0177] SEQ ID NO: 127 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2007858 C. difficile do tipo selvagem.
- [0178] SEQ ID NO: 128 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2007886 C. difficile do tipo selvagem.
- [0179] SEQ ID NO: 129 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2008222 C. difficile do tipo selvagem.
- [0180] SEQ ID NO: 130 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2009078 C. difficile do tipo selvagem.
- [0181] SEQ ID NO: 131 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2009087 C. difficile do tipo selvagem.
- [0182] SEQ ID NO: 132 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2009141 C. difficile do tipo selvagem.
- [0183] SEQ ID NO: 133 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 2009292 C. difficile do tipo selvagem.
- [0184] SEQ ID NO: 134 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 014 C. difficile do tipo selvagem.

- [0185] SEQ ID NO: 135 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 015 C. difficile do tipo selvagem.
- [0186] SEQ ID NO: 136 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 020 C. difficile do tipo selvagem.
- [0187] SEQ ID NO: 137 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 023 C. difficile do tipo selvagem.
- [0188] SEQ ID NO: 138 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 027 C. difficile do tipo selvagem.
- [0189] SEQ ID NO: 139 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 029 C. difficile do tipo selvagem.
- [0190] SEQ ID NO: 140 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 046 C. difficile do tipo selvagem.
- [0191] SEQ ID NO: 141 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 014 C. difficile do tipo selvagem.
- [0192] SEQ ID NO: 142 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 015 C. difficile do tipo selvagem.
- [0193] SEQ ID NO: 143 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 020 C. difficile do tipo selvagem.
- [0194] SEQ ID NO: 144 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 023 C. difficile do tipo selvagem.
- [0195] SEQ ID NO: 145 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 027 C. difficile do tipo selvagem.
- [0196] SEQ ID NO: 146 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 029 C. difficile do tipo selvagem.
- [0197] SEQ ID NO: 147 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 046 C. difficile do tipo selvagem.
- [0198] SEQ ID NO: 148 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 001 C. difficile do tipo selvagem.
- [0199] SEQ ID NO: 149 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 002 C. difficile do tipo selvagem.

- [0200] SEQ ID NO: 150 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 003 C. difficile do tipo selvagem.
- [0201] SEQ ID NO: 151 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 004 C. difficile do tipo selvagem.
- [0202] SEQ ID NO: 152 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 070 C. difficile do tipo selvagem.
- [0203] SEQ ID NO: 153 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 075 C. difficile do tipo selvagem.
- [0204] SEQ ID NO: 154 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 077 C. difficile do tipo selvagem.
- [0205] SEQ ID NO: 155 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 081 C. difficile do tipo selvagem.
- [0206] SEQ ID NO: 156 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 117 C. difficile do tipo selvagem.
- [0207] SEQ ID NO: 157 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 131 C. difficile do tipo selvagem.
- [0208] SEQ ID NO: 158 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 001 C. difficile do tipo selvagem.
- [0209] SEQ ID NO: 159 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 002 C. difficile do tipo selvagem.
- [0210] SEQ ID NO: 160 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 003 C. difficile do tipo selvagem.
- [0211] SEQ ID NO: 161 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 004 C. difficile do tipo selvagem.
- [0212] SEQ ID NO: 162 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 070 C. difficile do tipo selvagem.
- [0213] SEQ ID NO: 163 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 075 C. difficile do tipo selvagem.
- [0214] SEQ ID NO: 164 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 077 C. difficile do tipo selvagem.

- [0215] SEQ ID NO: 165 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 081 C. difficile do tipo selvagem.
- [0216] SEQ ID NO: 166 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 117 C. difficile do tipo selvagem.
- [0217] SEQ ID NO: 167 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 131 C. difficile do tipo selvagem.
- [0218] SEQ ID NO: 168 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 053 C. difficile do tipo selvagem.
- [0219] SEQ ID NO: 169 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 078 C. difficile do tipo selvagem.
- [0220] SEQ ID NO: 170 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 087 C. difficile do tipo selvagem.
- [0221] SEQ ID NO: 171 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 095 C. difficile do tipo selvagem.
- [0222] SEQ ID NO: 172 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 126 C. difficile do tipo selvagem.
- [0223] SEQ ID NO: 173 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 053 C. difficile do tipo selvagem.
- [0224] SEQ ID NO: 174 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 078 C. difficile do tipo selvagem.
- [0225] SEQ ID NO: 175 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 087 C. difficile do tipo selvagem.
- [0226] SEQ ID NO: 176 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 095 C. difficile do tipo selvagem.
- [0227] SEQ ID NO: 177 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 126 C. difficile do tipo selvagem.
- [0228] SEQ ID NO: 178 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 059 C. difficile do tipo selvagem.
- [0229] SEQ ID NO: 179 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 059 C. difficile do tipo selvagem.

[0230] SEQ ID NO: 180 estabelece a sequência de aminoácido para TcdA 106 C. difficile do tipo selvagem.

[0231] SEQ ID NO: 181 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 106 C. difficile do tipo selvagem.

[0232] SEQ ID NO: 182 estabelece a sequência de aminoácido para TcdB 017 C. difficile do tipo selvagem.

[0233] SEQ ID NO: 183 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdA mutante tendo uma mutação nas posições 285, 287, 700, 972, e 978 quando comparado a SEQ ID NO: 1.

[0234] SEQ ID NO: 184 estabelece a sequência de aminoácido para a TcdB mutante tendo uma mutação nas posições 286, 288, 698, 970, e 976 quando comparado a SEQ ID NO: 2.

[0235] SEQ ID NO: 185 até a SEQ ID NO: 195 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante exemplar.

[0236] SEQ ID NO: 196 até a SEQ ID NO: 212 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0237] SEQ ID NO: 213 até a SEQ ID NO: 222 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0238] SEQ ID NO: 223 até a SEQ ID NO: 236 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0239] SEQ ID NO: 237 até a SEQ ID NO: 243 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0240] SEQ ID NO: 244 até a SEQ ID NO: 245 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0241] SEQ ID NO: 246 até a SEQ ID NO: 249 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0242] SEQ ID NO: 250 até a SEQ ID NO: 253 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0243] SEQ ID NO: 254 estabelece a sequência de aminoácido para uma toxina mutante exemplar.

[0244] SEQ ID NO: 255 até a SEQ ID NO: 263 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0245] SEQ ID NO: 264 até a SEQ ID NO: 269 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0246] SEQ ID NO: 270 até a SEQ ID NO: 275 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante exemplar.

[0247] SEQ ID NO: 276 até a SEQ ID NO: 323 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0248] SEQ ID NO: 324 até a SEQ ID NO: 373 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0249] SEQ ID NO: 374 até a SEQ ID NO: 421 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0250] SEQ ID NO: 422 até a SEQ ID NO: 471 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0251] SEQ ID NO: 472 até a SEQ ID NO: 519 cada uma

estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0252] SEQ ID NO: 568 até a SEQ ID NO: 615 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0253] SEQ ID NO: 520 até a SEQ ID NO: 567 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0254] SEQ ID NO: 616 até a SEQ ID NO: 663 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

[0255] SEQ ID NO: 664 até a SEQ ID NO: 711 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante A exemplar.

[0256] SEQ ID NO: 712 até a SEQ ID NO: 761 cada uma estabelece uma sequência de aminoácido para uma toxina mutante B exemplar.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0257] Surpreendentemente os inventores descobriram, entre outras coisas, uma toxina de *C. difficile* mutante A e uma toxina B, e métodos dos mesmos. Os mutantes são caracterizados, em parte, por ser imunogênicos e exibirem uma toxicidade reduzida comparado com uma forma do tipo selvagem da toxina respectiva. A presente invenção também refere-se a partes imunogênicas do mesmo, equivalentes biológicos do mesmo, e polinucleotídeos isolados que incluem sequências de ácido nucléico codificando qualquer um dos acima mencionados.

[0258] As composições imunogênicas descritas aqui inesperadamente demonstraram a capacidade de provocar novos anticorpos de neutralização contra as toxinas *C. difficile* e eles podem

ter a capacidade de conferir uma proteção ativa e/ou passiva contra um desafio de *C. difficile*. Os novos anticorpos são direcionados contra vários epítomos de toxina A e de toxina B. Os inventores ainda descobriram que uma combinação de pelo menos dois anticorpos monoclonais de neutralização podem exibir um efeito sinérgico inesperado na respectiva neutralização *in vitro* da toxina A e da toxina B.

[0259] As composições inventivas descritas aqui podem ser usadas para tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a ocorrência de, diminuir a gravidade de, e/ou retardar o início de uma infecção por *C. difficile*, uma doença associada ao *C. difficile* (CDAD), síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não foi administrada.

[0260] Além disso, os inventores descobriram uma célula de *C. difficile* asporogênica recombinante que pode expressar estavelmente a toxina A e a toxina B de *C. difficile* mutante, e novos métodos para a produção do mesmo.

COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS

[0261] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina de *C. difficile* mutante. A toxina de *C. difficile* mutante inclui uma sequência de aminoácido tendo pelo menos uma mutação em um domínio de glicosiltransferase e pelo menos uma mutação em um domínio de protease de cisteína, relativo a uma toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0262] O termo “tipo selvagem”, como usado aqui, refere-se a forma encontrada na natureza. Por exemplo, uma sequência de polinucleotídeo ou polipeptídeo do tipo selvagem é uma sequência presente em um organismo que pode ser isolado a partir de uma fonte na natureza e que não tenha sido intencionalmente modificado por

manipulação humana. A presente invenção também refere-se a polinucleotídeos isolados que incluem sequências de ácido nucléico codificando qualquer um dos acima mencionados. Além disso, a presente invenção refere-se ao uso de qualquer uma das composições acima mencionadas para tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir a ocorrência de, e/ou retardar o início de uma infecção por *C. difficile*, uma doença associada ao *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada, assim como os métodos para a preparação de tais composições.

[0263] Como usado aqui, uma “composição imunogênica” ou “imunógeno” refere-se a uma composição que provoca uma resposta imune em um mamífero ao qual a composição é administrada.

[0264] Uma “resposta imune” refere-se ao desenvolvimento de um humoral benéfico (mediado por anticorpo) e/ou uma resposta celular (mediada por células T específicas de antígeno ou seus produtos de secreção) direcionadas contra a toxina *C. difficile* em um paciente recipiente. A resposta imune pode ser humoral, celular ou ambas.

[0265] A resposta imune pode ser uma resposta ativa induzida pela administração de uma composição imunogênica, um imunógeno. Alternativamente, a resposta imune pode ser uma resposta passiva induzida pela administração de um anticorpo ou de células T preparadas.

[0266] A presença de uma resposta imune humoral (mediada por anticorpo) pode ser determinada, por exemplo, por ensaios com base em células conhecidos na arte, tal como um ensaio de anticorpo de neutralização, ELISA, etc.

[0267] Uma resposta imune celular é tipicamente provocada pela apresentação de epítopos de polipeptídeo em associação com

moléculas MHC de Classe I ou Classe II para ativar as células de ajuda T+ CD4 específicas de antígeno e/ou células T citotóxicas CD8+. A resposta também pode envolver a ativação de monócitos, macrófagos, células Nk, basófilos, células dendríticas, astrócitos, células micróglia, eosinófilos ou outros componentes de imunidade inata. A presença de uma resposta imunológica mediada por célula pode ser determinada por ensaios de proliferação (células T CD4 +) ou ensaios CTL (linfócitos T citotóxicos) conhecidos na arte.

[0268] Em uma modalidade, uma composição imunogênica é uma composição de vacina. Como usado aqui, uma “composição de vacina” é uma composição que provoca uma resposta imune em um mamífero ao qual a composição é administrada. A composição de vacina pode proteger o mamífero imunizado contra o desafio subsequente pelo agente de imunização ou um agente reagente em cruz imunologicamente. A proteção pode ser completa ou parcial com relação a redução nos sintomas ou na infecção quando comparado a um mamífero não vacinado sob as mesmas condições.

[0269] As composições imunogênicas descritas aqui são reativas em cruz, que se refere a ter uma característica de ser capaz de provocar uma resposta imune eficaz (por exemplo, uma resposta imune humoral) contra uma toxina produzida por outra cepa de *C. difficile* que é diferente da cepa a partir da qual a composição é derivada. Por exemplo, as composições imunológicas (por exemplo, derivadas de *C. difficile* 630) descritas aqui podem provocar anticorpos reativos em cruz que podem se ligar a toxinas produzidas pelas cepas de *C. difficile* (por exemplo, toxinas produzidas por *C. difficile* R20291 e VPI10463). Veja, por exemplo, o exemplo 37. A reatividade em cruz é um indicativo do potencial de proteção em cruz do imunógeno bacteriano, e vice versa.

[0270] O termo “protetivo em cruz” como usado aqui, refere-se a

capacidade da resposta imune induzida por uma composição imunogênica de prevenir ou atenuar uma infecção por uma cepa bacteriana diferente ou espécies do mesmo gênero. Por exemplo, uma composição imunogênica (por exemplo, derivada de *C. difficile* 630) descrita aqui pode induzir uma resposta imune eficaz em um mamífero para atenuar uma infecção de *C. difficile* e/ou para atenuar uma doença de *C. difficile* causada por uma cepa outra que não a 630 (por exemplo, *C. difficile* R20291) em mamíferos.

[0271] Os mamíferos exemplares nos quais a composição imunogênica ou o imunógeno provoca uma resposta imune inclui qualquer mamífero, tais como, por exemplo, camundongo, ratos, primatas e humanos. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica ou imunógeno provoca uma resposta imune em um humano ao qual a composição é administrada.

[0272] Como descrito acima, a toxina A (TcdA) e a toxina B (TcdB) são glucosiltransferases homólogas que inativam os GTPases pequenos da família Rho/Rac/Ras. A ação de TcdA e TcdB em células alvo de mamíferos depende de um mecanismo multi-etapas de endocitose mediada por receptor, translocação de membrana, processamento autoproteolítico, e monoglucosilação de GTPases. Muitas destas atividades funcionais têm sido descritas para regiões diferentes dentro da sequência primária das toxinas, e as toxinas têm sido imaginadas para mostrar que estas moléculas são similares em estrutura.

[0273] O gene do tipo selvagem para TcdA tem cerca de 8130 nucleotídeos que codificam uma proteína tendo um peso molecular deduzido de cerca de 308-kDa, tendo cerca de 2710 aminoácidos. Como usado aqui, um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui TcdA de *C. difficile* a partir de qualquer cepa de *C. difficile* do tipo selvagem. Um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem pode incluir uma sequência

de aminoácido TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade para a SEQ ID NO: 1 (comprimento completo) quando otimamente alinhada, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de espaço padrão.

[0274] Em uma modalidade preferida, o TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 1, que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem para TcdA a partir da cepa *C. difficile* 630 (também divulgada no número de acesso no GenBank YP_001087137.1 e/ou CAJ67494.1). A cepa *C. difficile* 630 é conhecida na arte como sendo uma cepa 012 de ribotipo PCR. A SEQ ID NO: 9 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA a partir da cepa *C. difficile* 630, que também é divulgada no número de acesso do GenBank NC_009089.1.

[0275] Outro exemplo de um TcdA *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 15, que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem para TcdA a partir da cepa *C. difficile* R20291 (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_003217088.1). A cepa *C. difficile* R20291 é conhecida na arte como sendo uma cepa hipervirulenta e a cepa 027 de ribotipo PCR. A sequência de aminoácido para TcdA a partir da cepa de *C. difficile* R20291 tem cerca de 98% de identidade para a SEQ ID NO:1. A SEQ ID NO: 16 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA a partir da cepa *C. difficile* R20291, que também é divulgada no número de acesso do GenBank NC_013316.1.

[0276] Um exemplo adicional de um TcdA *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 17, que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem

para TcdA a partir da cepa *C. difficile* CD196 (também divulgada no número de acesso do GenBank CBA61156.1). O CD196 é uma cepa de um surto canadense recente, e é conhecido na arte como cepa 027 de ribotipo PCR. A sequência de aminoácido para TcdA a partir da cepa *C. difficile* CD196 tem cerca de 98% de identidade com a SEQ ID NO: 1, e tem cerca de 100% de identidade com a TcdA a partir da cepa *C. difficile* R20291. A SEQ ID NO: 18 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA a partir da cepa *C. difficile* CD196, que também é divulgada no número de acesso do GenBank FN538970.1.

[0277] Outros exemplos de uma sequência de aminoácido para um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui a SEQ ID NO: 19, que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem para TcdA a partir da cepa *C. difficile* VPI10463 (também divulgada no número de acesso do GenBank CAA63564.1). A sequência de aminoácido para TcdA a partir da cepa *C. difficile* VPI10463 tem cerca de 100% (99.8%) de identidade com a SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 20 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA a partir da cepa *C. difficile* VPI10463, que também é divulgada no número de acesso do GenBank X92982.1.

[0278] Os exemplos adicionais de um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem incluem o TcdA a partir de cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas a partir do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Atlanta, GA). Os inventores descobriram que a sequência de aminoácido de TcdA das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas do CDC incluem pelo menos cerca de 99,3% a 100% de identidade, quando otimamente alinhado, aos resíduos de aminoácidos de 1 a 821 da SEQ ID NO: 1 (TcdA a partir de *C. difficile* 630). Veja a Tabela 1.

[0279] Os inventores também descobriram que a sequência de aminoácido de TcdA das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem podem incluir pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, a cerca de 100% de identidade, quando alinhado otimamente (por exemplo, quando as sequências de comprimento completo são otimamente alinhadas) a SEQ ID NO: 1.

[0280] Tabela 1: cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas a partir do CDC e a porcentagem de identidade dos resíduos de aminoácidos 1-821 de TcdA a partir da cepa de *C. difficile* do tipo selvagem respectiva para os resíduos de aminoácidos 1-821 da SEQ ID NO: 1, quando otimamente alinhados.

Tabela 1: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem a partir de CDC	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	% aproximada de identidade de aminoácido com os resíduos 1-821 da SEQ ID NO: 1
2004111	100
2004118	99,6
2004205	100
2004206	100
2005325	99,3
2005359	99,6
2006017	100
2007070	100
2007302	100
2007816	99,3
2007838	99,6
2007886	99,6
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100
2009292	99,6

[0281] Portanto, em uma modalidade, a sequência de aminoácido de TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de pelo

menos cerca de 500, 600, 700, ou 800 resíduos contíguos, que tem pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99%, ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com a uma sequência de igual comprimento entre os resíduos de 1 a 900 da SEQ ID NO: 1 quando otimamente alinhados, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando os pesos de espaço padrão. Os exemplos incluem as cepas descritas acima (por exemplo, R20291, CD196, etc) e aquelas listadas na Tabela 1.

[0282] Em outra modalidade, a sequência de aminoácido de TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferencialmente cerca de 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com qualquer sequência selecionada a partir da SEQ ID NOs: 87-109 quando otimamente alinhados. Veja Tabela 1-a.

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

Tabela 1-a: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	Toxina A, SEQ ID NO:
2007070	SEQ ID NO: 98
2007217	SEQ ID NO: 99
2007302	SEQ ID NO: 100
2007816	SEQ ID NO: 101
2007838	SEQ ID NO: 102
2007858	SEQ ID NO: 103
2007886	SEQ ID NO: 104
2008222	SEQ ID NO: 105
2009078	SEQ ID NO: 106
2009087	SEQ ID NO: 107
2009141	SEQ ID NO: 108
2009292	SEQ ID NO: 109
001	SEQ ID NO: 148
002	SEQ ID NO: 149
003	SEQ ID NO: 150
012 (004)	SEQ ID NO: 151
014	SEQ ID NO: 134
015	SEQ ID NO: 135
017	
020	SEQ ID NO: 136
023	SEQ ID NO: 137
027	SEQ ID NO: 138
029	SEQ ID NO: 139
046	SEQ ID NO: 140
053	SEQ ID NO: 168
059	SEQ ID NO: 178
070	SEQ ID NO: 152

Tabela 1-a: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	Toxina A, SEQ ID NO:
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

[0283] O gene do tipo selvagem para TcdB tem cerca de 7098 nucleotídeos que codificam uma proteína com um peso molecular deduzido de cerca de 270 kDa, tendo cerca de 2366 aminoácidos. Como usado aqui, um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui um TcdB de *C. difficile* de qualquer cepa de *C. difficile* do tipo selvagem. O TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem pode incluir uma sequência de aminoácido do tipo selvagem tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com a SEQ ID NO: 2 quando otimamente alinhados, tal como pelo programa GAP ou BESTFIT usando os pesos

de espaço padrão. Em uma modalidade preferida, o TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 2, que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* 630 (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_001087135.1 e/ou CAJ67492). A SEQ ID NO: 10 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* 630, que também é divulgada no número de acesso do GenBank NC_009089.1.

[0284] Outro exemplo de um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 21, que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* R20291 (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_003217086.1 e/ou CBE02479.1). A sequência de aminoácido para TcdB a partir da cepa *C. difficile* R20291 tem cerca de 92% de identidade com a SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 22 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* R20291, que também é divulgada no número de acesso do GenBank NC_013316.1.

[0285] Um exemplo adicional de um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 23, que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* CD196 (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_003213639.1 e/ou CBA61153.1). A SEQ ID NO: 24 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* CD196, que também é divulgada no número de acesso do GenBank NC_013315.1. A sequência de aminoácido para TcdB a partir da cepa *C. difficile* CD196 tem cerca de 92% de identidade com a SEQ ID NO: 2.

[0286] Outros exemplos de uma sequência de aminoácido para um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem incluem a SEQ ID NO: 25,

que descreve a sequência de aminoácido do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* VPI10463 (também divulgada no número de acesso do GenBank P18177 e/ou CAA37298). A sequência de aminoácido para TcdB a partir da cepa *C. difficile* VPI10463 tem 100% de identidade com a SEQ ID NO: 2. A SEQ ID NO: 26 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB a partir da cepa *C. difficile* VPI10463, que também é divulgada no número de acesso do GenBank X53138.1.

[0287] Os exemplos adicionais de um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem incluem TcdB a partir de cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas a partir do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Atlanta, GA). Os inventores também descobriram que a sequência de aminoácido de TcdB a partir das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas a partir do CDC incluem pelo menos cerca de 96% to 100% de identidade, quando otimamente alinhados, para os resíduos de aminoácidos de 1 a 821 da SEQ ID NO: 2 (TcdB de *C. difficile* 630). Veja a Tabela 2.

[0288] Tabela 2: cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas a partir do CDC e a % de identidade dos resíduos de aminoácidos de 1-821 do TcdB a partir da cepa de *C. difficile* do tipo selvagem respectiva pra os resíduos de aminoácidos de 1-821 da SEQ ID NO: 2, quando otimamente alinhados.

Tabela 2: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem a partir do CDC	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	% aproximada de identidade de aminoácido com os resíduos de 1-821 da SEQ ID NO: 2
2004013	96,0
2004111	100
2004118	96,0
2004206	100
2005022	100
2005325	96,7

Tabela 2: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem a partir do CDC	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	% aproximada de identidade de aminoácido com os resíduos de 1-821 da SEQ ID NO: 2
2007302	100
2007816	96,7
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100

[0289] Portanto, em uma modalidade, a sequência de aminoácido de TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de pelo menos cerca de 500, 600, 700, ou 800 resíduos contíguos, que tem pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferencialmente cerca de 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com a uma sequência de igual comprimento entre os resíduos de 1 a 900 da SEQ ID NO: 2 quando otimamente alinhados, tal como pelo programa GAP ou BESTFIT usando os pesos de espaço padrão. Os exemplos incluem as cepas descritas acima (por exemplo, R20291, CD196, etc) e aquelas listadas na Tabela 2.

[0290] Em outra modalidade, a sequência de aminoácido de TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferencialmente cerca de 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com qualquer sequência selecionada a partir da SEQ ID NOs: 110-133 quando otimamente alinhados. Veja tabela 2-a.

Tabela 2-a Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	Toxina B, SEQ ID NO:
2004013	SEQ ID NO: 110

Tabela 2-a Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	Toxina B, SEQ ID NO:
2004111	SEQ ID NO: 111
2004118	SEQ ID NO: 112
2004205	SEQ ID NO: 113
2004206	SEQ ID NO: 114
2005022	SEQ ID NO: 115
2005088	SEQ ID NO: 116
2005283	SEQ ID NO: 117
2005325	SEQ ID NO: 118
2005359	SEQ ID NO: 119
2006017	SEQ ID NO: 120
2006376	SEQ ID NO: 121
2007070	SEQ ID NO: 122
2007217	SEQ ID NO: 123
2007302	SEQ ID NO: 124
2007816	SEQ ID NO: 125
2007838	SEQ ID NO: 126
2007858	SEQ ID NO: 127
2007886	SEQ ID NO: 128
2008222	SEQ ID NO: 129
2009078	SEQ ID NO: 130
2009087	SEQ ID NO: 131
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

Tabela 2-a Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
Cepa de <i>C. difficile</i> ID	Toxina B, SEQ ID NO:
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

[0291] Os genes para as toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB*) são parte de um local genético 19,6-kb (local de patogenicidade, PaLoc) que inclui 3 estruturas pequenas de leitura aberta adicionais (ORFs), *tcdD*, *tcdE*, e *tcdC*, e pode ser considerado útil para virulência. O PaLoc é conhecido por ser estável e conservado nas cepas toxigênicas. Está presente no mesmo local de integração cromossômica em todas cepas toxigênicas que tem sido analisada até o momento. Nas cepas não toxigênicas, o

local de patogenicidade (PaLoc) não está presente. Portanto, uma característica das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem descritas aqui é a presença de um local de patogenicidade. Outra característica preferida das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem descritas aqui é a produção de ambos o TcdA e o TcdB.

[0292] Em uma modalidade, a cepa de *C. difficile* do tipo selvagem é uma cepa tendo um local de patogenicidade que é pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% idêntica a aquela do *C. difficile* 630 ou VPI10463. A sequência de patogenicidade total de *C. difficile* VPI10463, é registrado no banco de dados EMBL com o número de acesso X92982, também mostrado na SEQ ID NO: 26. As cepas na qual o PaLoc é idêntico a aquela cepa de referência VPI10463 são referidos como toxinotipo 0. As cepas dos toxinotipos I-VII, IX, XII-XV, e XVIII-XXIV produzem ambos o TcdA e o TcdB apesar das variações em seus genes de toxina.

[0293] No N-terminal das toxinas, o domínio de glucosiltransferase é localizado. A atividade de glucosiltransferase das toxinas é associada a função citotóxica das toxinas. Sem estar limitado pelo mecanismo ou pela teoria, acredita-se que a atividade de glucosiltransferase em ambas as toxinas catalisa a monoglucosilação das proteínas de ligação GTP pequenas na superfamília Rho/Rac/Ras. Após a glicosilação destas proteínas de ligação ao GTP, as proteínas de ligação, a fisiologia celular é modificada dramaticamente, resultando em uma perda da integridade estrutural e ruptura dos caminhos de sinalização essenciais das células hospedeiras infectadas pelas toxinas. O motivo Asp-Xaa-Asp (DXD), que é envolvido com manganês, difosfato de uridina (UDP), e ligação de glicose, é uma característica típica para o domínio de

glucosiltransferase. Sem estar limitado pelo mecanismo ou pela teoria, acredita-se que os resíduos críticos para a atividade catalítica, tais como o motivo DXD, não variam entre um TcdB a partir de uma cepa “histórica” conhecida, tal como 630, e o TcdB a partir de uma cepa hipervirulenta, tal como R20291. O motivo DXD é localizado nos resíduos de 285 a 287 do TcdA *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1, e nos resíduos de 286 a 288 de um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[0294] Os algoritmos de alinhamento globais (por exemplo, os programas de análise de sequência) são conhecidos na arte e podem ser usados para alinhar otimamente duas ou mais sequências de toxina de aminoácido para determinar se a toxina inclui um motivo de assinatura particular (por exemplo, DXD no domínio de glucosiltransferase, DHC no domínio de protease de cisteína descrito abaixo, etc.). A sequência alinhada otimamente é comparada a uma sequência de referência respectiva (por exemplo, SEQ ID NO:1 para TcdA ou SEQ ID NO: 2 para TcdB) para determinar a existência do motivo de assinatura. O “alinhamento ótimo” refere-se a um alinhamento dando a maior porcentagem de pontuação de identidade. Tal alinhamento pode ser realizado usando programas de análise de sequência conhecidos. Em uma modalidade, um alinhamento CLUSTAL (tal como o CLUSTALW) sob os parâmetros padrão é usado para identificar as toxinas do tipo selvagem compatíveis comparando a sequência de consulta contra a sequência de referência. A numeração relativa dos resíduos de aminoácidos conservados é com base na numeração de resíduo da sequência de aminoácido de referência para levar em conta as inserções ou deleções (por exemplo, cinco aminoácidos ou menos) dentro da sequência alinhada.

[0295] Como usado aqui, o termo “de acordo com a numeração

de” refere-se a numeração dos resíduos de uma sequência de referência quando uma dada sequência de aminoácido ou polinucleotídeo é comparada a uma sequência de referência. Em outras palavras, o número ou a posição de resíduo de um dado polímero é designado em relação a sequência de referência em vez da posição numérica atual do resíduo dentro da sequência de aminoácido ou polinucleotídeo.

[0296] Por exemplo, uma dada sequência de aminoácido, tal como aquela da cepa de *C. difficile* do tipo selvagem hipervirulenta, pode ser alinhada para uma sequência de referência (por exemplo, tal como aquela da cepa de *C. difficile* do tipo selvagem histórica, por exemplo, 630) introduzindo espaços, se necessário, para otimizar as combinações de resíduos entre as duas sequências. Nestes casos, embora aos espaços estejam presentes, a numeração do resíduo na sequência de polinucleotídeo ou aminoácido é feita em relação a sequência de referência a qual ela foi alinhada. Como usado aqui, uma “sequência de referência” refere-se a uma sequência definida usada como base para uma comparação de sequência.

[0297] A menos que estabelecido o contrário, todas as referências aqui para as posições dos aminoácidos de um TcdA referem-se a numeração da SEQ ID NO: 1. A menos que estabelecido o contrário, todas as referências aqui às posições de aminoácido de um TcdB referem-se a numeração da SEQ ID NO: 2.

[0298] O domínio de glucosiltransferase do TcdA, como usado aqui, pode começar no resíduo exemplar 1, 101, ou 102, e pode terminar no resíduo exemplar 542, 516, ou 293 de um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, por exemplo, a SEQ ID NO: 1. Qualquer posição de resíduo mínima pode ser combinada com uma posição de resíduo máxima entre os resíduos 1 e 542 do TcdA para definir uma sequência para o domínio de glucosiltransferase contanto que a região

de motivo DXD seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de glucosiltransferase do TcdA inclui a SEQ ID NO: 27, que é idêntica aos resíduos 101-293 da SEQ ID NO: 1, e inclui a região de motivo DXD. Em outra modalidade, o domínio de glucosiltransferase do TcdA inclui a SEQ ID NO: 28, que é idêntica aos resíduos 1-542 da SEQ ID NO: 1.

[0299] O domínio de glucosiltransferase do TcdB, como usado aqui, pode começar no resíduo exemplar 1, 101, ou 102, e pode terminar no resíduo exemplar 543, 516, ou 293 de um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, por exemplo, da SEQ ID NO: 2. Qualquer posição de resíduo mínimo pode ser combinada com uma posição de resíduo máximo entre os resíduos 1 e 543 do TcdB para definir uma sequência para o domínio de glucosiltransferase contanto que a região de motivo DXD seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de glucosiltransferase do TcdB inclui a SEQ ID NO: 29, que é idêntica aos resíduos 101-293 da SEQ ID NO: 2, e inclui a região de motivo DXD. Em outra modalidade, o domínio de glucosiltransferase do TcdB inclui a SEQ ID NO: 30, que é idêntica aos resíduos 1-543 da SEQ ID NO: 2.

[0300] Sem estar limitado pelo mecanismo ou pela teoria, acredita-se que o N-terminal do TcdA e/ou TcdB seja clivado por um processo autoproteolítico para o domínio de glucosiltransferase ser translocado e liberado no citosol da célula hospedeira, onde pode interagir com Rac/Ras/Rho GTPases. O TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem tem mostrado ser clivado entre L542 e S543. O TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem tem mostrado ser clivado entre L543 e G544.

[0301] O domínio de protease de cisteína é associado com uma atividade proteolítica autocatalítica da toxina. O domínio de protease de cisteína é localizado abaixo do domínio de glucosiltransferase e pode ser caracterizado pelo aspartato tríade catalítico, histidina e

cisteína (*DHC*), por exemplo, D589, H655, e C700 de um TcdA do tipo selvagem, e D587, H653, e C698 de um TcdB do tipo selvagem. Sem estar limitado pelo mecanismo ou pela teoria, acredita-se que a tríade catalítica é conservada entre a toxina de uma cepa “histórica”, tal 630, e o TcdB de uma cepa hipervirulenta, tal como R20291.

[0302] O domínio de protease de cisteína de TcdA, como usado aqui, pode iniciar no resíduo exemplar 543, e pode terminar no resíduo exemplar 809 769, 768, ou 767 de um TcdA do tipo selvagem, por exemplo, SEQ ID NO: 1. Qualquer posição de resíduo mínima pode ser combinada com uma posição de resíduo máxima entre 543 e 809 do TcdA do tipo selvagem para definir uma sequência para o domínio de protease de cisteína contanto que a região de motivo DHC de tríade catalítica seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de protease de cisteína do TcdA inclui a SEQ ID NO: 32, que tem a região de motivo DHC localizada nos resíduos 47, 113, e 158 da SEQ ID NO: 32, que correspondem respectivamente a D589, H655, e C700 de um TcdA do tipo selvagem de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. A SEQ ID NO: 32 é idêntica aos resíduos de 543 a 809 da SEQ ID NO: 1, TcdA.

[0303] O domínio de protease de cisteína do TcdB, como usado aqui, pode iniciar no resíduo exemplar 544, e pode terminar no resíduo exemplar 801, 767, 755, ou 700 de um TcdB do tipo selvagem, por exemplo, a SEQ ID NO: 2. Qualquer posição de resíduo mínima pode ser combinada com uma posição de resíduo máxima entre 544 e 801 de um TcdB do tipo selvagem para definir a sequência para o domínio de protease de cisteína contanto que a região de motivo DHC de tríade catalítica seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de protease de cisteína do TcdB inclui a SEQ ID NO: 33, que inclui a região de motivo DHC localizada nos resíduos 44, 110, e 115 da SEQ ID NO: 33, que correspondem respectivamente a D587, H653,

e C698 de um TcdB do tipo selvagem de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. A SEQ ID NO: 33 é idêntica aos resíduos 544 a 767 da SEQ ID NO: 2, TcdB. Em outra modalidade, o domínio de protease de cisteína do TcdB inclui os resíduos 544-801 da SEQ ID NO: 2, TcdB.

TOXINA MUTANTE

[0304] Na presente invenção, a composição imunogênica inclui uma toxina de *C. difficile* mutante. O termo “mutante,” como usado aqui, refere-se a uma molécula que exibe uma estrutura ou sequência que seja diferente da sequência ou estrutura do tipo selvagem correspondente, por exemplo, tendo ligações em cruz quando comparado a estrutura do tipo selvagem correspondente e/ou tendo pelo menos uma mutação, quando comparado a sequência do tipo selvagem correspondente quando otimamente alinhados, tal como pelo programa GAP ou BESTFIT usando os pesos de espaço padrão. O termo “mutante” como usado aqui ainda inclui uma molécula que exibe uma propriedade funcional (por exemplo, uma glucosiltransferase revogada e/ou uma atividade de protease de cisteína revogada) que difere da molécula do tipo selvagem correspondente.

[0305] Uma toxina de *C. difficile* a partir de qualquer uma das cepas de tipo selvagem descritas acima pode ser usada como uma fonte da qual uma toxina *C. difficile* mutante é produzida. Preferencialmente, *C. difficile* 630 é uma fonte da qual uma toxina *C. difficile* mutante é produzida.

[0306] A mutação pode envolver uma substituição, deleção, truncamento ou modificação dos resíduos de aminoácidos do tipo selvagem normalmente localizados naquela posição. Preferencialmente, a mutação é uma substituição de aminoácido não conservativa. A presente invenção também contempla os polinucleotídeos isolados que incluem as sequências de ácido nucléico

codificando qualquer uma das toxinas mutantes descritas aqui.

[0307] Uma substituição de aminoácido “não conservativa”, como usado aqui, refere-se a uma troca de um aminoácido de uma classe por um aminoácido de uma outra classe, de acordo com a seguinte tabela 3:

Tabela 3: Classes de Aminoácidos	
Classe	Aminoácido
Não polar:	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp (W)
polar não carregado:	Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
Acídico:	Asp (D), Glu (E)
Básico:	Lys (K), Arg (R), His (H)

[0308] Os exemplos de uma substituição de aminoácido não conservativo incluem uma substituição sendo que um resíduo de ácido aspártico (Asp, D) é substituído por um resíduo de alanina (Ala, A). Outros exemplos incluem a substituição do resíduo de ácido aspártico (Asp, D) por um resíduo de asparagina (Asn, N); substituindo um resíduo de arginina (Arg, R), ácido glutâmico (Glu, E), lisina (Lys, K), e/ou histidina (His, H) com um resíduo de alanina (Ala, A).

[0309] Uma substituição conservativa refere-se a uma troca entre aminoácidos da mesma classe, por exemplo, de acordo com a Tabela 3.

[0310] As toxinas mutantes da invenção podem ser preparadas por técnicas conhecidas na arte para preparar as mutações, tais como, por exemplo, mutagênese direcionada ao local, mutagênese usando um mutagênico (por exemplo, luz UV), etc. Preferencialmente, a mutagênese direcionada ao local é usada. Alternativamente, uma molécula de ácido nucléico tendo uma sequência objetiva pode ser diretamente sintetizada. Tais métodos de síntese química são

conhecidos na arte.

[0311] Na presente invenção, a toxina de *C. difficile* mutante inclui pelo menos uma mutação em um domínio de glucosiltransferase, relativo a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Em uma modalidade, o domínio de glucosiltransferase inclui pelo menos duas mutações. Preferencialmente, a mutação diminui ou revoga a atividade de enzima de glucosiltransferase da toxina, quando comparado a atividade de enzima de glucosiltransferase da toxina *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0312] Os resíduos de aminoácidos exemplares em um domínio de glucosiltransferase do TcdA que pode se submeter a uma mutação incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: W101, D269, R272, D285, D287, E460, R462, S541, e L542, quando comparado ao TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Os resíduos de aminoácidos exemplares que podem se submeter a uma mutação incluem E514, S517, e W519, quando comparado a um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[0313] As mutações exemplares em um domínio de glucosiltransferase do TcdA incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: W101A, D269A, R272A, D285A, D287A, E460A, R462A, S541A, e L542G, TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o domínio de glucosiltransferase do TcdA inclui uma mutação L542G, quando comparado a um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem. Em outra modalidade preferida, o domínio de glucosiltransferase do TcdA inclui uma mutação D285A e uma D287A, quando comparado a um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem.

[0314] Os resíduos de aminoácidos exemplares em um domínio de glucosiltransferase do TcdB que pode se submeter a uma mutação

incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: W102, D270, R273, D286, D288, N384, D461, K463, W520, e L543, quando comparado a uma toxina B de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. Outros resíduos de aminoácidos exemplares que podem se submeter a uma mutação incluem E515, S518, e W520, quando comparado a uma toxina B de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[0315] As mutações exemplares em um domínio de glucosiltransferase do TcdB incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: W102A, D270A, D270N, R273A, D286A, D288A, N384A, D461A, D461R, K463A, K463E, W520A, e L543A, quando comparado a um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o domínio de glucosiltransferase do TcdB inclui um L543A, quando comparado a um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Em outra modalidade preferida, o domínio de glucosiltransferase do TcdB inclui uma mutação D286A e uma mutação D288A, quando comparado a um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem.

[0316] Qualquer uma das mutações descritas aqui acima pode ser combinada com uma mutação em um domínio de protease de cisteína. Na presente invenção, uma toxina de *C. difficile* mutante inclui pelo menos uma mutação em um domínio de protease de cisteína, relativo a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, a mutação diminui ou revoga a atividade de protease de cisteína da toxina, quando comparado a uma atividade de protease de cisteína de uma toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0317] Os resíduos de aminoácidos exemplares em um domínio de protease de cisteína do TcdA que podem se submeter a uma mutação

incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: S543, D589, H655, e C700, quando comparado a um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. As mutações exemplares em um domínio de glucosiltransferase do TcdA incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: S543A, D589A, D589N, H655A, C700A, quando comparado a um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o domínio de protease de cisteína do TcdA inclui uma mutação C700A, quando comparado a um TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem.

[0318] Os resíduos de aminoácidos exemplares em um domínio de protease de cisteína do TcdB que podem se submeter a uma mutação incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: G544, D587, H653, e C698, quando comparado a um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. As mutações exemplares em um domínio de glucosiltransferase do TcdB incluem pelo menos um dos seguintes, ou qualquer combinação dos mesmos: G544A, D587A, D587N, H653A, C698A, quando comparado a um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o domínio de protease de cisteína do TcdB inclui uma mutação C698A, quando comparado a um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Os resíduos de aminoácidos adicionais em um domínio de protease de cisteína do TcdB que podem se submeter a uma mutação incluem: K600 e/ou R751, quando comparado a um TcdB do tipo selvagem. As mutações exemplares incluem K600E e/ou R751E.

[0319] Portanto, a toxina de *C. difficile* mutante inventiva inclui um domínio de glucosiltransferase tendo uma mutação e um domínio de protease de cisteína tendo uma mutação, relativa a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Em uma modalidade, a

toxina mutante inclui pelo menos uma mutação no domínio de glucosiltransferase e pelo menos uma mutação no domínio de protease de cisteína. Em uma modalidade preferida, a toxina mutante A inclui pelo menos uma mutação D285, D287, e C700. Em uma modalidade preferida, a toxina mutante B inclui pelo menos uma mutação D286, D288, e C698. As toxinas mutantes podem incluir qualquer outra, individualmente ou em combinação, descritos aqui.

[0320] Um TcdA *C. difficile* mutante exemplar inclui um domínio de glucosiltransferase incluindo a SEQ ID NO: 29 tendo uma substituição de aminoácido nas posições 285 e 287, e um domínio de protease de cisteína compreendendo a SEQ ID NO: 32 tendo uma substituição de aminoácido na posição 158, relativa a toxina *C. difficile* do tipo selvagem A correspondente. Por exemplo, tal como o TcdA *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 4, sendo que a metionina inicial não está presente opcionalmente. Em outra modalidade, a toxina de *C. difficile* mutante A inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 84.

[0321] Outros exemplos de uma toxina de *C. difficile* mutante A incluem a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 7, que tem a mutação D269A, R272A, D285A, D287A, E460A, R462A, e C700A, quando comparado com a SEQ ID NO: 1, sendo que a metionina inicial não está presente opcionalmente. Em outra modalidade, a toxina *C. difficile* mutante A inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 83.

[0322] Outro TcdA mutante exemplar inclui a SEQ ID NO: 34, sendo que o resíduo nas posições 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655, e 700 pode ser qualquer aminoácido.

[0323] Em algumas modalidades, a toxina de *C. difficile* mutante exibe um processamento autoproteolítico diminuído ou revogado quando comparado com a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem

correspondente. Por exemplo, o TcdA de *C. difficile* mutante pode incluir uma mutação em um dos seguintes resíduos, ou qualquer combinação dos mesmos: S541, L542 e/ou S543, quando comparado com o TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, o TcdA *C. difficile* mutante inclui pelo menos um dos seguintes mutations, ou qualquer combinação dos mesmos: S541A, L542G, e S543A, quando comparado com o TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0324] Outro TcdA *C. difficile* mutante exemplar inclui uma mutação S541A, L542, S543 e C700, quando comparado com o TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0325] Uma toxina de *C. difficile* mutante B exemplar inclui um domínio de glucosiltransferase compreendendo a SEQ ID NO: 31 tendo uma substituição de aminoácido nas posições 286 e 288, e um domínio de protease de cisteína compreendendo a SEQ ID NO: 33 tendo uma substituição de aminoácido na posição 155, relativa a toxina *C. difficile* do tipo selvagem B correspondente. Por exemplo, tal TcdB de *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 6, sendo que a metionina inicial não está presente opcionalmente. Em outra modalidade, a toxina *C. difficile* mutante A inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 86.

[0326] Outros exemplos de um Tcdb de *C. difficile* mutante incluem a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 8, que tem a mutação D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A, e C698A, quando comparado com a SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 8 sendo que a metionina inicial não está presente opcionalmente. Em outra modalidade, a toxina *C. difficile* mutante A inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 85.

[0327] Outro exemplo de TcdB mutante inclui a SEQ ID NO: 35,

sendo que o resíduo nas posições 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655, e 700 pode ser qualquer aminoácido.

[0328] Como outro exemplo, um Tcdb de *C. difficile* mutante pode incluir uma mutação nas posições 543 e/ou 544, quando comparado com a o TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, o Tcdb de *C. difficile* mutante inclui uma mutação L543 e/ou G544, quando comparado com o TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Mais preferencialmente, o Tcdb de *C. difficile* mutante inclui uma mutação L543G e/ou G544A, quando comparado com o TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0329] Outro exemplo de Tcdb de *C. difficile* mutante inclui uma mutação L543G, G544A e C698, quando comparado com o TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0330] Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado tendo uma mutação em qualquer posição a partir dos resíduos de aminoácidos de 1 a 1500 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2, para definir uma toxina de *C. difficile* mutante B exemplar. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui uma mutação entre os resíduos de aminoácido 830 e 990 da SEQ ID NO: 2. As posições exemplares para as mutações incluem as posições 970 e 976 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. Preferencialmente, a mutação entre os resíduos 830 e 990 é uma substituição. Em uma modalidade, a mutação é uma substituição não conservativa sendo que um resíduo de aminoácido Asp (D) e/ou a Glu (E) é substituído por um resíduo de aminoácido que não seja neutralizado após a acidificação, tal como, por exemplo, lisina (K), arginina (R), e histidina (H). As mutações exemplares incluem: E970K, E970R, E970H, E976K, E976R, E976H da SEQ ID NO: 2, para definir uma toxina de *C. difficile* mutante B.

[0331] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui as seguintes substituições D286A/D288A/C698A/E970K/E976K (SEQ ID NO: 184). O E970 e E976 são conservados na toxina B de todas as cepas de *C. difficile* observadas (veja tabela 2-a, SEQ ID NOs: 110-133), exceto nas cepas do ribotipo 078 e do ribotipo 126 (veja tabela 35 e Tabela 37). Nas toxinas B das cepas do ribotipo 078 e do ribotipo 126, há uma glicina-970 (G970) em vez de glutamato-970. Portanto, em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui uma mutação no G970 e E976, tal como, por exemplo, G970K e E976K. As toxinas mutantes descritas acima e aqui podem exibir uma citotoxicidade reduzida quando comparado com a toxina do tipo selvagem correspondente. Veja Exemplos 8 e 15).

[0332] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado tendo uma mutação em qualquer posição a partir dos resíduos de aminoácidos de 1 a 1500 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1, para definir um a toxina de *C. difficile* mutante A exemplar. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui uma mutação entre os resíduos de aminoácido 832 e 992 da SEQ ID NO: 1. As posições exemplares para as mutações incluem as posições 972 e 978 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Preferencialmente, a mutação entre os resíduos 832 e 992 é uma substituição. Em uma modalidade, a mutação é uma substituição não conservativa sendo que um resíduo de aminoácido Asp (D) e/ou a Glu (E) é substituído por um resíduo de aminoácido que não seja neutralizado após a acidificação, tal como, por exemplo, lisina (K), arginina (R), e histidina (H). As mutações exemplares incluem: D972K, D972R, D972H, D978K, D978R, D978H da SEQ ID NO: 1, para definir uma toxina de *C. difficile* mutante A.

[0333] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui as seguintes substituições D285A/D287A/C700A/D972K/D978K (SEQ ID

NO: 183). Os resíduos D972 e D978 são conservados em uma toxina A a partir de todas as cepas de *C. difficile* avaliadas (veja tabela 1-a, SEQ ID NOs: 87-109). As toxinas mutantes descritas acima e aqui podem exibir uma citotoxicidade reduzida quando comparado com a toxina do tipo selvagem correspondente.

[0334] O seguinte descreve toxinas mutantes exemplares adicionais. Em uma modalidade, a toxina mutante TcdA inclui (i) a SEQ ID NO: 185; (ii) um polipeptídio da SEQ ID NO:185 tendo pelo menos 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO:185; ou (iii) um fragmento de pelo menos 250, 280 ou 300 aminoácidos da SEQ ID NO:185. Em outra modalidade, a toxina mutante TcdB inclui (iv) a SEQ ID NO:186; (v) um polipeptídio da SEQ ID NO:186 tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO:186; ou (vi) um fragmento de pelo menos 250, 280 ou 300 aminoácidos da SEQ ID NO:186.

[0335] Em uma modalidade, a toxina mutante TcdA consiste de menos do que 600, 675, 650, 625, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, ou 225 aminoácidos. Em uma modalidade, a toxina mutante consiste de menos do que 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625, 600, 575, 550, ou 525 aminoácidos. Em uma modalidade, a toxina mutante inclui pelo menos 200, 225, 250, 270, 280, 300 ou 310 aminoácidos da SEQ ID NO:185 ou pelo menos 200, 225, 250, 270, 280, 300 ou 310 aminoácidos de um polipeptídio tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99%, ou 100% de identidade com a SEQ ID NO:185. Em uma modalidade a toxina mutante inclui pelo menos 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 ou 610 aminoácidos da SEQ ID NO: 186 ou pelo menos 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 ou 610 aminoácidos de um polipeptídio tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99%, ou 100% de

identidade com a SEQ ID NO:186.

[0336] Em uma modalidade, a toxina mutante inclui uma proteína de fusão que inclui A) (i) SEQ ID NO:185 ; (ii) um polipeptídeo da SEQ ID NO:185 tendo pelo menos 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO:185; ou (iii) um fragmento de pelo menos 250, 280 ou 300 aminoácidos da SEQ ID NO:185 fundido a B) (iv) SEQ ID NO:186;(v) um polipeptídeo da SEQ ID NO:186 tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 95%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO:186; ou (vi) um fragmento de pelo menos 250, 280 ou 300 aminoácidos da SEQ ID NO:186. Em uma outra modalidade o N-terminal da SEQ ID NO: 185 é adjacente ao C-terminal da SEQ ID NO: 186. Em uma outra modalidade o N-terminal da SEQ ID NO: 185 é adjacente ao N-terminal da SEQ ID NO: 186. Em uma outra modalidade o C-terminal da SEQ ID NO:185 é adjacente ao C-terminal da SEQ ID NO:186. Outros exemplos de uma toxina mutante incluem um polipeptídeo tendo qualquer uma das seguintes sequências 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, e SEQ ID NO: 195.

[0337] Em outra modalidade, a toxina mutante inclui um polipeptídeo híbrido e/ou fusão que inclui qualquer combinação das sequências de aminoácidos selecionadas a partir de qualquer um dos seguintes: 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, e SEQ ID NO: 243. Por exemplo, em uma modalidade, a toxina mutante inclui uma sequência de aminoácido como estabelecida em qualquer um dos seguintes: SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 270,

SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 274, ou SEQ ID NO: 275.

[0338] Outro exemplo de uma toxina mutante inclui um fragmento de uma toxina do tipo selvagem. Um “fragmento” da toxina mutante TcdA como usado aqui refere-se a uma sequência de peptídeo que tenha menos aminoácidos consecutivos totais do que a sequência de toxina TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente, por exemplo, uma sequência que inclua menos do que 2710 aminoácidos consecutivos totais. O fragmento da toxina mutante TcdA pode ainda incluir uma mutação de um resíduo de aminoácido como descrito aqui. Um “fragmento” de uma toxina mutante TcdB como usado aqui refere-se a uma sequência de peptídeo que tenha menos aminoácidos consecutivos totais do que a sequência de toxina TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente, por exemplo, uma sequência que inclua menos do que 2366 aminoácidos totais consecutivos. O fragmento da toxina mutante TcdB pode ainda incluir uma mutação de um resíduo de aminoácido como descrito aqui. Tais sequências de toxina mutante exemplares incluem SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33. Em uma modalidade, a toxina mutante TcdA inclui pelo menos 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, ou 2000 aminoácidos consecutivos de uma toxina mutante A do tipo selvagem, como descrito aqui, por exemplo, na SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade, a toxina mutante inclui um fragmento de uma toxina A mutada geneticamente descrita aqui. Em uma modalidade, a toxina mutante TcdB inclui pelo menos 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, ou 2000 aminoácidos consecutivos de uma toxina mutante B do tipo selvagem, como descrito aqui, por exemplo, na SEQ

ID NO: 2. Em outra modalidade, a toxina mutante inclui um fragmento de uma toxina B mutada geneticamente descrita aqui. Em uma modalidade, a toxina mutante inclui no máximo 3000, 2710, 2500, 2400, 2366, 2000, 1900, 1800, 1700, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, ou 300 aminoácidos consecutivos. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor mínimo para definir uma taxa compatível. Em outra modalidade, a toxina mutante é fundida em pelo menos um outro peptídeo ou pelo menos uma outra toxina mutante de uma maneira que resulte na produção de uma molécula híbrida.

[0339] O fragmento exemplar adicional da toxina mutante TcdA inclui um polipeptídeo tendo qualquer uma das sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 374 até a SEQ ID NO: 421. Outro fragmento exemplar de uma toxina mutante TcdA inclui um polipeptídeo tendo qualquer uma das sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 472 até a SEQ ID NO: 519. Os exemplos adicionais da toxina mutante TcdB incluem um polipeptídeo tendo qualquer uma das sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 422 até a SEQ ID NO: 471. Outro exemplo de fragmento de toxina mutante TcdB inclui um polipeptídeo tendo qualquer uma das sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 568 até a SEQ ID NO: 615.

[0340] O seguinte descreve outro exemplo de toxinas mutantes. Em uma modalidade, a toxina mutante inclui um TcdA que inclui ou consiste de pelo menos 3, pelo menos 4, ou pelo menos 5 mutações de resíduos de aminoácidos selecionadas a partir de um grupo consistindo de: W101, D287, E514, D285, S517, W519, e C700, por exemplo, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Nas modalidades adicionais; os mutantes de TcdA incluem ou consistem de pelo menos 3, pelo menos 4, ou pelo menos 5 mutações selecionadas a partir de um grupo consistindo de: substituições

W101A, D287A, E514Q, D285A, S517A, W519A, e C700A substituições e uma deleção W101.

[0341] Outro exemplo de toxina mutante TcdA inclui as substituições de aminoácidos W101, D287A, e E514Q, por exemplo, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Uma outra modalidade proporciona uma proteína de TcdA incluindo ou consistindo de substituições de aminoácido W101A, D287A, E514Q, e W519A. outra modalidade específica da invenção é uma proteína TcdA incluindo ou consistindo de substituições de aminoácido W101A, D287A, E514Q, W519A, e C700A.

[0342] Em outra modalidade, a toxina mutante TcdA inclui as mutações W101A, D287A, E514Q e D285A, por exemplo, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade, a toxina mutante TcdA inclui as mutações W101A, D287A, E514Q e S517A.

[0343] Em outra modalidade, uma outra mutação pode ser adicionada a um TcdA mutante, por exemplo, uma mutação C700A. em modalidades adicionais, até 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 outras mutações podem ser adicionadas a qualquer toxina mutante TcdA das modalidades descritas aqui.

[0344] Outros exemplos de uma toxina mutante TcdA incluem a sequência de aminoácido como estabelecida na 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, ou SEQ ID NO: 211. Em outra modalidade, a toxina mutante TcdA inclui a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 210. Ainda em outra modalidade, a toxina mutante TcdA inclui uma mutação nas posições W101, D287, E514, W519 e C700; sendo que W101 é substituído com qualquer aminoácido exceto triptofano, D287 é substituído com um aminoácido, mas ácido aspártico, E514 é substituído com qualquer aminoácido, mas ácido glutâmico, W519 é substituído com qualquer aminoácido, mas

triptofano e C700 é substituído com qualquer aminoácido, mas cisteína, como estabelecido na SEQ ID NO: 212.

[0345] Os exemplos adicionais de uma toxina mutante TcdA incluem um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou em pelo menos 99% idêntica a sequência de referência original (por exemplo, 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 ou SEQ ID NO: 212 ou SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 ou SEQ ID NO: 86).

[0346] Em uma outra modalidade, a toxina mutante TcdA inclui mutações em mais do que 12 resíduos de aminoácidos, em mais do que 11 resíduos de aminoácidos, em mais do que 10 resíduos de aminoácidos, em mais do que 9 resíduos de aminoácidos, em mais do que 8 resíduos de aminoácidos, em mais do que 7 resíduos de aminoácidos, em mais do que 6 resíduos de aminoácidos, em mais do que 5 resíduos de aminoácidos, em mais do que 4 resíduos de aminoácidos, em mais do que 3 resíduos de aminoácidos, em mais do que 2 resíduos de aminoácidos, ou 1 resíduo de aminoácidos, por exemplo, relativo a 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 e SEQ ID NO: 212 ou SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85 ou SEQ ID NO: 86.

[0347] O seguinte descreve outras toxinas mutantes exemplares. Em uma modalidade, a toxina mutante é um TcdB mutante que inclui pelo menos 3, pelo menos 4, ou pelo menos 5 mutações nos resíduos de aminoácidos selecionadas a partir de um grupo consistindo de: W102, D288, E515, D286, S518, W520, e C698, de acordo com a

numeração da SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, a toxina mutante TcdB inclui pelo menos 3, pelo menos 4, ou pelo menos 5 mutações selecionadas a partir de um grupo consistindo de: substituições de W102A, D288A, E515Q, D286A, S518A, W520A, e C698A e uma deleção de W102. Em uma modalidade, a toxina mutante TcdB inclui a sequência de aminoácido estabelecido na 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, ou SEQ ID NO: 221. Ainda em outra modalidade, a toxina mutante TcdB inclui uma mutação nas posições W102, D288, E515, W520 e C698; sendo que W102 é substituído por qualquer aminoácido exceto triptofano, o D288 é substituído por qualquer aminoácido, mas ácido aspártico, o E515 é substituído por qualquer aminoácido, mas ácido glutâmico, o W520 é substituído por qualquer aminoácido, mas triptofano e o C698 é substituído por qualquer aminoácido, mas cisteína, como estabelecido na SEQ ID NO: 222.

[0348] Os exemplos adicionais de uma toxina mutante TcdB incluem um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% idêntica a sequência original de referência da 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, ou SEQ ID NO: 222.

[0349] Em uma outra modalidade, a toxina mutante TcdB inclui mutações em mais do que 12 resíduos de aminoácidos, em mais do que 11 resíduos de aminoácidos, em mais do que 10 resíduos de aminoácidos, em mais do que 9 resíduos de aminoácidos, em mais do que 8 resíduos de aminoácidos, em mais do que 7 resíduos de aminoácidos, em mais do que 6 resíduos de aminoácidos, em mais do que 5 resíduos de aminoácidos, em mais do que 4 resíduos de

aminoácidos, em mais do que 3 resíduos de aminoácidos, em mais do que 2 resíduos de aminoácidos, ou 1 resíduo de aminoácido, por exemplo, relativo a 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, e/ou SEQ ID NO: 222.

[0350] Um exemplo adicional de toxina mutante TcdA inclui um polipeptídio tendo qualquer uma das sequências de aminoácidos da SEQ ID NO: 276 até a SEQ ID NO: 323. O exemplo adicional de uma toxina mutante TcdB inclui um polipeptídio tendo qualquer uma das sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 324 até a SEQ ID NO: 373.

[0351] O seguinte descreve outro exemplo de toxinas mutantes. Em uma modalidade, a toxina mutante TcdA inclui uma sequência de aminoácido: (a) tendo 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, ou 100%) para a SEQ ID NO: 224 ou SEQ ID NO: 245; e/ou b) que é um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos da SEQ ID NO: 224 ou SEQ ID NO: 245, sendo que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 250, 300, 400, 500, 540, ou mais).ou de um polipeptídio tendo 80% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 224 ou a SEQ ID NO: 245 e que compreende um epítipo da SEQ ID NO: 224 e/ou SEQ ID NO: 245.

[0352] Em uma modalidade, a toxina mutante TcdA inclui a sequência de aminoácido estabelecida na 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, ou SEQ ID NO: 236. As modalidades exemplares adicionais de uma toxina mutante TcdA inclui a sequência de aminoácido estabelecida em qualquer um dos seguintes: 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, e/ou SEQ ID NO: 263.

[0353] Em uma modalidade, a toxina mutante TcdB inclui uma sequência de aminoácido (a) tendo 80% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 238 ou SEQ ID NO: 247; e/ou b) que é um fragmento de pelo menos 7 aminoácidos consecutivos da SEQ ID NO: 238 ou SEQ ID NO: 247, ou de um polipeptídeo tendo 80% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 238 ou SEQ ID NO: 247 e que compreende um epítipo da SEQ ID NO: 238 ou SEQ ID NO: 247.

[0354] Em uma modalidade, a toxina mutante TcdB inclui uma sequência de aminoácido: (a) tendo 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, ou mais) par a SEQ ID NO: 238 ou SEQ ID NO: 247; e/ou (b) que é um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos da SEQ ID NO: 238 ou SEQ ID NO: 247, ou de um polipeptídeo tendo 50% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 238 ou SEQ ID NO: 247, sendo que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 250, 300, 400, 500, 540, ou mais).

[0355] Em uma modalidade, a toxina mutante TcdB inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, ou SEQ ID NO: 243. As modalidades de exemplos adicionais de uma toxina mutante TcdB inclui a sequência de aminoácido estabelecida em qualquer uma das seguintes: 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, e/ou SEQ ID NO: 269.

[0356] Um exemplo adicional da toxina mutante TcdA inclui um polipeptídio tendo qualquer uma das sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 520 até a SEQ ID NO: 567. Os exemplos adicionais de uma toxina mutante TcdB incluem um polipeptídio tendo qualquer uma das sequências de aminoácido da SEQ ID NO: 616 até a SEQ ID NO: 663.

[0357] O seguinte descreve ainda exemplos adicionais das toxinas mutantes. Em uma modalidade, a toxina mutante TcdA inclui um polipeptídio tendo qualquer uma das sequências de aminoácidos da SEQ ID NO: 664 até a SEQ ID NO: 711. Os exemplos adicionais de uma toxina mutante TcdB incluem um polipeptídio tendo qualquer uma das sequências de aminoácidos da SEQ ID NO: 712 até a SEQ ID NO: 761.

[0358] Os polipeptídios da invenção podem incluir um resíduo de metionina inicial, em alguns casos como um resultado de um processo mediado por célula hospedeira. Dependendo, por exemplo, da célula hospedeira usada em um procedimento de produção recombinante e/ou a fermentação ou condições de crescimento da célula hospedeira, é conhecido na arte que a metionina de N-terminal codificada pelo códon de iniciação de tradução pode ser removida de um polipeptídio após a tradução em células ou a metionina de N-terminal pode permanecer presente em um polipeptídio isolado.

[0359] Portanto, em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio isolado incluindo a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 4, sendo que a metionina inicial (na posição 1) não está presente opcionalmente. Em uma modalidade, a metionina inicial da SEQ ID NO: 4 está ausente. Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio isolado incluindo a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 84, que é idêntico a SEQ ID NO: 4, mas para uma ausência da metionina inicial.

[0360] Em outro aspecto, o polipeptídio isolado inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 6, sendo que a metionina inicial (na posição 1) não está presente opcionalmente. Em uma modalidade, a metionina inicial da SEQ ID NO: 6 está ausente. Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio isolado incluindo a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 86, que é idêntico a SEQ ID NO: 6, mas para uma ausência de uma metionina inicial.

[0361] Em um outro aspecto, o polipeptídio isolado inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 7, sendo que a metionina inicial (na posição 1) não está presente opcionalmente. Em uma modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídio isolado incluindo a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 83, que é idêntico a SEQ ID NO: 7, mas para uma ausência de uma metionina inicial. Ainda em outro aspecto, o polipeptídio isolado inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 8, sendo que a metionina inicial (na posição 1) não está presente opcionalmente. Em uma modalidade, o polipeptídio isolado inclui a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 85, que é idêntico a SEQ ID NO: 8, mas para uma ausência de uma metionina inicial.

[0362] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 4, sendo que a metionina inicial (na posição 1) não está presente opcionalmente. Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 6, sendo que a metionina inicial (na posição 1) não está presente opcionalmente. Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 7, sendo que a metionina inicial (na posição 1) não está presente opcionalmente. Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 8, sendo que a metionina inicial

(na posição 1) não está presente opcionalmente.

[0363] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 83. Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 84. Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 85. Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 86.

CITOTOXIDADE

[0364] Além de gerar uma resposta imune em um mamífero, as composições imunogênicas descritas aqui também têm reduzido a citotoxicidade comparado a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, as composições imunogênicas são seguras e tem uma citotoxicidade de mínima a nenhuma (por exemplo, cerca de 6-8 log₁₀ de redução), relativo a citotoxicidade de uma toxina do tipo selvagem respectiva, para administração em mamíferos.

[0365] Como usado aqui, o termo citotoxicidade é um termo entendido na arte e refere-se a uma morte de célula apoptótica e/ou um estado em que uma ou mais funções biológicas ou bioquímicas usuais de uma célula são aberrantemente comprometidas, quando comparado a uma célula idêntica sob condições idênticas, mas na ausência do agente citotóxico. A toxicidade pode ser quantificada, por exemplo, em células ou em mamíferos uma vez que a quantidade de um agente necessária para induzir 50% de morte celular (isto é, EC₅₀ ou ED₅₀, respectivamente) ou por outros métodos conhecidos na arte.

[0366] Os ensaios para indicar a citotoxicidade são conhecidos na arte, tais como os ensaios de arredondamento celular (veja, por exemplo, Kuehne et al. Nature. 7 de Outubro de 2010; 467(7316):711-3). A ação do TcdA e do TcdB faz com que as células arredondem (por exemplo, perde morfologia) e morram, e tal fenômeno é visível pela luz

do microscópio. Veja, por exemplo, a Figura 9.

[0367] Os ensaios de citotoxicidade exemplares adicionais conhecidos na arte incluem ensaios de glicosilação relativos a imagiologia com fósforo de Ras marcado com [¹⁴C] ensaios de glicose (como descrito em Busch et al., J Biol Chem. 31 de julho de 1998; 273(31):19566-72), e preferencialmente o ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Exemplos abaixo sendo que EC₅₀ pode se referir a uma concentração de uma composição imunogênica composição imunogênica que exibe pelo menos cerca de 50% de efeito citopatogênico (CPE) em uma célula, preferencialmente uma célula de fibroblasto diploide humano (por exemplo, uma célula IMR90 (ATCC CCL-186TM), quando comparada a uma célula idêntica sob condições idênticas na ausência da toxina. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* também pode ser usado para avaliar a concentração de uma composição que iniba pelo menos cerca de 50% de um efeito citopatogênico induzido por toxina de *C. difficile* do tipo selvagem (CPE) em uma célula, preferencialmente uma célula de fibroblasto diplóide humana (por exemplo, uma célula IMR90 (ATCC CCL-186TM), quando comparado a uma célula idêntica sob condições idênticas na ausência da toxina. Os ensaios de citotoxicidade exemplares adicionais incluem aqueles descritos em Doern et al., J Clin Microbiol. Agosto 1992; 30(8):2042-6. A citotoxicidade também pode ser determinada medindo os níveis de ATP nas células tratadas com toxina. Por exemplo, um substrato com base em luciferase tais como CELLTÍTULOGLO® (Promega) pode ser usado, que emite uma luminescência medida como uma unidade de luz relativa (RLU). Em tal ensaio, a viabilidade da célula pode ser direcionada proporcional a quantidade de ATP nas células ou nos valores de RLU.

[0368] Em uma modalidade, a citotoxicidade da composição imunogênica é reduzida por pelo menos cerca de 1000, 2000, 3000,

4000, 5000-, 6000-, 7000-, 8000-, 9000-, 10000-, 11000-, 12000-, 13000-dobras, 14000-dobras, 15000-dobras, ou mais, quando comparado a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Veja, por exemplo, Tabela 20.

[0369] Em uma outra modalidade, a citotoxicidade da composição imunogênica é reduzida por pelo menos cerca de 2-log₁₀, mais preferencialmente por cerca de 3-log₁₀, e mais preferencialmente por cerca de 4-log₁₀ ou mais, relativo a toxina do tipo selvagem correspondente sob condições idênticas. Por exemplo, um TcdB de *C. difficile* mutante pode ter um valor EC₅₀ de cerca de 10⁻⁹ g/ml como medido em um ensaio de efeito citopático padrão (CPE), quando comparado a um TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem exemplar que pode ter um valor EC₅₀ de pelo menos cerca de 10⁻¹² g/ml. Veja, por exemplo, Tabelas 7A, 7B, 8A e 8B nos exemplos da seção abaixo.

[0370] Ainda em outra modalidade, a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante tem um EC₅₀ de pelo menos cerca de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml ou maior, como medido por, por exemplo, um ensaio de citotoxicidade in vitro, tais como um descrito aqui. Portanto, em uma modalidade preferida, as composições imunogênicas e as toxinas mutantes são biologicamente seguras para a administração a mamíferos.

[0371] Sem estar limitado pelo mecanismo ou teoria, um TcdA tendo uma mutação D285 e D287, quando comparado ao TcdA do tipo selvagem, e um TcdB tendo uma mutação D286 e uma D288, quando comparado ao TcdB do tipo selvagem, esperava-se que fossem defeituosos na atividade de glicosiltransferase e, portanto, defeituosos na indução de um efeito citopático. Além disso, uma toxina tendo uma mutação no motive DHC foi esperada como sendo defeituosa no processamento autocatalítico, e, portanto, estar sem qualquer efeito

citotóxico.

[0372] Entretanto, os inventores surpreendentemente descobriram, entre outras coisas, que o TcdA mutante exemplar tendo a SEQ ID NO: 4 e o TcdB mutante exemplar tendo a SEQ ID NO: 6 exibiram inesperadamente uma citotoxicidade (embora reduzido significativamente das toxinas de *C. difficile* 630 do tipo selvagem) em vez de exibir uma atividade de glucosiltransferase disfuncional e uma atividade de protease de cisteína disfuncional. Sem estar limitado pelo mecanismo ou teoria, acredita-se que as toxinas mutantes afetem a citotoxicidade através de um novo mecanismo. Apesar disso, o TcdA mutante exemplar tendo a SEQ ID NO: 4 e o TcdB mutante exemplar tendo a SEQ ID NO: 6 foram surpreendentemente imunogênicos. Veja os exemplos abaixo.

LIGAÇÃO EM CRUZ

[0373] Embora as ligações cruz químicas de uma toxina do tipo selvagem tenham um potencial de falhar na inatividade da toxina, os inventores ainda descobriram que a ligação cruzada quimicamente de pelo menos um aminoácido de uma toxina mutante ainda reduz a citotoxicidade de uma toxina mutante, relativo a uma toxina mutante com carência de ligações em cruz químicas, e relativo a toxina do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, a toxina mutante é purificada antes do contato com o agente de ligação em cruz química.

[0374] Além disso, em vez de um potencial dos agentes de ligação em cruz química para alterar os epítomos úteis, os inventores surpreendentemente descobriram que a toxina de *C. difficile* mutante modificada geneticamente tendo pelo menos um aminoácido quimicamente ligado em cruz resultou em composições imunogênicas que provocaram anticorpos de neutralização múltiplos ou fragmentos de ligação do mesmo. Portanto, os epítomos associados com as moléculas de anticorpos de neutralização associados a epítomos foram

inesperadamente retidas seguindo a ligação em cruz química.

[0375] A ligação em cruz (também referida como uma “inativação química” ou “inativação” aqui) é um processo de juntar quimicamente duas ou mais moléculas por uma ligação covalente. Os termos “reagentes de ligação em cruz,” “agentes de ligação em cruz,” e “ligadores em cruz” referem-se a moléculas que são capazes de reagir com e/ou anexar quimicamente a grupos funcionais (aminas primárias, sulfidrilos, carboxils, carbonils, etc) nos peptídeos, polipeptídios, e/ou proteínas. Em uma modalidade, a molécula pode conter dois ou mais finais reativos que são capazes de reagir com e/ou quimicamente anexar a grupos funcionais específicos (aminas primárias, sulfidrilos, carboxils, carbonils, etc) nos peptídeos, nos polipeptídeos e/ou proteínas. Preferencialmente, o agente de ligação em cruz química é solúvel em água. Em outra modalidade preferida, o agente de ligação em cruz química é um ligador em cruz heterobifuncional. Em uma outra modalidade, o agente de ligação em cruz química não é um ligador em cruz bifuncional. Os agentes de ligação em cruz químicos são conhecidos na arte.

[0376] Em uma modalidade preferida, o agente de ligação em cruz é um agente de ligação em cruz de comprimento zero. Um ligador em cruz de “comprimento zero” refere-se a um agente de ligação em cruz que mediará ou produzirá uma ligação em cruz direta entre os grupos funcionais de duas moléculas. Por exemplo, na ligação cruzada de dois polipeptídios, um ligador em cruz de comprimento zero resultará na formação de uma ponte, ou uma ligação em cruz entre um grupo carboxil a partir de uma cadeia de lado de aminoácido de um polipeptídio, e um grupo amino de outro polipeptídio, sem integrar a questão extrínseca. Os agentes de ligação em cruz de comprimento zero podem catalisar, por exemplo, a formação de ligações de esteres entre as metades hidroxil e carboxil, e/ou a formação de ligações de

amida entre as metades carboxil e amino primárias.

[0377] Os agentes de ligação em cruz químicos compatíveis exemplares incluem formaldeído; formalinaa; acetaldeído; propionaldeído; carbodiimidas solúveis em água ($RN=C=NR'$), que incluem 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-Carbodiimida (EDC), 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-Carbodiimida cloridrato, 1-Ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida meto-p-toluenosulfonato (CMC), N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC), e N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), e derivados dos memsos; e N-hidroxisuccinimida (NHS); fenilglioxal; e/ou UDP-dialdeído.

[0378] Preferencialmente, o agente de ligação em cruz é EDC. Quando um polipeptídio de toxina de *C. difficile* mutante é quimicamente modificado por um EDC (por exemplo, contatando o polipeptídio com EDC), em uma modalidade, o polipeptídio inclui (a) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui (b) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico de um polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui (c) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do polipeptídio e o grupo amino do N-terminal do polipeptídio. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui (d) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui (e) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídio isolado. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui (f) pelo menos uma ligação em cruz entre uma

cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídio isolado. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui (g) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do polipeptídio e o grupo amino do N-terminal de um segundo polipeptídio isolado. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui (h) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídio isolado. Veja, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[0379] O “Segundo polipeptídio isolado” refere-se a qualquer polipeptídio isolado que esteja presente durante a reação com EDC. Em uma modalidade, o segundo polipeptídio isolado é um polipeptídio de toxina de *C. difficile* mutante tendo uma sequência idêntica a do primeiro polipeptídio isolado. Em uma outra modalidade, o segundo polipeptídio isolado é um polipeptídio de toxina de *C. difficile* mutante tendo uma sequência diferente do primeiro polipeptídio isolado.

[0380] Em uma modalidade, o polipeptídio inclui pelo menos duas modificações selecionadas a partir das modificações (a)-(d). Em uma modalidade exemplar, o polipeptídio inclui (a) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio e (b) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio. Em uma outra modalidade, o polipeptídio inclui pelo menos três modificações selecionadas a partir das modificações (a)-(d). Ainda em uma outra modalidade, o polipeptídio inclui as modificações (a), (b), (c), e (d).

[0381] Quando mais de um polipeptídio mutante está presente durante a modificação química por EDC, em uma modalidade, a composição resultante inclui pelo menos uma de qualquer das

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

[0382] Em uma modalidade exemplar, a composição resultante inclui (a) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio; e (b) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio. Em uma modalidade, a composição ainda inclui (c) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do polipeptídio e o grupo amino do N-terminal do polipeptídio; e (d) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio.

[0383] Em outra modalidade exemplar, a composição resultante inclui (e) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídio isolado; (f) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídio isolado; (g) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do polipeptídio e o grupo amino do N-terminal de um segundo polipeptídio isolado; e (h) pelo menos uma ligação em cruz entre o grupo carboxil no C-terminal do

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

[0384] Em uma outra modalidade exemplar, a composição resultante inclui (a) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio; (b) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio; (c) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídio isolado; d (f) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídio isolado.

[0385] Em uma modalidade preferida, o agente de ligação em cruz química inclui formaldeído, mais preferencialmente, um agente incluindo formaldeído na ausência de lisina. Glicina ou outro composto apropriado com uma amina primária pode ser usado como o inibidor nas reações com ligação em cruz. Portanto, em outra modalidade preferida, o agente químico inclui formaldeído e o uso de glicina.

[0386] Ainda em outra modalidade preferida, o agente de ligação em cruz química inclui EDC e NHS. Como é conhecido na arte, o NHS pode ser incluído nos protocolos de acoplamento EDC. Entretanto, os inventores surpreendentemente descobriram que o NHS pode facilitar em uma outra diminuição da citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante, quando comparado a toxina do tipo selvagem correspondente, quando comparado a toxina mutada geneticamente, e quando comparado a toxina tutada geneticamente que foi ligada em cruz quimicamente por um EDC. Veja, por exemplo, Exemplo 22. Portanto, sem estar limitado pelo mecanismo ou teoria, um polipeptídio

de toxina mutante tendo uma metade de beta-alanina ligada a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídio (por exemplo, resultando de uma reação do polipeptídio da toxina mutante, EDC, e NHS) pode facilitar em uma outra diminuição de citotoxicidade da toxina mutante, quando comparado a, por exemplo, uma toxina *C. difficile* (do tipo selvagem ou mutante) sendo que uma metade de beta-alanina está ausente.

[0387] O uso de EDC e/ou NHS também pode incluir o uso de glicina ou outro composto apropriado com uma amina primária como o inibidor. Qualquer composto tendo uma amina primária pode ser usado como um inibidor, tais como, por exemplo, metil éster glicina e alanina. Em uma modalidade preferida, o composto inibidor é uma amina primária hidrofílica não polimérica. Os exemplos de uma amina primária hidrofílica não polimérica incluem, por exemplo, aminoaçúcares, amino alcools, e amino poliois. Os exemplos específicos de uma amina primária hidrofílica não polimérica incluem glicina, etanolamina, glucamina, amina funcionalizada polietileno glicol, e oligômeros de amina funcionalizada etileno glicol.

[0388] Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio de toxina de *C. difficile* mutante tendo um pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC e uma amina primária hidrofílica não polimérica, preferencialmente glicina. Os adutos de glicina resultantes (por exemplo, a partir da reação de toxinas mutantes triplas tratadas com EDC, NHS, e inibidas com glicina) pode facilitar na diminuição da citotoxicidade da toxina mutante quando comparado a toxina do tipo selvagem correspondente.

[0389] Em uma modalidade, quando um polipeptídio de toxina de *C. difficile* mutante é quimicamente modificado por EDC e glicina, o polipeptídio inclui pelo menos uma modificação quando o polipeptídio é modificado por EDC (por exemplo, pelo menos uma de qualquer das

modificações (a)-(h) descritas acima), e pelo menos uma das seguintes modificações exemplares: (i) uma metade de glicina ligada a um grupo carboxil em um C-terminal do polipeptídio; (j) uma metade de glicina ligada a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio; e (k) uma metade de glicina ligada a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio. Veja, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[0390] Em uma modalidade, pelo menos um aminoácido do TcdA de *C. difficile* mutante é ligado em cruz quimicamente e/ou pelo menos um aminoácido do TcdB de *C. difficile* mutante é ligado em cruz quimicamente. Qualquer uma das toxinas mutantes descritas aqui podem ser ligadas em cruz quimicamente. Em uma outra modalidade, pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, e/ou SEQ ID NO: 8 é ligada em cruz quimicamente. Em uma modalidade, pelo menos um resíduo de aminoácido de um polipeptídio tendo uma sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 até a SEQ ID NO: 761 é ligada em cruz. Em uma outra modalidade, pelo menos um resíduo de aminoácido de um polipeptídio tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 183 até a SEQ ID NO: 761 inclui uma modificação como descrito acima, por exemplo, qualquer uma das modificações (a)-(k), tais como (a) pelo menos uma ligação em cruz entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídio e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídio.

[0391] Por exemplo, pelo menos um aminoácido pode ser ligado em cruz quimicamente por um agente que inclui uma carbodiimida, tais como EDC. As carbodiimidas podem formar uma ligação covalente entre o carboxyl livre (por exemplo, a partir das cadeias laterais de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico) e grupos (por exemplo, na cadeia lateral dos resíduos de lisina) para formar ligações de amida

estáveis.

[0392] Como outro exemplo, pelo menos um aminoácido pode ser ligado em cruz quimicamente por um agente que inclui NHS. Os ligadores em cruz ativados por éster NHS podem reagir com as aminas primárias (por exemplo, no N-terminal de uma cadeia de polipeptídeo e/ou na cadeia lateral dos resíduos de lisina) para render uma ligação de amida.

[0393] Em uma outra modalidade, pelo menos um aminoácido pode ser ligado em cruz quimicamente por um agente que inclui EDC e NHS. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado tendo a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 4, sendo que o resíduo de metionina na posição 1 não está presente opcionalmente, sendo que o polipeptídeo inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC e NHS. Em uma outra modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado tendo a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 6, sendo que o resíduo de metionina na posição 1 não está presente opcionalmente, sendo que o polipeptídeo inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC e NHS. Ainda em outra modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado tendo a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 8. O polipeptídeo é modificado contatando o polipeptídeo com EDC e NHS. Veja, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[0394] Quando um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante é modificado quimicamente por (por exemplo, contatando) EDC e NHS, em uma modalidade, o polipeptídeo inclui pelo menos uma modificação quando o polipeptídeo é modificado por EDC (por exemplo, pelo menos uma de qualquer das modificações (a)-(h) descritas acima), e (I) uma

metade de beta-alanina ligada a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídio.

[0395] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio de toxina de *C. difficile* mutante sendo que o polipeptídio inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC, NHS, e uma amina primária hidrofílica não polimérica, preferencialmente glicina. Em uma modalidade, o polipeptídio inclui pelo menos uma modificação quando o polipeptídio é modificado por EDC (por exemplo, pelo menos uma de qualquer das modificações (a)-(h) descritas acima), pelo menos uma modificação quando o polipeptídio é modificado por glicina (por exemplo, pelo menos uma de qualquer das modificações (i)-(k) descritas acima), e (l) uma metade de beta-alanina ligada a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídio. Veja, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[0396] Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídio de toxina de *C. difficile* mutante, sendo que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídio é ligada a uma metade de beta-alanina. Em uma modalidade, uma cadeia lateral do segundo resíduo de lisina do polipeptídio é ligada a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico e/ou a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico. O “segundo” resíduo de lisina do polipeptídio inclui um resíduo de lisina do polipeptídio que não é ligado a uma metade de beta-alanina. A cadeia lateral de um ácido aspártico e/ou uma cadeia lateral de um ácido glutâmico ao qual o segundo resíduo de lisina é ligado pode ser aquela do polipeptídio para formar uma ligação em cruz intramolecular, ou aquela de um segundo polipeptídio para formar uma ligação intermolecular. Em uma outra modalidade, uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido aspártico e/ou uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídio é ligado a uma metade de glicina. O resíduo de ácido

aspártico e/ou o resíduo de ácido glutâmico que é ligado a uma metade glicina não é também ligada a um resíduo de lisina.

[0397] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma toxina de *C. difficile* mutante sendo que pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido de uma toxina *C. difficile* do tipo selvagem é quimicamente modificada. Em uma modalidade, pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido da toxina de *C. difficile* do tipo selvagem A e/ou pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido de uma toxina de *C. difficile* do tipo selvagem B é modificado quimicamente por EDC. Por exemplo, em uma modalidade, TcdA (SEQ ID NO: 1) e/ou Tcdb (SEQ ID NO: 2) é modificado quimicamente por EDC. Em uma outra modalidade, a toxina do tipo selvagem é modificada quimicamente por EDC e NHS. Em uma modalidade, a toxina mutante inclui uma toxina do tipo selvagem A quimicamente modificada, sendo que a toxina do tipo selvagem A é qualquer uma descrita na Tabela 1-a. Em uma outra modalidade, a toxina mutante inclui uma toxina do tipo selvagem B quimicamente modificada, sendo que a toxina do tipo selvagem B é qualquer uma descrita na Tabela 2-a.

[0398] Como um outro exemplo de um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante ligada em cruz quimicamente, pelo menos um aminoácido pode ser ligado em cruz quimicamente por um agente que inclui formaldeído. O formaldeído pode reagir com o grupo amino de um resíduo de aminoácido N-terminal e s cadeias laterais de arginina, cisteína, histidina, e lisina. O formaldeído e a glicina podem formar um aduto com base em Schiff, que pode anexar aos grupos amino N-terminal primários resíduos de arginina, e tirosina, e a um grau menor resíduos de asparagina, glutamina, histidina, e triptofano.

[0399] Um agente de ligação em cruz química é tal que reduz a citotoxicidade de uma toxina se a toxina tratada tem menos toxicidade (por exemplo, cerca de 100%, 99%, 95%, 90%, 80%, 75%, 60%, 50%,

25%, ou 10% menos toxicidade) do que a toxina tratada sob condições idênticas, como medido, por exemplo, por um *ensaio de citotoxicidade in vitro*, ou por uma toxicidade animal.

[0400] Preferencialmente, o agente de ligação em cruz química reduz a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante por pelo menos cerca de uma redução de 2-log_{10} , mais preferencialmente cerca de uma redução de 3-log_{10} , e mais preferencialmente cerca de uma redução de 4-log_{10} ou mais, relativo a uma toxina mutante sob condições idênticas mas na ausência do agente de ligação em cruz química. Quando comparado a uma toxina do tipo selvagem, o agente de ligação em cruz química preferencialmente reduz a citotoxicidade de uma toxina mutante por pelo menos cerca de uma redução de 5-log_{10} , cerca de uma redução de 6-log_{10} , cerca de uma redução de 7-log_{10} , cerca de uma redução de 8-log_{10} , ou mais.

[0401] Em outra modalidade preferida, a toxina de *C. difficile* mutante inativada quimicamente exibe valores EC_{50} maiores do que ou pelo menos cerca de 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 700 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 900 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ ou maior, como medido por, por exemplo, um *ensaio de citotoxicidade in vitro*, tais como um descrito aqui.

[0402] As condições de reação para contatar uma toxina mutante com o agente de ligação em cruz química estão dentro do escopo de um perito experiente na arte, e as condições podem variar dependendo do agente usado. Entretanto, os inventores surpreendentemente descobriram condições de reação ótimas para contatar um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante com um agente de ligação em cruz química, enquanto retém epítomos funcionais e diminui a citotoxicidade da toxina mutante, quando comparado a toxina do tipo selvagem correspondente.

[0403] Preferencialmente, as condições de reação são

selecionadas para contatar uma toxina mutante com um agente de ligação em cruz, sendo que a toxina mutante tem uma concentração mínima de cerca de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0 mg/ml para um máximo de cerca de 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, ou 1,25 mg/ml. Qualquer valor mínimo pode ser combinado para definir uma faixa de concentrações compatíveis de uma toxina mutante para a reação. Mais preferencialmente, a toxina mutante tem uma concentração de cerca de 1,0 – 1,25 mg/ml para a reação.

[0404] Em uma modalidade, o agente usado na reação tem uma concentração mínima de cerca de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, ou 50 mM, e uma concentração máxima de cerca de 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, ou 50 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa de concentrações compatíveis do agente químico para a reação.

[0405] Em uma modalidade preferida sendo que o agente inclui formaldeído, a concentração usada é preferencialmente qualquer concentração entre cerca de 2 mM a 80 mM, mais preferencialmente cerca de 40 mM. Em outra modalidade preferida sendo que o agente inclui EDC, a concentração usada é preferencialmente qualquer concentração entre cerca de 1,3 mM a cerca de 13 mM, mais preferencialmente cerca de 2 mM a 3 mM, mais preferencialmente cerca de 2,6 mM. Em uma modalidade, a concentração de EDC é de até 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 com base no volume de reação total, preferencialmente de até 1 g/L, mais preferencialmente de até 0,5 g/L.

[0406] Os períodos de reação exemplares no qual a toxina mutante é contatada com o agente de ligação em cruz química incluem um mínimo de cerca de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48, ou 60 horas, e um máximo de cerca de 14 dias, 12 dias, 10 dias, 7 dias, 5

dias, 3 dias, 2 dias, 1 dia, ou 12 horas, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 hora. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa de períodos de reação compatível.

[0407] Em uma modalidade preferida, a etapa de contatar uma toxina mutante com o agente de ligação em cruz química ocorre por um período de tempo que é suficiente para reduzir a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante para um valor EC_{50} de pelo menos cerca de 1000 $\mu\text{g/ml}$ em uma célula humana compatível, por exemplo, as células IMR-90, em um ensaio de citotoxicidade *in vitro* padrão, quando comparado a uma toxina mutante idêntica na ausência do agente de ligação em cruz. Mais preferencialmente, a etapa de reação é realizada por um período que é pelo menos duas vezes mais longo, e mais preferencialmente pelo menos três vezes mais longo ou mais, já que o período de tempo suficiente para reduzir a citotoxicidade de uma toxina mutante para o valor EC_{50} de pelo menos cerca de 1000 $\mu\text{g/ml}$ em uma célula humana compatível. Em uma modalidade, o tempo de reação não excede cerca de 168 horas (ou 7 dias).

[0408] Por exemplo, em uma modalidade onde o agente inclui formaldeído, a toxina mutante é preferencialmente contatada com o agente por cerca de 12 horas, que foi mostrado como sendo um período de tempo exemplar que foi suficiente para reduzir a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante para um valor EC_{50} de pelo menos cerca de 1000 $\mu\text{g/ml}$ em uma célula humana compatível, por exemplo, as células IMR-90, em um ensaio de citotoxicidade *in vitro* padrão, quando comparado a uma toxina mutante idêntica na ausência do agente de ligação em cruz. Em uma modalidade mais preferida, a reação é realizada por cerca de 48 horas, que é pelo menos cerca de três vezes tão longo quanto o período de tempo suficiente para a reação. Em tal modalidade, o tempo de reação é preferencialmente não maior do que cerca de 72 horas.

[0409] Em uma outra modalidade onde o agente inclui EDC, a toxina mutante é preferencialmente contatado com o agente por cerca de 0,5 horas, mais preferencialmente pelo menos cerca de 1 hora, ou mais preferencialmente cerca de 2 horas. Em uma modalidade, a toxina mutante é contata com EDC para até cerca de 5 horas, preferencialmente até cerca de 3 horas, mais preferencialmente até cerca de 2 horas. Em tal modalidade, o tempo de reação é preferencialmente não maior do que cerca de 6 horas.

[0410] O pH exemplar no qual a toxina mutante é contatada com o agente de ligação em cruz química incluem um mínimo de cerca de pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, ou 7,5, e um máximo de cerca de pH 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, ou 6,5. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa de pH compatível. Preferencialmente, a reação ocorre no pH 6,5 a 7,5, preferencialmente no pH 7,0.

[0411] As temperaturas exemplares na qual a toxina mutante é contatada com o agente de ligação em cruz química incluem um mínimo de cerca de 2°C, 4°C, 10°C, 20°C, 25°C, ou 37°C, e uma temperatura máxima de cerca de 40°C, 37°C, 30°C, 27°C, 25°C, ou 20°C. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com um valor máximo para definir uma faixa de temperatura de reação compatível. Preferencialmente, a reação ocorre em cerca de 20°C a 30°C, mais preferencialmente em cerca de 25°C.

[0412] As composições imunogênicas como descrito acima podem incluir uma toxina de *C. difficile* mutante (A ou B). Portanto, as composições imunogênicas podem ocupar frascos separados (por exemplo, um frasco separado para uma composição incluindo uma toxina de *C. difficile* mutante A e um frasco separado para uma composição incluindo uma toxina de *C. difficile* mutante B) na preparação ou kit. As composições imunogênicas podem ser

pretendidas para o uso simultâneo, sequencial, ou separado.

[0413] Em uma outra modalidade, as composições imunogênicas como descrito acima podem incluir ambas toxinas de *C. difficile* mutantes (A e B). Qualquer combinação de toxina de *C. difficile* mutante A e de toxina de *C. difficile* mutante B descrita pode ser combinada para uma composição imunogênica. Portanto, as composições imunogênicas podem ser combinadas em um frasco único (por exemplo, um frasco único contendo ambas as composições incluindo o TcdA de *C. difficile* mutante e a composição incluindo o TcdB de *C. difficile* mutante). Preferencialmente, as composições imunogênicas incluem um TcdA de *C. difficile* mutante e um TcdB de *C. difficile* mutante.

[0414] Por exemplo, em uma modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 4 e a SEQ ID NO: 6, sendo que pelo menos um aminoácido de cada uma das SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6 é ligado em cruz quimicamente. Em uma outra modalidade, a composição imunogênica inclui a toxina de *C. difficile* mutante A, que inclui a SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 7, e a toxina de *C. difficile* mutante B, que compreende a SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8, sendo que pelo menos um aminoácido de cada uma das toxinas de *C. difficile* mutante é ligada em cruz quimicamente.

[0415] Em uma outra modalidade, a composição imunogênica inclui qualquer sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 84, e SEQ ID NO: 83, e qualquer sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 86, e SEQ ID NO: 85. Em uma outra modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 84 e uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 86. Em uma outra modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 83 e uma composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 85. Em uma outra modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 84,

SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 86, e a SEQ ID NO: 85.

[0416] Em uma outra modalidade, a composição imunogênica inclui um polipeptídeo tendo qualquer uma das sequências selecionadas a partir da SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 761, e um segundo polipeptídeo tendo qualquer uma das sequências selecionadas a partir da SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 761.

[0417] Entende-se que qualquer uma das modificações das composições inventivas, por exemplo, as composições imunogênicas incluindo uma toxina mutante A e/ou uma toxina mutante B, pode ser combinada em diferentes proporções ou quantidades para efeito terapêutico. Por exemplo, o TcdA de *C. difficile* mutante e TcdB de *C. difficile* mutante pode estar presente em uma composição imunogênica em uma proporção na faixa de 0,1:10 a 10:0,1, A:B. Em uma outra modalidade, por exemplo, o TcdB de *C. difficile* mutante e o TcdA de *C. difficile* mutante pode estar presente em uma composição imunogênica em uma proporção na faixa de 0,1:10 a 10:0,1, B:A. Em uma modalidade preferida, a proporção é de forma que a composição inclua uma quantidade total maior de um TcdB mutante do que uma quantidade total de TcdA mutante.

[0418] Em um aspecto, uma composição imunogênica é capaz de ligar a um anticorpo de neutralização ou um fragmento do mesmo. Preferencialmente, o anticorpo de neutralização ou fragmento de ligação do mesmo é um descrito aqui abaixo. Em uma modalidade exemplar, uma composição imunogênica é capaz de ligar a um anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo, sendo que o anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo inclui uma cadeia leve variável tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 36 e uma cadeia pesada variável tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 37. Por exemplo, a composição imunogênica pode incluir o TcdA de *C. difficile* mutante, SEQ ID NO: 4,

ou SEQ ID NO: 7. Como outro exemplo, a composição imunogênica pode incluir a SEQ ID NO: 84 ou a SEQ ID NO: 83.

[0419] Em outra modalidade exemplar, uma composição imunogênica é capaz de ligar a um anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo, sendo que o anticorpo anti-toxina B ou fragmento de ligação do mesmo inclui uma cadeia leve variável de B8-26 e uma cadeia pesada variável de B8-26. Por exemplo, a composição imunogênica pode incluir um TcdB de *C. difficile* mutante, SEQ ID NO: 6, ou SEQ ID NO: 8. Como outro exemplo, a composição imunogênica pode incluir a SEQ ID NO: 86 ou a SEQ ID NO: 85.

CÉLULA RECOMBINANTE

[0420] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma célula recombinante ou uma progênie do mesmo. Em uma modalidade, a célula ou progênie do mesmo inclui um polinucleotídeo codificando um TcdA de *C. difficile* mutante e/ou um TcdB de *C. difficile* mutante.

[0421] Em uma outra modalidade, a célula recombinante ou a progênie do mesmo inclui uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 8, quando alinhado otimamente, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de espaço padrão. Em uma modalidade, a célula recombinante ou a progênie do mesmo inclui uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade a qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 até a SEQ ID NO: 761.

[0422] Em uma outra modalidade, a célula recombinante ou a progênie do mesmo inclui uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídio tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 83, ou SEQ ID NO: 85, quando alinhado otimamente, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT usando os pesos de espaço padrão.

[0423] Em uma modalidade adicional, a célula recombinante ou a progênie do mesmo inclui uma sequência de ácido nucléico tendo pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, ou SEQ ID NO: 47, quando alinhado otimamente, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT usando os pesos de espaço padrão. A célula recombinante pode ser derivada de qualquer célula útil na produção recombinante de um polipeptídio da presente invenção, por exemplo, um procariota ou um eucariota. Preferencialmente, a célula recombinante é derivada de qualquer célula que seja compatível para expressar sequências de ácido nucléico heterólogas maiores do que cerca de 5000, 6000, preferencialmente cerca de 7000, e mais preferencialmente cerca de 8000 nucleotídeos ou mais. As células hospedeiras procarióticas podem ser qualquer bactéria gram-positiva ou gram-negativa. Nas modalidades exemplares, as células hospedeiras procarióticas carecem de polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina e/ou esporo.

[0424] A bactéria gram-negativa inclui, mas não está limitada a,

Campylobacter, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, e *Ureaplasma*. Por exemplo, a célula recombinante pode ser derivada de uma célula *Pseudomonas fluorescens*, como descrito em US Patent application publication 2010013762, parágrafos [0201]-[0230], a qual está incorporada aqui para referência.

[0425] A bactéria gram-positiva inclui, mas não está limitada a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, e *Streptomyces*. Preferencialmente, a célula é derivada de uma célula de *C. difficile*.

[0426] Os inventores identificaram as cepas de *C. difficile* do tipo selvagem que carecem de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina de *C. difficile*. As cepas carecendo de genes de toxina A e B endógenas incluem as seguintes cepas, que estão disponíveis pela American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA): *C. difficile* 1351 (ATCC 43593™), *C. difficile* 3232 (ATCC BAA-1801™), *C. difficile* 7322 (ATCC 43601™), *C. difficile* 5036 (ATCC 43603™), *C. difficile* 4811 (ATCC 43602™), e *C. difficile* VPI 11186 (ATCC 700057™).

[0427] Portanto, em uma modalidade, a célula recombinante *C. difficile* é derivada de uma cepa descrita aqui. Preferencialmente, a célula recombinante de *C. difficile* ou a progênie do mesmo é derivada do grupo consistindo de *C. difficile* 1351, *C. difficile* 5036, e *C. difficile* VPI 11186. Mais preferencialmente, a célula recombinante *C. difficile* ou a progênie do mesmo é derivada de uma célula *C. difficile* VPI 11186.

[0428] Em uma modalidade preferida, o gene e esporulação da célula recombinante de *C. difficile* ou a progênie do mesmo é inativada. Os esporos podem ser infecciosos, altamente resistentes, e

facilitar a persistência do *C. difficile* em ambientes externos aeróbicos do hospedeiro. Os esporos também podem contribuir para a sobrevivência do *C. difficile* dentro do hospedeiro durante a terapia antimicrobiana. Portanto, uma célula de *C. difficile* carecendo de um gene de esporulação é útil para produzir uma composição imunogênica segura para administração a mamíferos. Além disso, o uso de tais células facilita a segurança durante a fabricação, por exemplo, segurança para proteger a instalação, produtos futuros, e o pessoal.

[0429] Os exemplos de genes de esporulação para a inativação almejada incluem, *inter alia*, *spo0A*, *spoIIIE*, σ^E , σ^G , e σ^K . Preferencialmente, o gene *spo0A* é inativado.

[0430] Os métodos para a inativação de um gene de esporulação de *C. difficile* são conhecidos na arte. Por exemplo, um gene de esporulação pode ser inativado por uma inserção almejada de um marcador selecionável, tais como, um marcador de resistência ao antibiótico. Veja, por exemplo, Heap et al., *J Microbiol Methods*. Janeiro de 2010; 80(1):49-55; Heap et al., *J. Microbiol. Methods*, setembro de 2007; 70(3):452-464; e Underwood et al., *J Bacteriol*. Dezembro de 2009; 191(23):7296-305. Veja também, por exemplo, Minton et al., WO2007/148091, entitled, "DNA Molecules and Methods," incorporados aqui para referência em sua totalidade a partir das páginas 33-66, ou o US publication US 20110124109 A1 correspondente, parágrafos [00137]-[0227].

COMPOSIÇÕES RELACIONADAS A CULTURAÇÃO DE CÉLULA DE *C. DIFFICILE*

[0431] A invenção ainda refere-se as composições e métodos para uso na culturação de *C. difficile* e na produção de toxinas de *C. difficile*. Em um aspecto, a invenção refere-se a um meio de cultura compreendendo uma fonte de nitrogênio e uma célula de *C. difficile*.

[0432] As fontes de nitrogênio de meio de cultura compatíveis incluem: HY-SOJA (Quest), AMI-SOJA (Quest), NZ-SOJA (Quest), NZ-SOJA BL4 (Quest), NZ-SOJA BL7 (Quest), SHEFTONE D (Sheffield), SE50M (DMV), SE50 (DMV), SE %) MK (DMV), PEPTONA DE SOJA (Gibco), BACTO-SOJA TON (Difco), NUTRISOJA 2207 (ADM), BAKES NUTRISOJA (ADM) NUTRISOJA FLOUR, carne de soja, BACTO-EXTRATO DE LEVEDURA (Difco) EXTRATO DE LEVEDURA (Gibco), HY-YEST 412 extrato de levedura (Quest), HY-YEST 441 extrato de levedura (Quest), HY-YEST 444 extrato de levedura (Quest), HY-YEST 455 extrato de levedura (Quest) BACTO-MALT EXTRACT (Difco), Corn Steep, e PROFLO (Traders).

[0433] Em um aspecto, a invenção refere-se a um meio de cultura incluindo um hidrolisado vegetal e uma célula de *C. difficile*. Qualquer hidrolisado vegetal pode ser compatível. Os exemplos de hidrolisados de vegetais compatíveis são hidrolisado de semente de algodão, ervilha hidrolisada, e hidrolisado de soja.

[0434] Em uma modalidade preferida, o hidrolisado de vegetais é um hidrolisado de soja. Preferencialmente, o hidrolisado de soja é SE50MK (Friesland-Campaigna). Outros exemplos de produtos de soja que podem ser usados na invenção, e suas fontes, incluem: Tekniscience: Peptona de soja A1, Peptona de soja A2, Peptona de soja A3, Peptona de planta E1, Peptona de planta ET1, e Peptona de trigo E1; Quest: HY-Soja , HY-Soja T, AMI-Soja , NZ-Soja , NZ-Soja BLA, e NZ-Soja BL7; DMV: SE50M, SE70M, SE50MK, SE50MK-NK (Friesland-Campaigna), WGE80BT, WGE80M, CNE50M, e SE70BT; Marcor: Peptona de soja Tipo AB, Peptona de soja Tipo AC, Peptona de soja Tipo SL, Peptona de soja Tipo II, e Peptona de soja Tipo F; Oxoid: Peptona de Vegetais e Peptona de Vegetais No. 1; Gibco: Peptona de Soja; e Difco: Bacsoja tónus.

[0435] As concentrações do hidrolisado vegetal no meio de cultura

podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40, or 50 g/L a um valor máximo de 200, 150, 100, or 75 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de hidrolisado vegetal no meio de cultura é entre 10-50 g/L, mais preferencialmente cerca de 30 g/L. A concentração de hidrolisado vegetal no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0436] In another aspect, a invenção refere-se a a meio de cultura including a extrato de levedura (por exemplo, as a nitrogen source) and a *Clostridium difficile* cell. Most preferencialmente, the extrato de levedura is HY YEST 412 (Kerry Biosciences).

[0437] As concentrações do extrato de levedura no meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40, or 50 g/L a um valor máximo de 200, 150, 100, or 75 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de extrato de levedura no meio de cultura é entre 10-50 g/L, mais preferencialmente cerca de 20 g/L. A concentração de extrato de levedura no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0438] Os inventores descobriram que o crescimento do *C. difficile* pode ser suportado em um meio de cultura que inclui um hidrolisado vegetal sem o extrato de levedura, e em um meio de cultura que inclui extrato de levedura sem um hidrolisado de vegetal. A cultura das células e/ou produção de toxina resultando de um meio de cultura que inclui ambos o hidrolisado de vegetal e o and extrato de levedura, entretanto, tem sido observado ser maior do que os rendimentos resultando de um meio de cultura incluindo um hidrolisado vegetal na ausência do extrato de levedura, e maior do que os rendimentos

resultando de um meio de cultura incluindo o extrato de levedura na ausência de um hidrolisado de vegetal.

[0439] Portanto, os inventores descobriram que uma combinação de um hidrolisado vegetal e um extrato de levedura ajuda a suportar o crescimento máximo de *C. difficile* e/ou a produção de toxina. Em um aspecto, a invenção refere-se a um meio de cultura incluindo um hidrolisado de vegetal, extrato de levedura, e uma célula de *C. difficile*. O hidrolisado vegetal pode ser qualquer hidrolisado vegetal compatível conhecido na arte como descrito acima. Preferencialmente, o hidrolisado é um hidrolisado de soja. Mais preferencialmente, o hidrolisado de soja é SE50MK (Friesland-Campaigna). Em uma modalidade preferida, o extrato de levedura é HY YEST 412.

[0440] Em uma modalidade, o meio não inclui uma fonte de carbono. Os inventores observaram que o meio de cultura incluindo hidrolisado de soja / extrato de levedura na ausência de uma fonte de carbono alcança valores OD₆₀₀ de 2-3 e o rendimento de produção de toxinas de 10-15 mg/L.

[0441] Entretanto, um meio de cultura que inclui uma fonte de carbono foi surpreendentemente observado por aumentar a cultura das células de *C. difficile* e a produção de toxina, quando comparado a um meio na ausência de uma fonte de carbono. Além disso, os inventores surpreendentemente descobriram que a produção de uma toxina mutante não foi marcadamente inibida pela cultura de células *C. difficile* sob condições anaeróbicas incluindo uma fonte de carbono na presença de um meio incluindo um hidrolisado de soja. Portanto, em uma modalidade preferida, o meio ainda inclui uma fonte de carbono. Mais preferencialmente, em uma modalidade, o meio de cultura inclui uma fonte de carbono, sendo que o meio ainda inclui uma célula de *C. difficile* recombinante. Ainda mais preferencialmente, a célula de *C. difficile* recombinante inclui um promotor constitutivo. Em uma

modalidade preferida, o promotor é um promotor ferredoxina *Clostridium sporogenes* (*fdx*). Em outra modalidade preferida, a célula *C. difficile* recombinante não inclui um promotor cromossômico regulado que pode ser negativamente regulado por, por exemplo, uma repressão de glucose. Em uma modalidade mais preferida, a célula de *C. difficile* é uma célula recombinante ou uma progênie do mesmo como descrito acima. Qualquer fonte de carbono pode ser usada no meio de cultura. As fontes de carbono compatíveis incluem glucose, dextrose, manitol, frutose, e/ou manose. Preferencialmente, a fonte de carbono no meio de cultura é uma glucose. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura não inclui arabinose, xilose, sucrose, lactose, maltose, glicerina, ramnose, e/ou galactose.

[0442] As concentrações de uma fonte de carbono (por exemplo, glucose, manitol, frutose, e/ou manose) no meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, ou 60 g/L a um valor máximo de 150, 100, 90, 80, 75, 70, 50, 40, ou 30 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de uma fonte de carbono no meio de cultura é entre 5-70 g/L. Em uma modalidade, a concentração de uma fonte de carbono no meio de cultura é cerca de 10 g/L. Em uma outra modalidade, a concentração de uma fonte de carbono no meio de cultura é maior do que 10 g/L. Em uma outra modalidade, a concentração de uma fonte de carbono (por exemplo, glucose) no meio de cultura é 45-75 g/L, preferencialmente 55-65 g/L mais preferencialmente 55-65 g/L. Em uma outra modalidade, a concentração de uma fonte de carbono no meio de cultura é cerca de 60 g/L. A concentração de fonte de carbono no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0443] Em uma modalidade, o meio de cultura ainda inclui um

derivado de cloranfenicol. Os derivados de cloranfenicol exemplares incluem qualquer um de tianfenicol, florfenicol, succinato de cloranfenicol, e fluoranfenicol. Preferencialmente, o meio de cultura inclui tianfenicol. Sem estar limitado pelo mecanismo ou teoria, acredita-se que o derivado de cloranfenicol ajuda a prevenir a perda de plasmídeo durante a fermentação e no aumento da produção de células e/ou toxina, quando comparado a um meio de cultura na ausência de um derivado de cloranfenicol.

[0444] As concentrações de um derivado de cloranfenicol no meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 15, 20, ou 30 mg/L a um valor máximo de 100, 75, 50, ou 40 mg/L. Em uma outra modalidade, a concentração de derivado de cloranfenicol no meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um 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, ou 5 g/L a um 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. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de um derivado de cloranfenicol no meio de cultura é entre 5-20 mg/L, mais preferencialmente cerca de 15 mg/L. Em uma outra modalidade, a concentração de um derivado de cloranfenicol no meio de cultura é entre 1 g/L-10 g/L, preferencialmente entre 1g/L-5 g/L, mais preferencialmente cerca de 3 g/L. A concentração de derivado de cloranfenicol no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0445] Em uma modalidade, o meio de cultura ainda inclui um protetor de célula, tais como polietileno glicol, a polivinil álcool ou um polioli plurônico. Em uma modalidade, o meio de cultura inclui polietileno glicol, tais como polietileno glicol 2000 (PPG 2000).

[0446] As concentrações de uma célula protetora, tais como

polietileno glicol, no meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um 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, or 1 ml/L a um valor máximo de 2, 1, 0,90, 0,80, 0,70, 0,60, 0,50, 0,40, 0,30, 0,20 ml/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de um protetor de célula, tais como polietileno glicol no meio de cultura é entre 0,01 ml/L a 0,050, mais preferencialmente cerca de 0,25 ml/L. A concentração de protetor de célula no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0447] Em uma modalidade preferida, o meio de cultura inclui um hidrolisado de vegetal, extrato de levedura, e uma fonte de carbono, sendo que o hidrolisado vegetal é um hidrolisado de soja, sendo que o extrato de levedura é HY YEST 412 (Kerry Biosciences), e sendo que a fonte de carbono é glucose, mannitol, frutose, e/ou manose. Em uma modalidade mais preferida, o meio de cultura inclui um hidrolisado de soja SE50MK, HY YEST 412 extrato de levedura, glucose, e tianfenicol, a pH 7.

[0448] Em uma modalidade preferida, a proporção de meio de cultura inclui 30 g/L hidrolisado de soja SE50MK, 20 g/L HY YEST 412 extrato de levedura, 10 g/L glucose, e 15 mg/L tianfenicol, a pH 7. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura inclui cerca de 30 g/L hidrolisado de soja SE50MK, cerca de 20 g/L HY YEST 412 extrato de levedura, cerca de 10 g/L glucose, e cerca de 15 mg/L tianfenicol, a pH 7. O meio de cultura pode ainda incluem cerca de cerca de 0,25 ml/L PPG 2000. Em uma outra modalidade, o meio de cultura pode ainda incluem dextrose.

[0449] Em outra modalidade preferida, o meio de cultura inclui 30 g/L hidrolisado de soja SE50MK, 20 g/L HY YEST 412 extrato de

levedura, 60 g/L glucose, e 15 mg/L tianfenicol, a pH 7. Em outra modalidade preferida, o meio de cultura inclui cerca de 30 g/L hidrolisado de soja SE50MK, cerca de 20 g/L HY YEST 412 extrato de levedura, cerca de 60 g/L glucose, e cerca de 15 mg/L tianfenicol, a pH 7. O meio de cultura pode ainda incluem cerca de 0,25 ml/L PPG 2000. Em uma outra modalidade, o meio de cultura pode ainda incluir dextrose.

[0450] Em uma modalidade, o meio de cultura ainda inclui polipropileno glicol 2000 (PPG 2000). O meio de cultura pode incluir cerca de 0,05 mL PPG 2000 a cerca de 1 ml PPG 2000/L de meio, preferencialmente o meio de cultura inclui cerca de 0,25 ml/L PPG 2000/L de meio.

[0451] O meio de cultura descrito aqui pode ser compatível para a cultura de qualquer célula *C. difficile*. Em uma modalidade, a célula não é geneticamente modificada. Em uma outra modalidade, a célula é geneticamente modificada, tais como uma célula recombinante ou uma progênie do mesmo como descrito acima. Em uma modalidade, a célula de *C. difficile* é carente de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina. Em uma modalidade preferida, a célula de *C. difficile* é derivada de VPI 11186.

[0452] Em uma outra modalidade, a cell inclui um promotor constitutivo. Em uma modalidade preferida, o promotor é um promotor ferredoxina *Clostridium sporogenes* (*fdx*). Em outra modalidade preferida, a célula não inclui um promotor cromossômico regulado que pode ser regulado negativamente por, por exemplo, uma repressão de glucose. Em uma modalidade mais preferida, a célula de *C. difficile* é uma célula recombinante ou uma progênie do mesmo como descrito acima.

[0453] Os inventores também descobriram que um meio de anticorpo monoclonal suporta o crescimento de *C. difficile*. Portanto,

em um aspecto, a invenção refere-se a um meio de cultura que inclui um meio de anticorpo monoclonal. Em uma modalidade, o meio é um meio SFM4MAb™ (Thermo Scientific). Mostrou-se que o meio deu valores OD₆₀₀ de cerca de 10 e o rendimento de produção de toxina foi cerca de 40 mg/L.

[0454] Em uma modalidade, o pH do meio de cultura pode variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, or 7,0 a um valor máximo de 8,0, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, ou 7,1. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, o pH do meio de cultura é entre 6,0 a 8,0, mais preferencialmente, entre 6,5 a 7,5. Mais preferencialmente, o pH é 7,0.

[0455] Os títulos de pH compatíveis são conhecidos na arte, incluindo, por exemplo, NH₄OH, Na₂CO₃, e NaOH. Preferencialmente, o título de pH é NaOH.

[0456] O meio de cultura pode incluir ingredientes contendo fosfato tais como Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Entretanto, em uma modalidade preferida, o meio de cultura não inclui um ingrediente contendo fosfato.

MÉTODOS RELACIONADOS A CULTURAÇÃO DE UMA CÉLULA DE *C. DIFFICILE*

[0457] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de culturação do *C. difficile*. O método inclui cultivar uma célula de *C. difficile* em um meio como descrito acima.

[0458] Em uma modalidade, o crescimento de *C. difficile* de acordo com os métodos da invenção procede em pelo menos duas fases: crescimento da semente e fermentação. Uma cultura de semente é primeiro crescida por inoculação a partir de uma cultura de armazenamento, por exemplo, um banco de células de trabalho. A semente é usada tanto para inocular uma segunda cultura de semente quanto para inocular uma cultura de fermentação maior relativamente.

Como é entendido na arte, o número de culturas de sementes usadas pode depender, por exemplo, do tamanho e volume da etapa de fermentação.

[0459] Portanto, em um aspecto, a invenção refere-se a um método de cultivar o *C. difficile*. O método inclui cultivar uma célula de *C. difficile* em um primeiro meio de cultura sob condições que facilitam o crescimento da célula; inocular um segundo meio de cultura com todo ou uma parte de tal meio após tal primeira culturação; cultivar tal segundo meio sob condições que facilitem o crescimento da célula. O método pode ainda incluir isolar uma toxina de *C. difficile* de tal segundo meio. Em uma modalidade, o *C. difficile* é crescido em um primeiro meio de cultura referido como uma cultura de semente. Em uma modalidade, cultura de semente inclui um meio de cultura como descrito acima e uma inoculação a partir de uma cultura de armazenamento que foi crescida no meio.

[0460] A fase de crescimento da semente (ou fases) são geralmente realizadas para ampliar a quantidade dos microorganismos a partir da cultura de armazenamento, por isso pode ser usado como um inoculante para a fase de fermentação. A fase de crescimento de semente também pode ser realizada para permitir que os micróbios dormentes relativamente nas culturas armazenadas se tornem rejuvenescidos e cresçam nas culturas de crescimento ativamente.

[0461] O volume e a quantidade de células viáveis usadas para inocular a cultura de fermentação podem ser controlados mais precisamente se tomados a partir de uma cultura de crescimento ativamente (por exemplo, uma cultura de semente), em vez de se for tomada a partir de uma cultura de armazenamento.

[0462] Além disso, mais de uma (por exemplo, duas ou três) fases de crescimento de semente podem ser usadas para ampliar a quantidade de *C. difficile* para inoculação do meio de fermentação.

Alternativamente, o crescimento de *C. difficile* na fase de fermentação pode proceder diretamente a partir da cultura armazenada pela inoculação direta, se desejado.

[0463] O primeiro meio de cultura inclui um meio de cultura como descrito acima. Por exemplo, em uma modalidade, o primeiro meio de cultura inclui um hidrolisado vegetal e uma célula de *C. difficile*. Preferencialmente, o hidrolisado vegetal é um hidrolisado de soja, mais preferencialmente hidrolisado de soja SE50MK. Em uma outra modalidade, o primeiro meio de cultura inclui um extrato de levedura e uma célula de *C. difficile*. Preferencialmente, o extrato de levedura é HY YEST 412. Em uma outra modalidade, o primeiro meio de cultura inclui um hidrolisado vegetal e um extrato de levedura. Ainda em uma outra modalidade, o primeiro meio de cultura ainda inclui uma fonte de carbono. Preferencialmente, a fonte de carbono é glucose. Em uma modalidade, o meio de cultura inclui uma célula de *C. difficile* recombinante quando a fonte de carbono é incluída, sendo que a célula recombinante inclui um promotor constitutivo. Em uma outra modalidade, o meio de cultura ainda inclui um derivado de cloranfenicol. Preferencialmente, o meio de cultura inclui tianfenicol.

[0464] As concentrações do hidrolisado vegetal no primeiro meio de cultura (por exemplo, meio de cultura de semente) podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40, ou 50 g/L a um valor máximo de 200, 150, 100, ou 75 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de hidrolisado vegetal no meio de cultura é entre 10-50 g/L, mais preferencialmente cerca de 30 g/L. A concentração de hidrolisado vegetal no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0465] As concentrações do extrato de levedura no primeiro meio

de cultura (por exemplo, meio de cultura de semente) podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40, ou 50 g/L a um valor máximo de 200, 150, 100, ou 75 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de extrato de levedura no meio de cultura é entre 10-50 g/L, mais preferencialmente cerca de 20 g/L. A concentração de extrato de levedura no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0466] As concentrações de uma fonte de carbono no primeiro meio de cultura (por exemplo, meio de cultura de semente) podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 1, 5, 10, 15, ou 20 g/L a um valor máximo de 100, 75, 50, 40, ou 30 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de uma fonte de carbono no meio de cultura é entre 5-20 g/L, mais preferencialmente cerca de 10 g/L.

[0467] Em uma modalidade, o meio de cultura ainda inclui um derivado de cloranfenicol selecionado a partir de um grupo consistindo de tianfenicol, florfenicol, succinato de cloranfenicol, e fluoranfenicol. Preferencialmente, o meio de cultura inclui tianfenicol. As concentrações de um derivado de cloranfenicol no primeiro meio de cultura (por exemplo, meio de cultura de semente) podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 15, 20, ou 30 mg/L a um valor máximo de 100, 75, 50, ou 40 mg/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de um derivado de cloranfenicol no meio de cultura é entre 5-20 mg/L, mais preferencialmente cerca de 15 mg/L.

[0468] Em uma modalidade, o pH do primeiro meio de cultura

pode variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, ou 7,0 a um valor máximo de 8,0, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, ou 7,1. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, o pH do primeiro meio de cultura é entre 6,0 a 8,0, mais preferencialmente, entre 6,5 a 7,5. Mais preferencialmente, o pH é 7,0.

[0469] Em uma modalidade preferida, o primeiro meio de cultura inclui um hidrolisado de soja, extrato de levedura HY YEST 412, glucose, tianfenicol, a pH 7. Mais preferencialmente, o meio de cultura inclui 30 g/L hidrolisado de soja SE50MK, 20 g/L extrato de levedura HY YEST 412, 10 g/L glucose, 15 mg/L tianfenicol, a pH 7.

[0470] Para iniciar a fase de fermentação, uma parte ou toda a cultura de semente contendo *C. difficile* pode ser usada para inocular o meio de cultura de fermentação. Uma concentração apropriada da cultura de semente para usar para inocular o meio de fermentação pode ser determinado pelos peritos nesta arte e podem variar, por exemplo, de 0,1-10%. Como nos exemplos específicos, as concentrações de 0, 5, 1, 5, 5, 5, 6, 6, 25, 6, 5, 7, 8, 9, 10% podem ser usadas.

[0471] A fermentação pode ser usada para produzir a quantidade máxima de células em um ambiente anaeróbico em larga escala. Em uma modalidade, o *C. difficile* é crescido como uma cultura de fermentação. Em uma modalidade, a cultura de fermentação foi inoculada a partir da cultura de semente que foi crescida no meio.

[0472] O segundo meio de cultura inclui um meio de cultura como descrito acima. Por exemplo, em uma modalidade, o segundo meio de cultura inclui um hidrolisado vegetal e uma célula de *C. difficile*. Preferencialmente, o hidrolisado vegetal é um hidrolisado de soja, mais preferencialmente hidrolisado de soja SE50MK. Em uma outra

modalidade, o segundo meio de cultura inclui um extrato de levedura e uma célula de *C. difficile*. Preferencialmente, o extrato de levedura é HY YEST 412. Em uma outra modalidade, o segundo meio de cultura inclui um hidrolisado vegetal e um extrato de levedura. Ainda em uma outra modalidade, o segundo meio de cultura ainda inclui uma fonte de carbono. Preferencialmente, a fonte de carbono é glucose. Em uma modalidade, o meio de cultura inclui uma célula de *C. difficile* recombinante quando a fonte de carbono é incluída, sendo que a célula recombinante inclui um promotor constitutivo. Em uma outra modalidade, o segundo meio de cultura ainda inclui um derivado de cloranfenicol. Preferencialmente, o meio de cultura inclui tianfenicol.

[0473] As concentrações do hidrolisado vegetal no segundo meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40, ou 50 g/L a um valor máximo de 200, 150, 100, ou 75 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de hidrolisado vegetal no meio de cultura é entre 10-50 g/L, mais preferencialmente cerca de 30 g/L. A concentração de hidrolisado vegetal no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0474] As concentrações do extrato de levedura no segundo meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 20, 30, 40, ou 50 g/L a um valor máximo de 200, 150, 100, ou 75 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de extrato de levedura no meio de cultura é entre 10-50 g/L, mais preferencialmente cerca de 20 g/L.

[0475] As concentrações de uma fonte de carbono no segundo meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 10, 20, 30, 40, 50, ou 60 g/L a um valor máximo de 150, 100, 90, 80,

ou 70 g/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de uma fonte de carbono no meio de cultura é entre 50-70 g/L, mais preferencialmente cerca de 60 g/L. Em uma modalidade, a concentração de uma fonte de carbono no segundo meio de cultura é maior do que a concentração da fonte de carbono no primeiro meio de cultura. A concentração de fonte de carbono no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0476] Em uma modalidade, o meio de cultura ainda inclui um derivado de cloranfenicol selecionado a partir de um grupo consistindo de tianfenicol, florfenicol, succinato de cloranfenicol, e fluoranfenicol. Preferencialmente, o meio de cultura inclui tianfenicol. As concentrações de um derivado de cloranfenicol no segundo meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 5, 10, 15, 20, ou 30 mg/L a um valor máximo de 100, 75, 50, ou 40 mg/L. Em uma outra modalidade, a concentração de derivado de cloranfenicol no meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um 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, ou 5 g/L a um 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. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de um derivado de cloranfenicol no meio de cultura é entre 5-20 mg/L, mais preferencialmente cerca de 15 mg/L. Em uma outra modalidade, a concentração de um derivado de cloranfenicol no meio de cultura é entre 1 g/L-10 g/L, preferencialmente entre 1g/L-5 g/L, mais preferencialmente cerca de 3 g/L. A concentração de derivado de cloranfenicol no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0477] Em uma modalidade, o meio de cultura ainda inclui um protetor de célula, tais como polietileno glicol, um polivinil álcool ou um polioli plurônico. Em uma modalidade, o meio de cultura inclui um polietileno glicol, tais como polietileno glicol 2000 (PPG 2000).

[0478] As concentrações de uma célula protetora, tais como polietileno glicol, no meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um 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, ou 1 ml/L a um valor máximo de 2, 1, 0,90, 0,80, 0,70, 0,60, 0,50, 0,40, 0,30, 0,20 ml/L. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a concentração de um protetor de célula, tais como polietileno glicol no meio de cultura é entre 0,01 ml/L a 0,0,50, mais preferencialmente cerca de 0,25 ml/L. A concentração de protetor de célula no meio de cultura descritas aqui pode ser com base no volume total do meio de cultura.

[0479] Em uma modalidade, o pH do segundo meio de cultura podem variar, por exemplo, entre um valor mínimo de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, ou 7,0 a um valor máximo de 8,0, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, ou 7,1. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, o pH do segundo meio de cultura é entre 6,0 a 8,0, mais preferencialmente, entre 6,5 a 7,5. Mais preferencialmente, o pH é 7,0.

[0480] Em uma modalidade preferida, o segundo meio de cultura inclui hidrolisado de soja, extrato de levedura HY YEST 412, glucose, tianfenicol, a pH 7. Mais preferencialmente, o meio de cultura inclui 30 g/L hidrolisado de soja, 20 g/L extrato de levedura HY YEST 412, 60 g/L glucose, 15 mg/L tianfenicol, a pH 7.

[0481] Em uma modalidade, a culturação é realizada sob

condições anaeróbicas. Em uma modalidade, as etapas de culturação dos métodos da invenção (ambas semente e fermentação) são realizadas sob condições anaeróbicas, embora as condições anaeróbicas para ambas estas fases podem ser usadas também.

[0482] As abordagens para a cultura anaeróbica de bactérias, tais como *C. difficile*, são conhecidas na arte e podem empregar, por exemplo, gás nitrogênio ou uma mistura de gases hidrogênio e nitrogênio. O gás pode ser borbulhado através de um meio (por exemplo, borbulhamento) durante a fermentação ou passado através da área acima do líquido em uma câmara de cultura (por exemplo, a câmara de espaço livre).

[0483] A culturação da célula de *C. difficile* pode ser realizada em uma câmara anaeróbica em aproximadamente $30\pm 1^\circ\text{C}$, $31\pm 1^\circ\text{C}$, $32\pm 1^\circ\text{C}$, $33\pm 1^\circ\text{C}$, $34\pm 1^\circ\text{C}$, $35\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$, $37\pm 1^\circ\text{C}$, $38\pm 1^\circ\text{C}$, ou $39\pm 1^\circ\text{C}$, preferencialmente cerca de $37\pm 1^\circ\text{C}$. A culturação pode ser realizada por tempos variando, por exemplo, entre um valor mínimo de 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 horas a um valor máximo de 9 dias, 8 dias, 7 dias, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 48 horas, ou 36 horas, ou 24 horas. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade preferida, a culturação da célula ocorre de 11 a 48 horas, mais preferencialmente cerca de 24 horas. Em uma outra modalidade, a culturação da célula ocorre de 5 a 25 horas, 10 a 20 horas, preferencialmente cerca de 15 horas. O crescimento pode ser monitorado medindo a densidade ótica (O.D.) do meio.

[0484] Em uma modalidade, o método ainda inclui isolar as toxinas de *C. difficile* a partir de tal meio. As toxinas de *C. difficile* podem ser isoladas e/ou purificadas a partir de culturas usando métodos de purificação de proteína conhecidos. As toxinas purificadas podem

então, por exemplo, ser ativadas por um tratamento de inativação.

[0485] Em um aspecto alternativo, a invenção refere-se a um método de cultivar o *C. difficile*. O método inclui cultivar uma célula de *C. difficile* em um meio de anticorpo monoclonal.

[0486] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para a produção de uma toxina de *C. difficile*. O método inclui cultivar uma bactéria de *C. difficile* em um meio, como descrito acima, sob condições para permitir a produção da toxina. O método ainda inclui isolar a toxina de *C. difficile* a partir do meio.

[0487] Em uma modalidade, o método inclui cultivar uma célula de *C. difficile* em um primeiro meio sob condições que facilitem o crescimento de *C. difficile*; inocular um segundo meio com todo ou uma parte de tal primeiro meio após a cultura; cultivar tal segunda inoculação sob condições que facilitem o crescimento de *C. difficile* e a produção de toxina; e isolar uma toxina de *C. difficile* a partir de tal segundo meio. Em uma modalidade, a culturação do primeiro ou do segundo meio incluindo o *C. difficile* é realizada sob condições anaeróbicas.

[0488] Em uma modalidade, a célula de *C. difficile* é cultivada em um Sistema de cultura contínuo. Em uma outra modalidade, a invenção refere-se a um método de culturação de *C. difficile* em um método de perfusão. Surpreendentemente, os inventores descobriram que uma célula de *C. difficile* recombinante expressando uma toxina mutante pode ser cultivada com sucesso em uma cultura contínua anaeróbica e em uma cultura de perfusão anaeróbica. Uma vantagem de um sistema contínuo e/ou um sistema de perfusão é que o meio fresco pode ser adicionado continuamente. Além disso, os subprodutos de toxina da produção podem ser removidos durante a produção enquanto mantém a viabilidade da célula no sistema.

[0489] O sistema de cultura contínuo pode incluir proporcionar um

meio fresco para as células enquanto remove simultaneamente o meio gasto e as células do biorreator. A cultura continua pode incluir uma cultura de perfusão cultura de perfusão, na qual o fluxo de saída do líquido contém um meio de cultura que é subsequencialmente livre de células ou inclui uma concentração de célula substancialmente menor do que aquela no biorreator. Em uma cultura de perfusão, as células podem ser retidas por, por exemplo, filtração, filtração ultrassônica, centrifugação, ou sedimentação.

[0490] Em uma modalidade, o meio gasto é removido e filtrado, que previne as células de serem removidas do biorreator. O filtro pode ser um filtro de fluxo cruzado e/ou um filtro de fluxo tangencial. Em uma modalidade, tal Sistema de filtração compreende um filtro de fibra oco. Em uma outra modalidade, as células são prevenidas de serem removidas do biorreator por uma etapa de centrifugação. Em uma outra modalidade, as células são prevenidas de serem removidas do biorreator por uma etapa de filtração ultrassônica. Em uma outra modalidade, as células são prevenidas de serem removidas do biorreator através de um sistema de sedimentação. Em uma outra modalidade, tal sistema de filtração compreende um cassete de folha plana.

[0491] Ainda em outra modalidade, o sistema de perfusão compreende um filtro de fibra oco que reterá as células, mas não o produto desejado. As células são recicladas de volta para dentro do biorreator e o meio gasto contendo o produto desejado é passado através de um filtro de corte de peso molecular desejado. O filtro reterá o produto desejado. Os produtos residuais não retidos pelo filtro podem ser dispostos e reciclados.

MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA TOXINA DE C. DIFFICILE MUTANTE

[0492] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método para

produzir uma toxina de *C. difficile* mutante. Em uma modalidade, o método inclui cultivar qualquer célula recombinante ou uma progênie do mesmo descritos acima, sob condições compatíveis para expressar um polipeptídeo. O método ainda inclui uma etapa de isolar a toxina do meio.

[0493] Em uma outra modalidade, o método inclui cultivar uma célula recombinante ou uma progênie do mesmo sob condições compatíveis para expressar um polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante, sendo que a célula inclui o polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante, e sendo que a mutante inclui um domínio de glucosiltransferase tendo pelo menos uma mutação e um domínio de protease de cisteína tendo pelo menos uma mutação, relativo a toxina de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente. Em uma modalidade, a célula carente de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina.

[0494] Em uma outra modalidade, o método inclui cultivar uma célula de *C. difficile* recombinante ou uma progênie do mesmo sob condições compatíveis para expressar um polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante, sendo que a célula inclui o polinucleotídeo codificando a toxina de *C. difficile* mutante e a célula carente de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina de *C. difficile*.

[0495] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir a toxina de *C. difficile* mutante. O método inclui as etapas de: (a) contatar uma célula de *C. difficile* com uma célula de *Escherichia coli* recombinante, sendo que a célula de *C. difficile* carece de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina de *C. difficile* e a célula de *E. coli* inclui um polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante; (b) cultivar a célula de *C. difficile* e a célula de *E. coli* sob condições compatíveis para a transferência do polinucleotídeo da

célula de *E. coli* para a célula de *C. difficile*; (c) selecionar a célula de *C. difficile* compreendendo o polinucleotídeo codificando a toxina de *C. difficile* mutante; (d) cultivar a célula de *C. difficile* da etapa (c) sob condições compatíveis para expressar o polinucleotídeo; e (e) isolar a toxina de *C. difficile* mutante.

[0496] No método inventivo, a célula de *E. coli* recombinante inclui um polinucleotídeo heterólogo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante, descrito aqui. O polinucleotídeo pode ser um DNA ou RNA. Em uma modalidade exemplar, o polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante é um otimizado por códon para o uso de códon de *E. coli*. Os métodos para otimizar o códon de um polinucleotídeo são conhecidos na arte.

[0497] Em uma modalidade, o polinucleotídeo inclui uma sequência de ácido nucléico que é pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a um polinucleotídeo codificando um TcdA de *C. difficile* mutante, como descrito acima. Em uma modalidade, o polinucleotídeo inclui uma sequência de ácido nucléico que é pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo qualquer uma das sequências selecionadas a partir da SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 761. Um polinucleotídeo exemplar codificando uma toxina de *C. difficile* mutante A inclui a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 44, e SEQ ID NO: 45.

[0498] Em uma outra modalidade, o polinucleotídeo inclui uma sequência de ácido nucléico que é pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a um

polinucleotídeo codificando um TcdB de *C. difficile* mutante, como descrito acima. Um polinucleotídeo exemplar codificando uma toxina de *C. difficile* mutante B inclui a SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 46, e SEQ ID NO: 47. Em uma outra modalidade, o polinucleotídeo codifica a SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, ou SEQ ID NO: 86.

[0499] Em uma modalidade, a célula de *E. coli* que inclui o polinucleotídeo heterólogo é uma célula *E. coli* que hospeda estavelmente o polinucleotídeo heterólogo, que codifica a toxina de *C. difficile* mutante. As células de *E. coli* exemplares incluem uma célula selecionada partir de um grupo consistindo de MAX Efficiency® Stbl2™ *E. coli* Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA), One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA), ElectroMAX™ Stbl4™ *E. coli* Competent Cells (Invitrogen), e *E. coli* CA434. Em uma modalidade preferida, a célula hospedeira clonando o *E. coli* não é DH5α. Mais preferencialmente, a célula hospedeira clonando o *E. coli* é uma MAX Efficiency® Stbl2™ *E. coli* Competent Cell.

[0500] O método inventivo ainda inclui uma etapa de cultivar a célula de *C. difficile* e a célula de *E. coli* sob condições compatíveis para transferir o polinucleotídeo da célula *E. coli* para a célula *C. difficile*, resultando em uma célula de *C. difficile* recombinante. Em uma modalidade preferida, as condições de cultura são compatíveis para transferir o polinucleotídeo da célula *E. coli* (a célula doadora) para dentro da célula de *C. difficile* (a célula receptora), e resultando em um aherança estável geneticamente.

[0501] Mais preferencialmente, as condições de cultura são compatíveis para uma conjugação bacteriana, que são conhecidas na arte. A “conjugação” refere-se a um processo particular de transferência de polinucleotídeo em que uma transferência

unidirecional de um polinucleotídeo (por exemplo, de um plasmídeo bacteriano) ocorre de uma célula bacteriana (isto é, o “doador”) para outra (isto é, o “receptor”). O processo de conjugação envolve o contato da célula do doador com a célula do receptor. Preferencialmente, a célula doadora de *E. coli* é uma célula *E. coli* CA434.

[0502] As condições exemplares compatíveis (conjugação) para a transferência do polinucleotídeo da célula de *E. coli* para a célula de *C. difficile* inclui culturas de líquido de crescimento de *C. difficile* em um caldo infusão de cérebro coração (BHI; Oxoide) ou caldo anaeróbico de Schaedlers (SAB; Oxoide). Em uma outra modalidade, as culturas sólidas de *C. difficile* podem ser crescidas em um ágar de sangue fresco (FBA) ou um ágar BHI. Preferencialmente, o *C. difficile* é crescido a 37°C em um ambiente anaeróbico (por exemplo, 80% N₂, 10% CO₂, e 10% H₂ [vol/vol]). Em uma modalidade, a condição compatível inclui crescer o *E. coli* aerobicamente em um caldo de Luria-Bertani (LB) ou em um agar LB a 37°C. para a transferência conjugativa para o *C. difficile*, uma condição compatível exemplar inclui crescer o *E. coli* anaerobicamente em FBA. Os antibióticos podem ser incluídos no meio líquido ou sólido como é conhecido na arte. Os exemplos de tais antibióticos incluem cicloserina (250 µg/ml), cefoxitina (8 µg/ml), cloranfenicol (12,5 µg/ml), tianfenicol (15 µg/ml), e eritromicina (5 µg/ml).

[0503] O método inventivo adicionalmente inclui uma etapa de selecionar a célula de *C. difficile* recombinante resultante que inclui o polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante. Em uma modalidade exemplar, a célula de *C. difficile* recombinante é um receptor do polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante a partir de uma célula de *E. coli* recombinante através de conjugação.

[0504] O método inventivo inclui uma etapa de cultivar a célula recombinante ou a progênie do mesmo sob condições compatíveis para expressar o polinucleotídeo codificando a toxina de *C. difficile* mutante, resultando na produção de uma toxina de *C. difficile* mutante. As condições compatíveis para uma célula recombinante para expressar o polinucleotídeo incluem condições de cultura compatíveis para o crescimento de uma célula *C. difficile*, que são conhecidas na arte. Por exemplo, as condições compatíveis pode incluir cultivar os transformantes de *C. difficile* em um caldo infusão de cérebro coração (BHI; Oxoide) ou um caldo anaeróbico de Schaedlers (SAB; Oxoide). Em uma outra modalidade, as culturas de *C. difficile* sólidas podem ser crescidas em FBA ou agar BHI. Preferencialmente, o *C. difficile* é crescido a 37°C em um ambiente anaeróbico (por exemplo, 80% N₂, 10% CO₂, e 10% H₂ [vol/vol]).

[0505] Em uma modalidade, o método inventivo inclui uma etapa de isolar a toxina de *C. difficile* mutante resultante. Os métodos e isolamento de uma proteína a partir de *C. difficile* são conhecidos na arte.

[0506] Em uma outra modalidade, o método inclui uma etapa de purificar a toxina de *C. difficile* mutante resultante. Os métodos de purificação de um polipeptídeo, tais como cromatografia, são conhecidos na arte.

[0507] Em uma modalidade exemplar, o método ainda inclui uma etapa de contatar a toxina de *Clostridium difficile* mutante isolada com um agente de ligação em cruz química descritos acima. Preferencialmente, o agente inclui formaldeído, etil- 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, ou uma combinação de EDC e NHS. As condições de reação exemplares são descritas acima e nos exemplos na seção abaixo.

[0508] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição

imunogênica incluindo uma toxina de *C. difficile* mutante descrita aqui, produzida por qualquer método, preferencialmente por qualquer um dos métodos de modificação descritos acima.

ANTICORPOS

[0509] Surpreendentemente, as composições imunogênicas inventivas descritas acima provocaram novos anticorpos *in vivo*, sugerindo que as composições imunogênicas incluem uma estrutura nativa preservada (por exemplo, um epítipo antigênico preservado) da toxina de *C. difficile* do tipo selvagem respectiva e que as composições imunogênicas incluem um epítipo. Os anticorpos produzidos contra uma toxina de tal cepa de *C. difficile* podem ser capazes de ligar a uma toxina correspondente produzida por outra cepa de *C. difficile*. Isto é, os anticorpos e os fragmentos de ligação dos mesmos podem por “reação em cruz,” que refere-se a uma capacidade de reagir com locais antigênicos similares nas toxinas produzidas a partir de cepas de *C. difficile* múltiplas. A reatividade em cruz também inclui a capacidade de um anticorpo reagir com ou ligar um antígeno que não estimula sua produção, isto é, a reação entre um antígeno e um anticorpo que foi gerado contra um antígeno similar, mas diferente.

[0510] Em um aspecto, os inventores surpreendentemente descobriram anticorpos monoclonais tendo um efeito neutralizador nas toxinas de *C. difficile*, e os métodos de produção do mesmo. Os anticorpos inventivos podem neutralizar a citotoxicidade da toxina de *C. difficile in vitro*, inibir a ligação da toxina de *C. difficile* a células de mamíferos, e/ou pode neutralizar a enterotoxicidade da toxina de *C. difficile in vivo*. A presente invenção também refere-se a polinucleotídeos isolados que incluem sequências de ácido nucléico codificando qualquer uma das modificações acima mencionadas. Além disso, a presente invenção refere-se ao uso de qualquer uma das composições acima mencionadas para tratar, prevenir, diminuir o risco

de, diminuir a gravidade de, diminuir as ocorrências de, e/ou retardar o início de uma infecção por um *C. difficile*, doença associada a um *C. difficile*, síndrome, condição sintoma, e/ou complicação do mesmo em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada, assim como os métodos para a preparação ode tais composições.

[0511] Os inventores ainda descobriram que uma combinação de pelo menos dois dos anticorpos monoclonais neutralizantes podem exibir um efeito sinérgico inesperadamente na respectiva neutralização de TcdA ou TcdB. Os anticorpos antitoxina ou os fragmentos de ligação do mesmo podem ser úteis na inibição de uma infecção por *C. difficile*.

[0512] Um “anticorpo” é uma proteína incluindo pelo menos uma ou duas regiões variáveis de cadeia pesada (H) (abreviada aqui como VH), e pelo menos uma ou duas regiões variáveis de cadeia leve (L) (abreviada aqui como VL). As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominada “regiões determinando complementariedade” (“CDR”), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas “regiões estruturais” (FR). A extensão da região de estrutura e os CDRs tem sido precisamente definida (veja, Kabat, E. A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991, e Chothia, C. et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987). O termo “anticorpo” inclui imunoglobulinas intactas dos tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (assim como os subtipos dos mesmos), sendo que as cadeias leves da imunoglobulina podem ser tipos kappa ou lambda.

[0513] As moléculas de anticorpos podem ser de comprimento completo (por exemplo, um anticorpo IgG1 ou IgG4). Os anticorpos podem ser de vários isótipos, incluindo: IgG (por exemplo, IgG1, IgG2,

IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD, ou IgE. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é um isótipo IgG, por exemplo, IgG1. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é um anticorpo IgE.

[0514] Em uma outra modalidade, a molécula de anticorpo inclui um “fragmento de ligação ao antígeno” ou “fragmento de ligação,” como usado aqui, que se refere a uma parte de um anticorpo que se liga especificamente a uma toxina de *C. difficile* (por exemplo, toxina A). o fragmento de ligação é, por exemplo, uma molécula em que uma ou mais cadeias de imunoglobulina não seja de comprimento completo, mas que se ligue especificamente a uma toxina.

[0515] Os exemplos de partes de ligação abrangidas dentro do termo “fragmento de ligação” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo de VL, VH, CL e domínios CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de charneira; (iii) um fragmento Fd consistindo de domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo de domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989), que consiste em um domínio VH; e (vi) uma região de determinação de complementariedade isolada (CDR) tendo uma estrutura de trabalho para ligar especificamente, por exemplo, uma parte de ligação ao antígeno de uma região variável.

[0516] Um fragmento de ligação de uma região variável de cadeia leve e um fragmento de ligação de uma região variável de cadeia pesada, por exemplo, os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, podem ser juntados, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que os possibilita a serem feitos como uma cadeia de proteína única na qual o par de regiões VL e VH para formar pares de regiões para formar moléculas monovalentes (conhecidas como

cadeia simples Fv (scFv); veja, por exemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; e Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia única também são abrangidos dentro do termo “fragmento de ligação” de um anticorpo. Estas partes de anticorpo são obtidas usando técnicas conhecidas na arte, e as posições são escaneadas e as partes são rastreadas para a utilidade da mesma maneira que os anticorpos intactos.

[0517] Como usado aqui, um anticorpo que “se liga especificamente” a ou é “específico” para um polipeptídeo particular ou um epítopo em um polipeptídeo particular é um anticorpo que se liga a aquele polipeptídeo articular sem se ligar substancialmente a qualquer outro polipeptídeo ou epítopo de polipeptídeo. Por exemplo, quando se referindo a uma biomolécula (por exemplo, proteína, ácido nucléico, anticorpo, etc.) que “se liga especificamente” a um alvo, a biomolécula se liga a sua molécula alvo e não se liga em uma quantidade significativa a outras moléculas em uma população heterogênea de moléculas que incluem o alvo, como medido sob condições designadas (por exemplo, condições de imunoensaio no caso de um anticorpo). A reação de ligação entre o anticorpo e seu alvo é determinativa para a presença do alvo na população heterogênea das moléculas. Por exemplo, “ligação específica” ou “se liga especificamente” refere-se a capacidade de um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo de se ligar a uma toxina de *C. difficile* do tipo selvagem e/ou mutante com uma afinidade que é pelo menos duas dobras maior do que sua afinidade para o antígeno não específico.

[0518] Em uma modalidade exemplar, o anticorpo é um anticorpo quimérico. Um anticorpo quimérico pode ser produzido por técnicas de DNA recombinantes conhecidas na arte. Por exemplo, um gene codificando a região constante Fc de uma molécula de anticorpo

monoclonal de murino (ou outras espécies) pode ser digerida com as enzimas de restrição para remover a região codificando o Fc murino, e a parte equivalente de um gene codificando uma região constante Fc humano é substituída. Um anticorpo quimérico também pode ser criado por técnicas de DNA recombinante onde o DNA codificando as regiões variáveis de murino possam ser ligadas ao DNA codificando as regiões constantes humana.

[0519] Em outra modalidade exemplar, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é humanizado por métodos conhecidos na arte. Por exemplo, uma vez que os anticorpos de murino são obtidos, um CDR do anticorpo pode ser substituído com pelo menos uma parte de um CDR humano. Os anticorpos humanizados também podem ser gerados substituindo as sequências de região variável Fv murino que não são envolvidas diretamente na ligação do antígeno com as sequências equivalentes a partir das regiões variáveis Fv humano. Os métodos gerais para a geração de anticorpos humanizados são conhecidos na arte.

[0520] Por exemplo, os anticorpos monoclonais direcionados na direção dos *C. difficile* TcdA ou *C. difficile* TcdB também podem ser produzidos por técnicas padrão, tais como uma técnica de hibridoma (veja, por exemplo, Kohler e Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497). Em resumo, uma linha de célula imortal é fundida a um linfócito a partir de um mamífero imunizado com *C. difficile* TcdA, *C. difficile* TcdB, ou uma toxina de *C. difficile* mutante descrita aqui, e os sobrenadantes da cultura das células de hibridoma resultantes são rastreados para identificar um hibridoma produzindo um anticorpo monoclonal que se liga ao *C. difficile* TcdA ou *C. difficile* TcdB. Tipicamente, a linha de célula imortal é derivada das mesmas espécies de mamíferos que os linfócitos. As células de hibridoma produzindo um anticorpo monoclonal da invenção são detectadas rastreando os sobrenadantes

da cultura de hibridoma para anticorpos que se ligam ao *C. difficile* TcdA ou *C. difficile* TcdB usando um ensaio, tais como ELISA. Os hibridomas humanos podem ser preparados de uma maneira similar.

[0521] Como uma alternativa para a produção de anticorpos por imunização e seleção, os anticorpos da invenção também podem ser identificados rastreando uma biblioteca de imunoglobulina combinatória recombinante com um *C. difficile* TcdA, *C. difficile* TcdB, ou uma toxina de *C. difficile* mutante descrita aqui. A biblioteca de anticorpo recombinante pode ser uma biblioteca scFv ou uma biblioteca Fab, por exemplo. Além disso, os anticorpos inventivos descritos aqui podem ser usados em estudos de ligação competitiva para identificar anticorpos anti-TcdA ou anti-TcdB adicionais e fragmentos de ligação do mesmo. Por exemplo, os anticorpos anti-TcdA ou anti-TcdB adicionais e os fragmentos de ligação dos mesmos podem ser identificados rastreando uma biblioteca de anticorpo humano e identificando moléculas dentro da biblioteca que competem com os anticorpos inventivos descritos aqui em um ensaio de ligação competitivo.

[0522] Além disso, os anticorpos abrangidos pela presente invenção incluem anticorpos recombinantes que podem ser gerados usando métodos de exibição de fago conhecido na arte. Nos métodos de exibição de fago, o fago pode ser usado para exibir os domínios de ligação de antígeno expressos a partir de um repertório ou uma biblioteca de anticorpo (por exemplo, humano ou murino). O fago expressando um domínio de ligação ao antígeno que se liga a um imunógeno descrito aqui (por exemplo, uma toxina de *C. difficile* mutante) pode ser selecionado ou identificado com o antígeno, por exemplo, usando um antígeno de marcação.

[0523] Também estão dentro do escopo da invenção os anticorpos e os fragmentos de ligação dos mesmos em que os aminoácidos

específicos tenham sido substituídos, deletados, ou adicionados. Em particular, os anticorpos preferidos têm substituições de aminoácidos na região de estrutura, tais como para melhorar a ligação ao antígeno. Por exemplo, um número pequeno selecionado de resíduos de estrutura de receptor da cadeia de imunoglobulina pode ser substituído pelos aminoácidos de doador correspondentes. As localizações preferidas das substituições incluem os resíduos de aminoácido adjacentes ao CDR, ou que são capazes de interagir com um CDR. O critério para selecionar os aminoácidos a partir do doador são U.S. Pat. No. 5,585,089 (por exemplo, colunas 12-16). A estrutura aceitadora pode ser uma sequência de estrutura de anticorpo humano madura ou uma sequência de consenso.

[0524] Como usado aqui, um “anticorpo de neutralização ou um fragmento de ligação do mesmo” refere-se a um anticorpo respectivo ou um fragmento de ligação do mesmo que se liga a um patógeno (por exemplo, um *C. difficile* TcdA ou TcdB) e reduz a infectividade e/ou uma atividade do patógeno (por exemplo, reduz a citotoxicidade) em um mamífero e/ou na cultura de célula, quando comparado a um patógeno sob condições idênticas na ausência do anticorpo de neutralização ou um fragmento de ligação do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo de neutralização ou fragmento de ligação do mesmo é capaz de neutralizar pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou mais de uma atividade biológica do patógeno, quando comparado a uma atividade biológica do patógeno sob condições idênticas na ausência do anticorpo de neutralização ou um fragmento de ligação do mesmo.

[0525] Como usado aqui, o termo “anticorpo antitoxina ou um fragmento de ligação do mesmo” refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo que se liga a toxina de *C. difficile* respectiva (por exemplo, uma toxina de *C. difficile* A ou toxina B). Por

exemplo, um anticorpo de antitoxina A ou fragmento de ligação do mesmo refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo que se liga ao TcdA. Os anticorpos ou os fragmentos de ligação do mesmo descritos aqui podem ser aumentados em qualquer mamífero, do tipo selvagem e/ou transgênico, incluindo, por exemplo, camundongo, humanos, coelhos e cabras.

[0526] Quando uma composição imunogênica descrita acima é uma que tenha sido anteriormente administrada a uma população, tais como para vacinação, a resposta do anticorpo gerada nos sujeitos pode ser usada para neutralizar as toxinas a partir da mesma cepa e a partir de uma cepa que não estimulou a produção do anticorpo. Veja, por exemplo, o Exemplo 37, que mostra os estudos relacionados a uma reatividade em cruz, gerada pela composição imunogênica, entre a cepa 630 e as toxinas de várias cepas de *C. difficile* do tipo selvagem.

[0527] Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para *C. difficile* TcdA. Os anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao TcdA incluem A65-33; A60-22; A80-29 e/ou, preferencialmente, A3-25.

[0528] Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para uma cepa de TcdA a partir de *C. difficile* do tipo selvagem, tais como aquelas descritas acima, por exemplo, para a SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para uma composição imunogênica descritas acima. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 7. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID

NO: 4 ou SEQ ID NO: 7, sendo que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 7 é ligado em cruz por formaldeído, EDC, NHS, ou uma combinação de EDC e NHS. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui uma SEQ ID NO: 84 ou SEQ ID NO: 83.

[0529] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação do mesmo tendo regiões de cadeia variável pesada e de cadeia variável leve que tem pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% de identidade para as regiões de cadeia pesada variável e cadeia leve variável de A65-33; A60-22; A80-29 e/ou, preferencialmente, A3-25 também podem se ligar ao TcdA.

[0530] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia pesada variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 37.

[0531] Em uma outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia leve variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 36.

[0532] Ainda em um outro aspecto, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada

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

[0533] Em uma outra modalidade, os anticorpos ou os fragmentos de ligação do mesmo tendo regiões determinado complementariedade (CDRs) de cadeias pesadas variáveis e/ou cadeias leves variáveis de A65-33; A60-22; A80-29 e/ou, preferencialmente, A3-25 também podem se ligar ao TcdA. Os CDRs da região de cadeia pesada variável de A3-25 são mostrados na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4: Sequências de aminoácido CDR de cadeia pesada variável				
Clone	Cadeia	CDR	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
A3-25	Pesada	CDR1	GFTFTNYWMN	41
		CDR2	EIRLKSHNYATHFAESVKG	42
		CDR3	DYYGNPAFVY	43

[0534] Os CDRs da região de cadeia leve variável de A3-25 são mostrados na Tabela 5, abaixo.

Tabela 5: Sequências de aminoácido CDR de cadeia leve variável				
Clone	Cadeia	CDR	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
A3-25	Leve	CDR1	RSSQSLIHSNGNTYLH	38
		CDR2	KVSNRFS	39
		CDR3	SQTTYFPYT	40

[0535] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácido das regiões determinado complementariedade de cadeia pesada (CDRs) como mostrado na

SEQ ID NOs: 41 (CDR H1), 42 (CDR H2) e 43 (CDR H3), e/ou a sequência de aminoácidos da cadeia leve CDRs como mostrado na SEQ ID NOs: 38 (CDR L1), 39 (CDR L2) e 40 (CDR L3).

[0536] Em uma modalidade exemplar, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para a toxina *C. difficile* A se liga especificamente a um epítopo dentro da região N-terminal do TcdA por exemplo, um epítopo entre os aminoácidos 1-1256 do TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[0537] Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para a toxina *C. difficile* A se liga especificamente a um epítopo da região C-terminal da toxina A, por exemplo, um epítopo entre aminoácidos 1832 a 2710 do TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Os exemplos incluem A3-25; A65-33; A60-22; A80-29.

[0538] Ainda em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para a toxina *C. difficile* A se liga especificamente a um epítopo dentro da região de “translocação” da toxina *C. difficile* A, por exemplo, um epítopo que preferencialmente inclui os resíduos 956-1128 de um TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1, tais como um epítopo entre os aminoácidos 659-1832 de um TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[0539] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para *C. difficile* TcdB. Por exemplo, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo pode ser específico para um TcdB de qualquer cepa de *C. difficile* do tipo selvagem, tais como aquelas descritas acima, por exemplo, para a SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para uma composição imunogênica descrita acima. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma

composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8.

[0540] Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8, sendo que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8 é ligado em cruz pelo formaldeído, EDC, NHS, ou uma combinação de EDC e NHS. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86 ou SEQ ID NO: 85.

[0541] Os anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao TcdB incluem anticorpos produzidos pelos clones B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou, preferencialmente, B8-26 descritos aqui.

[0542] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação do mesmo que também podem se ligar ao TcdB incluem aqueles tendo regiões de cadeia pesada variável e de cadeia leve variável que são pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% idênticas as regiões de cadeia pesada e de cadeia leve variável de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6, preferencialmente B8-26, B59-3, e/ou B9-30.

[0543] Em uma modalidade, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia pesada variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 49.

[0544] Em uma modalidade, o anticorpo ou um fragmento de

ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia pesada variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 60.

[0545] Em uma modalidade, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia pesada variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 71.

[0546] Em uma outra modalidade, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia leve variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 55.

[0547] Em uma outra modalidade, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia leve variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 66.

[0548] Em uma outra modalidade, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de

60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia leve variável de A3-25 como estabelecido na SEQ ID NO: 77.

[0549] A sequência de aminoácido para a cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdB (B8-26 mAb) é estabelecida na SEQ ID NO: 49. Veja a Tabela 25-a.

Tabela 25-a: Sequências de aminoácido de cadeia pesada variáveis			
Clone	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
B8-26	Peptídio de sinal	MGWSCIILFLVATATGVHS	50
	Cadeia pesada variável	QVQLQQPGAELVKPGA PVKLSCAS GYSFTSYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSL TSEDSAVYYCAS GHYGSIFAY WGQGTTTLTVSS	49
	CDR1	GYSFTSYWMN	51
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	52
	CDR3	GHYGSIFAY	53
	Região constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	54

[0550] A sequência de aminoácido para a cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização do *C. difficile* TcdB (B8-26 mAb) é estabelecida na SEQ ID NO: 55. Veja a tabela 25-b.

Tabela25-b: Sequências de aminoácido de cadeia leve variáveis (κ)			
Clon e	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
B8-26	Peptídio de sinal	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	56
	Cadeia leve	VQITQSPSYLAASPGETITINC	55

Tabela25-b: Sequências de aminoácido de cadeia leve variáveis (κ)			
Clon e	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
	variável	RASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLLY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAM YYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPT VSI FPPSV EJAFQ	
	CDR1	RASKSISKYLA	57
	CDR2	SGSTLQS	58
	CDR3	QQHNEYPLT	59

[0551] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácido de CDRs de cadeia pesada como mostrado na SEQ ID NOs: 51 (CDR H1), 52 (CDR H2) e 53 (CDR H3), e/ou a sequência de aminoácidos de CDRs de cadeia leve como mostrado na SEQ ID NOs: 57 (CDR L1), 58 (CDR L2) e 59 (CDR L3).

[0552] A sequência de aminoácido para a cadeia pesada variável de um anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdB (B59-3 mAb) é estabelecida na SEQ ID NO: 60. Veja a tabela 26-a.

Tabela 26-a: Sequências de aminoácido de cadeia pesada variáveis			
Clone	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
B59-3	Peptídio de sinal	MGWSYIILFLVATATDVHS	61
	Cadeia pesada variável	QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKAS GYTFTSYWMH WVKQRPQGQGLEWIG	60

Tabela 26-a: Sequências de aminoácido de cadeia pesada variáveis			
Clone	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
		VINPSNGRSTYSEKF KTTATVTVDKSSSTAYMQL SILTSEDSAVYYCAR AYYSTSYAMDY WGQGTSTVTVSS	
	CDR1	GYTFTSYWMH	62
	CDR2	VINPSNGRSTYSEKF	63
	CDR3	AYYSTSYAMDY	64
	Região constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	65

[0553] A sequência de aminoácido para a cadeia leve variável de um anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdB (B59-3 mAb) é estabelecida na SEQ ID NO: 66. Veja a tabela 26-b.

Tabela 26-b: Sequências de aminoácido de cadeia leve variáveis (κ)			
Clone	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
B59-3	Peptídio de sinal	MKLPVRLLVLMFWIPASSSD	67
	Cadeia leve variável	VLMTQSPLSLPVSLGDQASIS C RSSQNIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDL GVYYC FQGSHFPFT FGTGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSVEJAF Q	66
	CDR1	RSSQNIVHSNGNTYLE	68
	CDR2	KVSNRFS	69
	CDR3	FQGSHFPFT	70

[0554] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácido de CDRs de cadeia pesada como mostrado na SEQ ID NOs: 62 (CDR H1), 63 (CDR H2) e 64 (CDR H3), e/ou a sequência de aminoácidos de CDRs de cadeia leve como mostrado na SEQ ID NOs: 68 (CDR L1), 69 (CDR L2) e 70 (CDR L3).

[0555] A sequência de aminoácido para a cadeia pesada de um anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdB (B9-30 mAb) é estabelecida na SEQ ID NO: 71. Veja a tabela 27-a.

Tabela 27-a: Sequências de aminoácido de cadeia pesada variáveis			
Clone	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
B9-30	Peptídio de sinal	MGWSCIIILFLVATATGVHS	72
	Cadeia pesada variável	QVQLQQPGAEEVVKPGAPVKLS CKAS GYPFTNYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSL TSEDSAVYY CAS GHYGSIFAY WGQGTTTLTVSS	71
	CDR1	GYPFTNYWMN	73
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	74
	CDR3	GHYGSIFAY	75
	Região constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	76

[0556] A sequência de aminoácido para a cadeia leve de um anticorpo de neutralização de *C. difficile* TcdB (B9-30 mAb) é

estabelecida na SEQ ID NO: 77. Veja a tabela 27-b.

Tabela 27-b: Sequências de aminoácido de cadeia leve variáveis (κ)			
Clone	Região	Sequência de aminoácido	SEQ ID NO:
B9-30	Peptídio de sinal	MRFQVQVLGLLLWISGAQCD	78
	Cadeia leve variável	VQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLIY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSVEJAFQ	77
	CDR1	RASKSISKYLA	79
	CDR2	SGSTLQS	80
	CDR3	QQHNEYPLT	81

[0557] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácido CDRs de cadeia pesada como mostrado na SEQ ID NOs: 73 (CDR H1), 74 (CDR H2) e 75 (CDR H3), e/ou a sequência de aminoácidos CDRs de cadeia leve como mostrado na SEQ ID NOs: 79 (CDR L1), 80 (CDR L2) e 81 (CDR L3).

[0558] Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para um *C. difficile* TcdB do tipo selvagem a partir de qualquer cepa de *C. difficile*, tais como aquelas descritas acima, por exemplo, para a SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para uma composição imunogênica descritas acima. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição

imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8, sendo que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8 é ligado em cruz pelo formaldeído, EDC, NHS, ou uma combinação de EDC e NHS.

[0559] Os anticorpos ou fragmentos de ligação dos mesmos tendo regiões de cadeia variável pesada e cadeia leve variável que são pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente cerca de 98%, mais preferencialmente cerca de 99% ou mais preferencialmente cerca de 100% idênticas as regiões de cadeia pesada e de cadeia leve variável de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou, preferencialmente, B8-26 também podem se ligar ao TcdB.

[0560] Em uma modalidade, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia pesada variável de B8-26 (SEQ ID NO: 49).

[0561] Em uma outra modalidade, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável incluindo uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido de região de cadeia leve variável de B8-26 (SEQ ID NO: 55).

[0562] Ainda em outro aspecto, o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada

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

[0563] Em uma outra modalidade, os anticorpos ou fragmentos de ligação dos mesmos tendo CDRs de cadeias pesada variável e/ou cadeias leve variável de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou, preferencialmente, B8-26 também podem se ligar ao TcdB.

[0564] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácido das regiões determinando complementariedade de cadeia pesada (CDRs) de B8-26, e/ou a sequência de aminoácidos CDRs de cadeia leve de B8-26.

[0565] Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para a toxina *C. difficile* toxin B se liga especificamente a um epítipo dentro da região N-terminal da toxina B, por exemplo, um epítipo entre aminoácidos 1-1256 de um TcdB, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. Os exemplos incluem B2-31; B5-40; B8-26; B70-2; B6-30; e B9-30.

[0566] Em uma modalidade exemplar, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para a toxina *C. difficile* B se liga especificamente a um epítipo dentro da região C-terminal da toxina B, por exemplo, um epítipo entre aminoácidos 1832 a 2710 de um TcdB, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[0567] Ainda em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo específico para a toxina *C. difficile* B se liga especificamente a um epítopo dentro da região de “translocação” de uma toxina *C. difficile* B, por exemplo, um epítopo que preferencialmente inclui os resíduos 956-1128 de um TcdB, de acordo com numeração da SEQ ID NO: 2, tais como um epítopo entre aminoácidos 659-1832 de um TcdB. Os exemplos incluem B59-3; B60-2; e B56-6.

COMBINAÇÕES DE ANTICORPOS

[0568] O anticorpo antitoxina ou o fragmento de ligação dos mesmos podem ser administrados em combinação com outros anticorpos antitoxina *C. difficile* (por exemplo, outros anticorpos monoclonais, gamaglobulina policlonal) ou um fragmento de ligação do mesmo. As combinações que podem ser usadas incluem um anticorpo antitoxina A ou um fragmento de ligação dos mesmos e um anticorpo antitoxina B ou um fragmento de ligação dos mesmos.

[0569] Em outra modalidade, uma combinação inclui um anticorpo antitoxina A ou um fragmento de ligação dos mesmos e outro anticorpo antitoxina A ou um fragmento de ligação dos mesmos. Preferencialmente, a combinação inclui um anticorpo monoclonal antitoxina A de neutralização ou fragmento de ligação dos mesmos e outro anticorpo monoclonal antitoxina A de neutralização ou fragmento de ligação dos mesmos. Surpreendentemente, os inventores descobriram que tal combinação resultou em um efeito sinérgico na neutralização da citotoxicidade da toxina A. por exemplo, uma combinação inclui uma combinação de pelo menos dois dos seguintes anticorpos monoclonais antitoxina A de neutralização: A3-25; A65-33; A60-22; e A80-29. Mais preferencialmente, a combinação inclui o anticorpo A3-25 e pelo menos um dos seguintes anticorpos monoclonais antitoxina A de neutralização: A65-33; A60-22; e A80-29.

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

[0570] Em uma outra modalidade, a combinação inclui um anticorpo antitoxina B ou um fragmento de ligação dos mesmos e outro anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação dos mesmos. Preferencialmente, a combinação inclui um anticorpo monoclonal antitoxina B de neutralização ou fragmento de ligação dos mesmos e outro anticorpo monoclonal antitoxina B de neutralização fragmento de ligação dos mesmos. Surpreendentemente, os inventores descobriram que tal combinação resultou em um efeito sinérgico na neutralização da citotoxicidade da toxina B. Mais preferencialmente, a combinação inclui uma combinação de pelo menos dois dos seguintes anticorpos monoclonais antitoxina B de neutralização: B8-26; B9-30 e B59-3. Mais preferencialmente, a combinação inclui todos os três anticorpos: B8-26; B9-30 e B59-3.

[0571] Ainda em outra modalidade, uma combinação inclui um anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação dos mesmos e outro anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação dos mesmos. Como estabelecido anteriormente, os inventores descobriram que uma combinação de pelo menos dois dos anticorpos monoclonais de neutralização podem exibir efeitos sinérgicos na neutralização respectiva da toxina A e da toxina B.

[0572] Em outra modalidade, os agentes da invenção podem ser formulados como uma mistura, ou ligados quimicamente ou geneticamente usando as técnicas reconhecidas na arte resultando ali em anticorpos ligados covalentemente s (ou fragmentos de anticorpos ligados covalentemente), tendo ambas as propriedades de ligação antitoxina A e antitoxina B. a formulação combinada pode ser guiada por uma determinação de um ou mais parâmetros tais como afinidade, avides, ou eficácia biológica do agente sozinho ou em combinação

com outro agente.

[0573] Tais terapias de combinação são preferencialmente aditivas e/ou sinérgicas em sua atividade terapêutica, por exemplo, na inibição, prevenção (por exemplo, de recaída), e/ou tratamento de doenças ou distúrbios relacionados ao *C. difficile*. A administração de tais terapias de combinação pode diminuir a dosagem do agente terapêutico (por exemplo, o anticorpo ou uma mistura de fragmento de anticorpo, ou um fragmento de anticorpo ou anticorpo biespecífico fundido geneticamente ou ligado em cruz) necessária para alcançar o efeito desejado.

[0574] Entende-se que qualquer uma das composições inventivas, por exemplo, uma antitoxina A e/ou anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação dos mesmos, pode ser combinada em diferentes proporções ou quantidades para o efeito terapêutico. Por exemplo, a antitoxina A e o anticorpo antitoxina B ou o respectivo fragmento de ligação dos mesmos pode estar presente em uma composição em uma proporção na faixa de 0,1:10 a 10:0,1, A:B. Em outra modalidade, a antitoxina A e o anticorpo antitoxina B ou respectivo fragmento de ligação dos mesmos pode estar presente em uma combinação em uma proporção na faixa de 0,1:10 a 10:0,1, B:A.

[0575] Em outro aspecto, a invenção refere-se um método para produzir um anticorpo de neutralização contra um *C. difficile* TcdA. O método inclui administrar uma composição imunogênica como descrita acima a um mamífero, e recuperar o anticorpo do mamífero. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica inclui um *C. difficile* TcdA mutante tendo a SEQ ID NO: 4, sendo que pelo menos um aminoácido de *C. difficile* TcdA mutante seja ligado em cruz quimicamente, preferencialmente por um formaldeído ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Os anticorpos de neutralização exemplares contra TcdA que podem ser produzidos incluem A65-33;

A60-22; A80-29 e/ou A3-25.

[0576] Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de produzir um anticorpo de neutralização contra um *C. difficile* TcdB. O método inclui administrar uma composição imunogênica como descrita acima a um mamífero, e recuperar o anticorpo do mamífero. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica inclui um *C. difficile* TcdB mutante tendo a SEQ ID NO: 6, sendo que pelo menos um aminoácido de *C. difficile* TcdB mutante é ligado em cruz quimicamente, preferencialmente por um formaldeído ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Os anticorpos de neutralização exemplares contra TcdB que podem ser produzidos incluem B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou B8-26.

FORMULAÇÕES

[0577] As composições da presente invenção (tais como, por exemplo, as composições incluindo uma toxina *C. difficile* mutante, composições imunogênicas, anticorpos e/ou fragmentos de ligação ao anticorpo dos mesmos descritas aqui) podem estar em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas sólida e semissólida de dosagem, supositórios, formas líquidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções de infusão ou injetáveis), dispersões ou suspensões, lipossomas, e/ou forma seca, tais como, por exemplo, forma de pó liofilizado, forma seca congelada, forma seca de pulverização, e/ou forma seca de espuma. Para os supositórios, os ligantes e os carregadores incluem, por exemplo, polialquilenoglicóis ou triglicerídeos; tais supositórios podem ser formados a partir de misturas contendo as composições inventivas. Em uma modalidade exemplar, a composição está na forma que é compatível para a solução em, ou suspensão em, veículos líquidos antes da injeção. Em outra modalidade exemplar, a composição é emulsificada em lipossomas ou micropartículas, tais como polilactideo, poliglicolideo, ou

copolímero.

[0578] Em uma modalidade preferida, a composição é liofilizada e reconstituída extemporaneamente antes do uso.

[0579] Em um aspecto, a presente invenção refere-se a composições farmacêuticas que incluem qualquer uma das combinações descritas aqui (tais como, por exemplo, as composições incluindo uma toxina de *C. difficile* mutante, composições imunogênicas, anticorpos e/ou fragmentos de ligação ao anticorpo dos mesmos descritos aqui), formulados juto com um carregador aceitável farmaceuticamente. Os “carregadores aceitáveis farmaceuticamente” incluem quaisquer solventes, meio de dispersão, estabilizadores, diluentes, e/ou tampões que são compatíveis fisiologicamente.

[0580] Os estabilizadores exemplares incluem carboidratos, tais como sorbitol, manitol, amido, dextrano, sacarose, trealose, lactose, e/ou glicose; proteínas inertes, tais como albumina e/ou caseína; e/ou outras macromoléculas maiores metabolizadas lentamente, tais como polissacarídeos tais como quitosana, ácido poliláctico, ácidos poliglicólicos e copolímeros (tais como látex funcionalizado SEPHAROSE™ agarose, agarose, celulose, etc), aminoácidos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos de copolímeros, e lipídios agregados (tais como gotículas de óleo ou lipossomas). Adicionalmente, estes carregadores podem funcionar como agentes imunoestimulantes (isto é, adjuvantes).

[0581] Preferencialmente, a composição inclui trealose. As quantidades preferidas de trealose (% por peso) incluem de um mínimo de cerca de 1%, 2%, 3%, ou 4% a um máximo de cerca de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, ou 5%. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade, a composição inclui cerca de 3% - 6% trealose, mais preferencialmente, 4,5% trealose, por exemplo, por

0,5 mL dose.

[0582] Os exemplos de diluentes compatíveis incluem água destilada, salmoura, salmoura tamponada com fosfato fisiológico, glicerina, álcool (tais como etanol), soluções de Ringer, solução de dextrose, soluções de sal Hank balanceadas, e/ou um excipiente liofilizado.

[0583] Os tampões exemplares incluem fosfato (tais como fosfato de potássio, fosfato de sódio); acetato (tais como acetato de sódio); succinato (tais como succinato de sódio); glicina; histidina; carbonato, Tris (tris(hidroximetil)aminometano), e/ou tampões de bicarbonato (tais como bicarbonato de amônio). Preferencialmente, a composição inclui um tampão tris. As quantidades preferidas de tampão tris incluem de um mínimo de cerca de um mínimo de cerca de 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM a um máximo de cerca de 100 mM, 50 mM, 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM, ou 11 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade, a composição inclui cerca de 8 mM a 12 mM tampões de tris, mais preferencialmente, 10 mM tampões de tris, por exemplo, por 0,5 mL dose.

[0584] Em outra modalidade preferida, a composição inclui um tampão de histidina. As quantidades preferidas de tampão de histidina incluem de um mínimo de cerca de 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM a um máximo de cerca de 100 mM, 50 mM, 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM, ou 11 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade, a composição inclui cerca de 8 mM a 12 mM de tampão de histidina, mais preferencialmente, 10 mM de tampão de histidina, por exemplo, por 0,5 mL dose.

[0585] Ainda em outra modalidade preferida, a composição inclui um tampão de fosfato. As quantidades preferidas de tampão de fosfato incluem de um mínimo de cerca de 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM a um máximo de cerca de 100 mM, 50 mM, 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM, ou 11 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade, a composição inclui cerca de 8 mM a 12 mM tampão de fosfato, mais preferencialmente, 10 mM tampão de fosfato, por exemplo, por 0,5 mL dose.

[0586] O pH do tampão será escolhido geralmente para estabilizar o material ativo de escolha, e pode ser determinável pelos peritos na arte por métodos conhecidos. Preferencialmente, o pH do tampão será na faixa de um pH fisiológico. Desse modo, as faixas de pH preferidas são de cerca de 3 a cerca de 8; mais preferencialmente, de cerca de 6,0 a cerca de 8,0; ainda mais preferencialmente, de cerca de 6,5 a cerca de 7,5; e o mais preferencialmente, em cerca de 7,0 a cerca de 7,2.

[0587] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas podem incluir um surfactante. Qualquer surfactante é compatível, tanto aniônico quanto catiônico não iônico anfotérico. Os surfactantes exemplares incluem os surfactantes de ésteres de polioxietileno sorbitano (por exemplo, TWEEN®), tais como polisorbato 20 e/ou polisorbato 80; éteres de polioxietileno graxo derivados de lauril, cetil, estearil e oleil álcoois (conhecido como surfactantes Brij), tais como trietilenoglicol monolauril éter (Brij 30); Triton X 100, ou t-octilfenoxipoliétoxietanol; e ésteres de sorbitano (comumente conhecidos como os SPANs), tais como trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaureato de sorbitano, e combinações dos mesmos. Os surfactantes preferidos incluem polisorbato 80 (monooleato de

polioxietileno sorbitano).

[0588] As quantidades preferidas de polisorbato 80 (% por peso) incluem de um mínimo de cerca de 0,001%, 0,005%, ou 0,01%, a um máximo de cerca de 0,010%, 0,015%, 0,025%, ou 1,0%. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade, a composição inclui cerca de 0,005% - 0,015% polisorbato 80, o mais preferencialmente, 0,01% polisorbato 80.

[0589] Em uma modalidade exemplar, a composição imunogênica inclui trealose e fosfato 80. Em outra modalidade exemplar, a composição imunogênica inclui um tampão de tris e polisorbato 80. Em outra modalidade exemplar, a composição imunogênica inclui um tampão de histidina e polisorbato 80. Ainda em outra modalidade exemplar, a composição imunogênica inclui tampão de fosfato e polisorbato 80.

[0590] Em uma modalidade exemplar, a composição imunogênica inclui trealose, tampão de tris e polisorbato 80. Em outra modalidade exemplar, a composição imunogênica inclui trealose, tampão de histidina e polisorbato 80. Ainda em outra modalidade exemplar, a composição imunogênica inclui trealose, tampão de fosfato e polisorbato 80.

[0591] As composições descritas aqui podem ainda incluir componentes de origem sintética, animal, vegetal, ou petróleo, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja, e/ou óleo mineral. Os exemplos incluem glicóis tais como propileno glicol ou polietileno glicol.

[0592] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica ainda inclui formaldeído. Por exemplo, em uma modalidade preferida, uma composição farmacêutica que ainda inclui formaldeído tem uma composição imunogênica, sendo que a toxina *C. difficile* mutante de

uma composição imunogênica tenha sido contatada com um agente de ligação em cruz química que inclui formaldeído. A quantidade de formaldeído presente na composição farmacêutica pode variar de um mínimo de cerca de 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,010%, 0,013%, ou 0,015%, a um máximo de cerca de 0,020%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014%, 0,013%, 0,012%, 0,011% ou 0,010%. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Em uma modalidade, a composição farmacêutica inclui cerca de 0,010% formaldeído.

[0593] Em algumas modalidades alternativas, a composição farmacêutica descrita aqui não inclui formaldeído. Por exemplo, em uma modalidade preferida, uma composição farmacêutica que não inclui formaldeído tem uma composição imunogênica, sendo que pelo menos um aminoácido da toxina *C. difficile* mutante é ligada em cruz quimicamente por um agente que inclui EDC. Mais preferencialmente, em tais modalidades, a toxina *C. difficile* mutante não foi contatada com o agente de ligação em cruz químico que inclui formaldeído. Como uma outra modalidade exemplar, uma composição farmacêutica que está na forma liofilizada não inclui formaldeído.

[0594] Em outra modalidade, as composições descritas aqui podem incluem um adjuvante, como descrito abaixo. Os adjuvantes preferidos aumentam a resposta imune intrínseca a um imunógeno sem causar mudanças conformacionais no imunógeno que possam afetar a forma qualitativa da resposta imune.

[0595] Os adjuvantes exemplares incluem 3 De-O-acilado monofosforil lipídio A (MPL™) (veja GB 2220211 (GSK)); um gel de hidróxido de alumínio tais como Alhidrogel™ (Brenntag Biosector, Denmark); sais de alumínio (tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio), que podem ser usados com ou sem

um agente imunoestimulantes tais como MPL ou 3-DMP, QS-21, aminoácidos monoméricos ou poliméricos tais como ácido poliglutâmico ou polilisina.

[0596] Ainda outro adjuvante exemplar é um oligonucleotídeo imunoestimulatório tais como um oligonucleotídeo CpG (veja, por exemplo, WO 1998/040100, WO2010/067262), ou uma saponina e um oligonucleotídeo imunoestimulatório, tais como um oligonucleotídeo CpG (veja, por exemplo, WO 00/062800). Em uma modalidade preferida, o adjuvante é um oligonucleotídeo CpG, o mais preferencialmente um oligodeoxinucleotídeos CpG (CpG ODN). Os CpG ODN preferidos são o da Classe B que preferencialmente ativam as células B. Em aspectos da invenção, o CpG ODN tem uma sequência de ácido nucléico 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 48) sendo que * indica uma ligação fosforotioato. O CpG ODN desta sequência é conhecido como CpG 24555, que é descrito no WO2010/067262. Em uma modalidade preferida, o CpG 24555 é usado junto com um sal de hidróxido de alumínio tal como Alhidrogel.

[0597] Uma outra classe de adjuvantes exemplares inclui adjuvantes de saponina, tais como Stimulon™ (QS-21, que é um glicosídeo triterpeno ou saponina, Aquila, Framingham, Mass.) ou partículas geradas dali tais como ISCOMs (complexos de estimulação imune) e adjuvante ISCOMATRIX ®. Portanto, as composições da presente invenção podem ser entregues na forma de ISCOMs, ISCOMS contendo CTB, lipossomas ou encapsulados em compostos tais como acrilatos ou poli(DL-lactideo-co-glicosideo) para formar microesferas de um tamanho adequado para absorção. Tipicamente, o termo "ISCOM" refere-se a complexos imunogênicos formados entre glicosídeos, tais como saponinas triterpenoide (particularmente Quil A), e antígenos que contém uma região hidrofóbica. Em uma

modalidade preferida, o adjuvante é um adjuvante ISCOMATRIX.

[0598] Outros exemplos de adjuvantes incluem RC-529, GM-CSF e Adjuvante de Freund Completo (CFA) e Adjuvante de Freund Incompleto (IFA).

[0599] Ainda outra classe de adjuvantes exemplares é um glicolípido análogo incluindo N-glicosilamidas, N-glicosilureas e N-glicosilcarbamatos, cada um dos quais é substituído no resíduo de açúcar por um aminoácido.

[0600] Opcionalmente, a composição farmacêutica inclui dois ou três adjuvantes diferentes. As combinações preferidas de adjuvantes incluem qualquer combinação de adjuvantes incluindo, por exemplo, pelo menos os seguintes adjuvantes: alum, MPL, QS-21, ISCOMATRIX, CpG, e Alhidrogel. Uma combinação exemplar de adjuvantes inclui uma combinação de CpG e Alhidrogel.

[0601] Alternativamente, em uma modalidade, a composição é administrada ao mamífero na ausência de um adjuvante.

[0602] As composições descritas aqui podem ser administradas por qualquer rota de administração, tais como, por exemplo, rotas parenteral, tópico, intravenoso, mucosal, oral, subcutâneo, intraarterial, intracranial, intratecal, intraperitoneal, intranasal, intramuscular, intradermal, infusão, retal, e/ou transdermal para aplicações terapêuticas e/ou profiláticas. Em uma modalidade preferida, a rota de administração de uma composição é parenteral, mais preferencialmente, administração intramuscular. A administração intramuscular típica é realizada nos músculos do braço ou das pernas.

[0603] As composições descritas aqui podem ser administradas em combinação com terapias que são pelo menos eficazes parcialmente na prevenção e/ou tratamento da infecção por *C. difficile*. Por exemplo, uma composição da invenção pode ser administrada antes, simultaneamente com, ou após a bioterapia; terapia probiótica;

implantes de fezes; imunoterapia (tais como imunoglobulina intravenosa); e/ou um padrão aceitado de cuidado para o tratamento com antibiótico de doença associada ao *C. difficile* (CDAD), tais como metronidazolo e/ou vancomicina.

[0604] Uma composição da presente invenção referindo-se a toxina A e a toxina B pode ser administrada a um mamífero em qualquer combinação. Por exemplo, uma composição imunogênica incluindo um *C. difficile* TcdA mutante pode ser administrado a um mamífero antes, simultaneamente com, ou após a administração de uma composição imunogênica incluindo um *C. difficile* TcdB mutante. Por outro lado, uma composição imunogênica incluindo um *C. difficile* TcdB mutante pode ser administrada a um mamífero antes, simultaneamente com, ou após a administração de uma composição imunogênica incluindo um *C. difficile* TcdA mutante.

[0605] Em outra modalidade, uma composição incluindo um anticorpo antitoxina A ou fragmento de ligação dos mesmos pode ser administrada a um mamífero antes, simultaneamente com, ou após a administração de uma composição incluindo um anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação dos mesmos. Por outro lado, uma composição incluindo um anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação dos mesmos pode ser administrada a um mamífero antes, simultaneamente com, ou após a administração de uma composição incluindo um anticorpo antitoxina A ou fragmento de ligação dos mesmos.

[0606] Em uma outra modalidade, uma composição da presente invenção pode ser administrada a um mamífero antes, simultaneamente com, ou após a administração de um carregador aceitável farmacologicamente. Por exemplo, um adjuvante pode ser administrado antes, simultaneamente com, ou após a administração de uma composição incluindo uma toxina *C. difficile* mutante. Portanto,

uma composição da presente invenção e um carregador aceitável farmaceuticamente podem ser embalados no mesmo frasco ou podem ser embalados em frascos separados e misturados antes do uso. As composições podem ser formuladas para uma dose única de administração e/ou uma dose múltipla de administração.

MÉTODOS PARA PROTEGER E/OU TRATAR INFECÇÕES POR *C. DIFFICILE* EM UM MAMÍFERO

[0607] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método de induzir uma resposta imune a uma toxina de *C. difficile* em um mamífero. O método inclui administrar uma quantidade eficaz de uma composição descrita aqui a um mamífero. Por exemplo, o método pode incluir administrar uma quantidade eficaz para gerar uma resposta imune para a toxina de *C. difficile* no mamífero.

[0608] Em uma modalidade exemplar, a invenção refere-se a um método de induzir uma resposta imune para uma toxina de *C. difficile* TcdA em um mamífero. O método inclui administrar uma quantidade eficaz de uma composição imunogênica que inclui um *C. difficile* TcdA mutante a um mamífero. Em outra modalidade exemplar, a invenção refere-se a um método de induzir uma resposta imune para um *C. difficile* TcdB em um mamífero. O método inclui administrar uma quantidade eficaz de uma composição imunogênica que inclui um *C. difficile* TcdB mutante a um mamífero.

[0609] Em uma outra modalidade, o método inclui administrar uma quantidade eficaz de uma composição imunogênica que inclui um *C. difficile* TcdA mutante e uma quantidade eficaz de uma composição imunogênica que inclui um *C. difficile* TcdB mutante a um mamífero. Em aspectos adicionais, as composições descritas aqui podem ser usadas para tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir a ocorrência de, e/ou retardar o início de uma infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição,

sintomas, e/ou complicação do mesmo em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada. O método inclui administrar uma quantidade eficaz de uma composição a um mamífero.

[0610] Três síndromes clínicas causadas pela infecção por *C. difficile* são reconhecidas, com base na gravidade da infecção. A forma mais grave é a colite pseudomembranosa (PMC), que é caracterizada por uma diarreia profunda, dor abdominal, sinais sistêmicos de doença, e uma aparência endoscópica distintiva do cólon.

[0611] A colite associada a antibióticos (AAC) também é caracterizada por uma diarreia profusa, dor abdominal e sensibilidade, sinais sistêmicos (por exemplo, febre), e leucocitose. Dano intestinal em AAC é menos grave do que em PMC, a aparência endoscópica característica do cólon em PMC é ausente, e a mortalidade é baixa.

[0612] Finalmente, a diarreia associada a antibiótico (AAD, que também é conhecida como diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) é uma síndrome suave relativamente, e é caracterizada por uma diarreia suave a moderada, carecendo de ambas as inflamações de intestino grosso (como caracterizado por, por exemplo, dor abdominal e sensibilidade) e sinais sistêmicos de infecção (por exemplo, febre).

[0613] As três síndromes distintas tipicamente ocorrem em uma ordem crescente de frequência. Isto é, PMC tipicamente ocorre menos frequentemente do que AAC, e AAD é tipicamente a apresentação clínica mais frequente da doença por *C. difficile*.

[0614] Uma complicação frequente de infecção por *C. difficile* é uma doença periódica ou recorrente, que ocorre em até 20% de todos os sujeitos que se recuperam da doença de *C. difficile*. A recaída pode ser caracterizada clinicamente como AAD, AAC, ou PMC. Os pacientes que recaíram uma ou mais vezes são mais prováveis de recair novamente.

[0615] Como usado aqui, as condições de infecção por um *C. difficile* incluem, por exemplo, uma infecção suave, suave-a-moderada, moderada, e grave por *C. difficile*. Uma condição de infecção por *C. difficile* pode variar dependendo da presença e/ou gravidade dos sintomas da infecção.

[0616] Os sintomas de uma infecção por *C. difficile* podem incluir sintomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos e/ou comportamentais tais como, por exemplo, diarreia; colite; colite com cólicas, febre, leucócitos fecais e inflamação na biópsia colonica; colite pseudomembranosa; hipoalbuminemia; anasarca; leucocitose; sepse; dor abdominal; assintomáticos; e/ou complicações e fenótipos patológicos presentes durante o desenvolvimento da invenção, e combinações dos mesmos, etc. Portanto, por exemplo, a administração de uma quantidade eficaz das composições descritas aqui pode, por exemplo tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir a ocorrência de, e/ou retardar o início da diarreia, dor abdominal, cólicas, febre, inflamação na biópsia colonica; hipoalbuminemia; anasarca; leucocitose; sepse; assintomáticos, etc., quando comparado a um mamífero ao qual a composição não foi administrada.

[0617] Os fatores de risco de uma infecção por *C. difficile* podem incluir, por exemplo, uso presente ou no futuro imediato de antimicrobianos (qualquer agente antimicrobiano com um espectro antimicrobiano e/ou atividade contra uma bactéria anaeróbica são abrangidos, incluindo, por exemplo, antibióticos que causam ruptura de uma microbiota colonica normal, por exemplo, clindamicina, cefalosporinas, metronidazolo, vancomicina, fluoroquinolonas (incluindo levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina, e ciprofloxacina), linezolida, etc.); retirada no presente ou futuro imediato de metronidazolo ou vancomicina prescrita; admissão no presente ou

futuro imediato a uma unidade de saúde (tais como um hospital, unidade de saúde crônica, etc.) e trabalhadores de saúde; tratamento presente ou no futuro imediato com inibidores de bomba de prótons, antagonistas H₂, e/ou metotrexato, ou uma combinação do mesmo; presente ou risco de doenças gastrointestinais, tais como doença inflamatória do intestino; passado, presente ou futuro imediato de cirurgia gastrointestinal ou procedimento gastrointestinal em um mamífero; recorrência passada ou presente de uma infecção por *C. difficile* e/ou um CDAD, por exemplo, pacientes que tiveram uma infecção por *C. difficile* e/ou um CDAD uma vez ou mais de duas vezes; e humanos com idade de pelo menos cerca de 65 ou mais.

[0618] Nos métodos descritos aqui, o mamífero pode ser um animal tais como, por exemplo, camundongo, ramisters, primatas, e humanos. Em uma modalidade preferida, o mamífero é um humano. De acordo com a presente invenção, o humano pode incluir indivíduos que tenham exibido uma infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo; indivíduos que tenham exibido recentemente uma infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo; e indivíduos que estão em risco de infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo.

[0619] Os exemplos de indivíduos que tem mostrado os sintomas de infecção por *C. difficile* incluem indivíduos que mostraram ou estão mostrando os sintomas descritos acima; indivíduos que tenham tido ou estão tendo uma infecção por *C. difficile* e/ou uma doença associada a *C. difficile* (CDAD); e indivíduos que tenham uma recorrência de uma infecção por *C. difficile* e/ou CDAD.

[0620] Os exemplos de pacientes que estão em risco de infecção por *C. difficile* incluem indivíduos em risco de ou que estão atualmente

passando por um uso de antimicrobiano planejado; indivíduos em risco de ou que estão atualmente passando por uma retirada do metronidazolo ou vancomicina prescrito; indivíduos que estão em risco de ou estão atualmente passando por uma admissão planejada por uma unidade de saúde (tais como um hospital, unidade de cuidado crônico, etc.) e trabalhadores de saúde; e/ou indivíduos em risco de ou que estão atualmente passando por um tratamento planejado com inibidores de bomba de prótons, antagonistas H2, e/ou metotrexato, ou uma combinação dos mesmos; indivíduos que tenham tido ou estejam passando por doenças gastrointestinais, tais como doença inflamatória do intestino; indivíduos que tenham tido ou que estejam passando por cirurgia gastrointestinal ou procedimentos gastrointestinais; e indivíduos que tenham tido ou estão tendo uma recaída de uma infecção por *C. difficile* e/ou um CDAD, por exemplo, pacientes que tenham tido uma infecção por *C. difficile* e/ou um CDAD uma vez ou mais do que uma vez; indivíduos que tem cerca de 65 anos ou mais. Tais pacientes em risco podem ou não podem estar atualmente mostrando os sintomas de uma infecção por *C. difficile*.

[0621] Em pacientes assintomáticos, a profilaxia e/ou o tratamento pode começar em qualquer idade (por exemplo, em cerca de 10, 20, ou 30 anos de idade). Em uma modalidade, entretanto, não é necessário começar o tratamento até que o paciente alcance pelo menos cerca de 45, 55, 65, 75, ou 85 anos de idade. Por exemplo, as composições descritas aqui podem ser administradas a um humano assintomático que tenha a idade de 50-85 anos.

[0622] Em uma modalidade, o método para prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir as ocorrências de, e/ou retardar o início de uma infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo em um mamífero inclui administrar uma quantidade eficaz de uma

composição descrita aqui a um mamífero em necessidade do mesmo, um mamífero em risco de, e/ou um mamífero suscetível a uma infecção por *C. difficile*. Uma quantidade eficaz inclui, por exemplo, uma quantidade suficiente para prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir as ocorrências de, e/ou retardar o início de uma infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual uma composição não é administrada. A administração de uma quantidade eficaz das composições descritas aqui podem, por exemplo, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir as ocorrências de, e/ou retardar o início de uma diarreia; dor abdominal, cólica, febre, inflamação na biópsia colônica; hipoalbuminemia; anasarca; leucocitose; sepse; e/ou assintomáticos, etc., quando comparado a um mamífero ao qual uma composição não foi administrada. Em uma modalidade preferida, o método inclui administrar uma quantidade eficaz de uma composição imunogênica descrita aqui para um mamífero em necessidade do mesmo, o mamífero em risco de, e/ou o mamífero suscetível a uma infecção por *C. difficile*.

[0623] Em uma modalidade adicional, o método para tratar, diminuir a gravidade de, e/ou retardar o início de uma infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo em um mamífero inclui administrar uma quantidade eficaz de uma composição descrita aqui a um mamífero suspeito de, ou sofrendo atualmente de uma infecção por *C. difficile*. Uma quantidade eficaz inclui, por exemplo, uma quantidade suficiente para tratar, diminuir a gravidade de, e/ou retardar o início de uma infecção por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, condição, sintoma, e/ou complicação do mesmo, em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é

administrada.

[0624] A administração de uma quantidade eficaz de uma composição pode melhorar pelo menos um sinal ou sintoma de infecção por *C. difficile* no sujeito, tais como aquelas descritas abaixo. A administração de uma quantidade eficaz das composições descritas aqui pode, por exemplo, diminuir a gravidade de e/ou diminuir a ocorrência de diarreia; diminuir a gravidade de e/ou diminuir a ocorrência de dor abdominal, cólica, febre, inflamação na biópsia colônica; hipoalbuminemia; anasarca; leucocitose; sepse; e/ou assintomáticos, etc., quando comparado a um mamífero ao qual a composição não foi administrada. Opcionalmente, a presença de sintomas, sinais e/ou fatores de risco de uma infecção é determinado antes de iniciar o tratamento. Em uma modalidade preferida, o método inclui administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo e/ou fragmento de ligação dos mesmos descrito aqui a um mamífero suspeito de, ou sofrendo atualmente de uma infecção por *C. difficile*.

[0625] Portanto, uma quantidade eficaz de uma composição refere-se a uma quantidade suficiente para alcançar um efeito desejado (por exemplo, um efeito terapêutico e/ou profilático) nos métodos da presente invenção. Por exemplo, a quantidade de um imunógeno para a administração pode variar de um mínimo de cerca de 1 µg, 5 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg, ou 1 mg a um máximo de cerca de 2 mg, 1 mg, 500 µg, 200 µg por injeção. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma média compatível. Tipicamente cerca de 10, 20, 50 ou 100 µg por imunógeno é usado para cada injeção humana.

[0626] A quantidade de uma composição da invenção administrada ao sujeito pode depender do tipo e da gravidade da infecção e/ou das características do indivíduo, tais como saúde geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância a drogas. Também depende do

grau, gravidade e tipo da doença. Uma quantidade eficaz também pode variar dependendo de fatores, tais como rota de administração, local alvo, estado fisiológico do paciente, se o paciente é humano ou um animal, outras terapias administradas, e se o tratamento é profilático ou terapêutico. O perito será capaz de determinar as quantidades apropriadas dependendo destes outros fatores.

[0627] Uma quantidade eficaz pode incluir uma dose eficaz ou doses múltiplas eficazes (tais como, por exemplo, 2, 3, 4 doses, ou mais) para uso nos métodos aqui. As dosagens eficazes podem necessitar ser tituladas para otimizar a segurança e a eficácia.

[0628] Uma combinação de quantidade e frequência de dose adequada para realizar o uso terapêutico e/ou profilático é definido como um regime eficaz terapeuticamente ou profilaticamente. Em um regime terapêutico e/ou profilático, a composição é tipicamente administrada em mais do que uma dosagem até que uma resposta imune suficiente tenha sido alcançada. Tipicamente, a resposta imune é monitorada e as dosagens repetidas são dadas se a resposta imune começa a diminuir.

[0629] As composições podem ser administradas em dosagens múltiplas por um período de tempo. O tratamento pode ser monitorado ensaiando um anticorpo, ou respostas de célula T ou célula B ativada para um agente terapêutico (por exemplo, uma composição imunogênica incluindo uma toxina *C. difficile* mutante) ao longo do tempo. Se a resposta cai, uma dosagem de reforço é indicada.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *C. DIFFICILE* DE TOXINA NEGATIVA

[0630] Para identificar as cepas de *C. difficile* carentes de do gene de toxina (A e B) e expressão de toxina, 13 cepas de *C. difficile* foram testadas. O meio de cultura de 13 cepas de *C. difficile* forma testadas

por ELISA para a toxina A. Sete cepas expressaram a toxina A: *C. difficile* 14797-2, *C. difficile* 630, *C. difficile* BDMS, *C. difficile* W1194, *C. difficile* 870, *C. difficile* 1253, e *C. difficile* 2149. Veja figura 3.

[0631] Seis cepas não expressaram a toxina A e careceram de um local de patogenicidade inteiro: *C. difficile* 1351 (ATCC 43593™), *C. difficile* 3232 (ATCC BAA-1801™), *C. difficile* 7322 (ATCC 43601™), *C. difficile* 5036 (ATCC 43603™), *C. difficile* 4811 (ATCC 3602™), e *C. difficile* VPI 11186 (ATCC 700057™). O VPI 11186 foi selecionado com base em sua eficácia para assumir o plasmídeo de DNA por conjugação.

[0632] As mesmas 13 cepas foram testadas em um ensaio PCR múltiplo usando primários fora do local de patogenicidade (PaLoc; Braun et al., *Gene*. 1996 Nov 28;181(1-2):29-38.). Os resultados PCR demonstraram que o DNA de 6 cepas negativas de toxina A por ELISA não amplificaram quaisquer genes do PaLoc (*tcdA-tcdE*). As sequências flanqueando PaLoc (*cdd3* e *cdu2*) foram apresentadas (dados não mostrados).

EXEMPLO 2: INATIVAÇÃO DO CAMINHO DE ESPORULAÇÃO EM *C. DIFFICILE* VPI11186

[0633] Batendo para a função de formação de esporo da produção de cepa *C. difficile* facilita a fermentação em larga escala em um ambiente de fabricação seguro. O sistema ClosTron foi usado para criar uma cepa de *C. difficile* asporogênica. Veja Heap et al., *J Microbiol Methods*. Julho 2009; 78(1):79-85. O Sistema ClosTron permite a inativação dos genes almeçados com um grupo II de intron para o local direcionado de inativação insercional de um gene clostridial *spo0A1*. A cepa de produção de toxina-negativa VPI11186 foi submetido a inativação de esporulação pela tecnologia ClosTron. Os mutantes resistentes a eritromicina foram selecionados e a presença do cassete insercional foi confirmado por PCR (não

mostrado). A incapacidade de dois clones independentes para formar os esporos foi confirmada.

EXEMPLO 3: MODIFICAÇÃO GENÉTICA DOS GENES DE TOXINA A E B PARA INATIVAR A FUNÇÃO DE CITOTOXIDADE

[0634] As estruturas de leitura abertas de toxinas mutantes A e B de comprimento completo (ORFs) com base em sequências de genoma de cepa 630Δ foram designadas para uma síntese personalizada na Blue Heron Biotech. Veja, por exemplo, SEQ ID NOs: 9-14. O local ativo para a atividade glucosiltransferase responsável pela toxicidade celular foi alterado por duas substituições alélicas: D285A/D287A (veja SEQ ID NO: 3) para a toxina A, e D286A/D288A (veja SEQ ID NO: 5) para a toxina B. dois nucleotídeos foram mutados em cada códon aspartato (D) para criar o códon para alanina (A). Veja, por exemplo, SEQ ID NOs: 9-14. Além disso, um par de vetores expressando toxinas mutantes carecendo de resíduos de cisteína foi construída seguindo a síntese personalizada na Blue Heron Biotech. Sete resíduos de cisteína de toxina A mutante e 9 resíduos de cisteína de toxina B mutante forma substituídas por alanina. As substituições incluem cisteínas catalíticas da protease autocatalítica de toxina A e B. também as mutações silenciosas foram introduzidas onde necessário para eliminar os locais de enzima de restrição usados para a construção de vetor.

EXEMPLO 4: VETOR DE EXPRESSÃO pMTL84121fdx

[0635] O vetor correspondente ao plasmídeo usado para a expressão de antígeno de toxina mutante *C. difficile* foi selecionado a partir do sistema modulare série pMTL8000 desenvolvido pela Minton lab (veja Heap et al., *J Microbiol Methods*. Julho 2009; 78(1):79-85). O vetor escolhido pMTL84121fdx contém o plasmídeo *C. difficile* pCD6 Gram+ replicon, o marcador *catP* (cloranfenicol/ tianfenicol) selecionável, o p15a Gram- replicon e a função *tra*, e o promotor de

ferredoxina *C. sporogenes* (*fdx*) e um local de clonagem múltipla distal (MCS). Os dados empíricos sugeriram que um número de cópias baixas p15a replicon conferiram uma estabilidade maior em *E. coli* do que no ColE1 alternativo. O promotor *fdx* foi selecionado uma vez que este rendeu uma expressão maior do que os outros promotores testados nos experimentos com construções de repórter CAT (por exemplo, *tcdA*, *tcdB*; ou heterólogos *tetR* ou *xylR*) (dados não mostrados).

EXEMPLO 5: CLONANDO OS ORFS DE TOXINA MODIFICADA EM pMTL84121*fdx*

[0636] As estruturas de leitura abertas de toxina mutante A e B de comprimento completo (ORFs) com base nas sequências de genoma da cepa 630Δ foram subclonadas usando um vetor pMTL84121*fdx* de locais de clonagem múltipla *NdeI* e *BglII* usando técnicas de biologia molecular padrão. Para facilitar a clonagem, os ORFs foram flanqueados por um local *NdeI* proximal contendo um códon inicial e um local *BglII* apenas abaixo do códon parado.

EXEMPLO 6: LOCAL DE MUTAGÊNESE DIRECIONADA AO TcdA PARA CRIAR UM MUTANTE TRIPLO

[0637] O resíduo de cisteína catatítico do domínio de protease autocatalítico foi substituído (isto é, C700A para TcdA e C698A para TcdB) na SEQ ID NOs: 3 e 5, isto é, em cada um dos “mutantes duplos.” Para a mutagênese da toxina mutante A, um fragmento de 2,48kb *NdeI*-*HindIII* do plasmídeo de expressão de TcdA D285A/D287A foi subclonado em pUC19 (cortado com o mesmo) e a mutagênese direcionada ao local foi realizada neste template. Uma vez que os novos alelos foram confirmados pela análise de sequência de DNA, os fragmentos *NdeI*-*HindIII* modificados foram reintroduzidos no vetor de expressão pMTL84121*fdx* para criar os “mutantes triplos,” isto é, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6.

EXEMPLO 7: MUTAGÊNESE DIRECIONADA AO LOCAL DO TcdB PARA CRIAR UM MUTANTE TRIPLO

[0638] Para a mutagênese de uma toxina mutante B, um fragmento de 3,29 kb *NdeI-EcoNI* de um plasmídeo de toxina mutante B foi modificado e reintroduzido como o local *EcoNI* não está presente nos vetores de clonagem disponíveis um fragmento 3,5kb *NdeI-EcoRV* levemente maior foi subclonado em pUC19 (preparado com *NdeI-SmaI*). Após a mutagênese, o fragmento 3,3kb *NdeI-EcoNI* interno modificado foi extirpado e usado para substituir o fragmento pMTL84121*fdx* de vetor de expressão de toxina mutante B correspondente. Como a eficácia da clonagem desta estratégia direcional foi considerada um pouco baixa, uma estratégia alternativa para introduzir o alelo C698A envolvendo a substituição de um 1,5 kb *DraIII* foi tentada em paralelo. Ambas as estratégias independentemente renderam os recombinants desejados.

EXEMPLO 8: CRIAR VARIANTES DE TOXINA MUTANTE ADICIONAL POR MUTAGÊNESE DIRECIONADA AO LOCAL

[0639] Pelo menos doze variants de toxina mutante de *C. difficile* diferentes foram construídas. As substituições alélicas foram introduzidas nos fragmentos de gene de toxina mutante N-terminal foram construídas. As substituições alélicas foram introduzidas nos fragmentos de gene de toxina mutante N-terminal por mutagênese direcionada ao local (Quickchange® kit). As toxinas recombinantes também foram projetadas como controles de referência para avaliar a capacidade deste sistema com base em plasmídeo de gerar um equivalente quantitativo de proteína em uma atividade biológica para toxinas nativas purificadas a partir de cepas de *C. difficile* do tipo selvagem. Neste caso, as substituições alélicas foram introduzidas para reverter as substituições por glucosiltransferase originais. Além disso, um par de vetores de toxina mutante sem cisteína foi construído

seguindo a síntese personalizada na Blue Heron Biotech.

[0640] As doze variantes de toxina incluem (1) uma toxina de *C. difficile* mutante A tendo uma mutação D285A/D287A (SEQ ID NO: 3); (2) uma toxina de *C. difficile* mutante B tendo uma mutação D286A/D288A mutation (SEQ ID NO: 5); (3) uma toxina de *C. difficile* mutante A tendo uma mutação D285A/D287A C700A (SEQ ID NO: 4); (4) uma toxina de *C. difficile* mutante B tendo uma mutação D286A/D288A C698A (SEQ ID NO: 6); (5) uma toxina recombinante A tendo a SEQ ID NO: 1; (6) uma toxina recombinante B tendo a SEQ ID NO: 2; (7) uma toxina de *C. difficile* mutante A tendo uma mutação C700A; (8) uma toxina de *C. difficile* mutante B tendo uma mutação C698A; (9) uma toxina de *C. difficile* mutante A tendo uma mutação C700A C597S, C1169S, C1407S, C1623S, C2023S, e C2236S; (10) uma toxina de *C. difficile* mutante B tendo uma mutação C698A C395S, C595S, C824S, C870S, C1167S, C1625S, C1687S, e C2232S; (11) uma toxina de *C. difficile* mutante A tendo uma mutação D285A, D287A, C700A, D269A, R272A, E460A, e R462A (SEQ ID NO: 7); e (12) uma toxina de *C. difficile* mutante B tendo uma mutação D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A, e C698A (SEQ ID NO: 8)

[0641] As toxinas penta mutantes também foram construídas por mutagênese direcionada ao local e usndo os mesmos materiais e métodos como descrito acima, por exemplo, nos exemplos 1-7. A toxina penta mutante B incluiu as seguintes substituições D286A/D288A C698A/E970K/E976K (SEQ ID NO: 184). A toxina penta mutante B foi expressa nas células VPI 11186 *spo0A*-negativa como descrito acima. Um uso de western blot mAb# B8-26 (SEQ ID NO: 49), que é específico para um epítipo N-terminal epítipo da toxina B, foi feito para confirmar a expressão da toxina penta mutante B. Na segunda, terceira, e quarta linhas a partir da esquerda 50 ng, 30 ng, e

10 ng do mutante triplo B (SEQ ID NO: 86), respectivamente, foram usados como uma proteína de referência. Na quinta e na sexta linhas a partir da esquerda, uma diluição 1:100 e uma diluição 1:1000, respectivamente, do concentrado lisado de célula de toxina penta mutante B foi avaliada. A quantidade estimada de proteína na concentração de toxina penta mutante B é de cerca de 1000 ug/mL. Como mostrado nas manchas, a toxina penta mutante B (concentrada) exibiu uma faixa de proteína de tamanho esperado de cerca de 270 kD.

EXEMPLO 9: ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES

[0642] Os plasmídeos rearranjados foram obtidos com as cepas lab DH5 *E. coli* comumente usadas. Em contraste, as transformações usando hospedeiro de *E.coli* Invitrogen Stbl2™ rendeu recombinantes de toxina mutante de comprimento completo grescendo de vagar após três dias de crescimento a 30°C em placas LB cloranfenicol (25 µg/ml). A eficácia de clonagem menores foram obtidos com as cepas de *E.coli* Stbl3™ e Stbl4™ relacionadas, embora estas linhas foram consideradas estáveis para a manutenção do plasmídeo. Os transformantes foram propagados subsequentemente em uma cultura líquido ou agar sob seleção cloranfenicol a 30°C. Também verificou-se que o uso de meio LB (Miller's) melhora a recuperação e o crescimento de transformantes comparados com o meio com base em triptone-soja livre de animal.

EXEMPLO 10: TRANSFORMAÇÃO DE *C. DIFFICILE* COM GENES DE TOXINA MUTANTE GENÉTICA OU DO TIPO SELVAGEM CODIFICANDO UM pMTL84121fdx

[0643] A transformação de *C. difficile* por transferência de conjugal de *E. coli* foi feita essencialmente como descrito em Heap et al., *Journal of Microbiological Methods*, 2009. 78(1): p. 79-85. O CA434 hospedando *E. coli* foi transformado com genes de toxina mutante

variante ou do tipo selvagem codificando pMTL84121 *fdx*. O hospedeiro CA434 de *E. coli* é o intermediário para imobilizar os plasmídeos de expressão VPI 11186 *spo0A1* nas cepas de produção de *C. difficile*. CA434 é um derivado de *E. coli* HB101. Estas cepas refugiam o plasmídeo conjugativo Tra⁺ Mob⁺ R702 que confere resistência ao Km, Tc, Su, Sm/Spe, e Hg (devido ao Tn1831). As células CA434 eletrocompetentes ou competentes quimicamente foram preparadas e os transformantes de vetor de expressão foram selecionados nas placas Miller's LB CAM a 30°C. As colônias de crescimento menor aparecendo após 3 dias foram retiradas e ampliadas em culturas de cloranfenicol de 3 mL LB até a fase média-longa (~24h, 225 rpm, agitador orbital a 30°C). As culturas de *E. coli* foram colhidas por uma centrifugação em velocidade baixa (5.000g) para evitar quebrar o pelo, e os grânulos de células foram resuspenso gentilmente com uma pipeta de transferência de furo amplo em 1 mL PBS. As células foram concentradas por uma centrifugação de velocidade baixa. A maioria dos PBS foi removida por inversão e os grânulos drenados foram transferidos para uma câmara anaeróbica e resuspenso com 0,2 mL cultura de *C. difficile*, manchado em placas agar BHIS e deixadas para crescer por 8h ou durante a noite. No caso de transformantes de toxina mutante A, os melhores resultados foram alcançados com uma conjugação durante a noite. As manchas de células foram raspadas em 0,5 mL PBS e 0,1 mL foi banhado em um meio de seleção BHIS suplementado com 15 µg/mL tianfenicol (análogo mais potente de cloranfenicol) e D-cicloserina / cefoxitina para matar as células de doadores de *E. coli*. Os transformantes aparecendo após 16-24 h foram purificados por re-estrias em uma placa de BHIS nova (mais suplementos) e as culturas subsequentes foram testadas para a expressão de toxinas recombinantes ou toxinas mutantes. Os glicerois permanentes e o armazenamento de semente foram preparados a partir

de clones mostrando uma boa expressão. Os minipreparados de plasmídeo foram também preparados a partir de culturas de 2 mL usando um kit de procedimento Qiagen modificado em que as células foram pretratadas com lisozima (não essencial). O DNA minipreparado de *C. difficile* foi usado como um template para o sequenciamento de PCR para verificar a integridade do clone. Alternativamente, o DNA maxipreparado de plasmídeo foi preparado a partir de transformantes e sequenciados de *E. coli* Stbl2™ lisozima.

EXEMPLO 11: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *C. DIFFICILE* DA TOXINA MUTANTE B HEPTA (SEQ ID NO: 8) E A MUTANTE TRIPLA A E B (SEQ ID NOS: 4 E 6, RESPECTIVAMENTE)

[0644] Os transformantes foram crescidos tanto em uma cultura de 2 mL (para uma análise de rotina) quanto em frascos tampados na abertura (para experimentos de evolução temporal). As amostras (2 mL) foram centrifugadas rapidamente (10.000 rpm, 30s) para concentrar as células: os sobrenadantes foram decantados e concentrados 10x (Amicon-ultra 30k); os grânulos foram drenados e congelados a -80°C. Os grânulos de células foram descongelados em gelo, resuspenso em 1mL de tampão de lise (Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA, 15% glicerol) e sonificados (1x 20s explosão com micropona). O lisato foi centrifugado a 4°C e o sobrenadante foi concentrado em 5-dobra. As amostras do sobrenadante e o lisato foram combinados com o tampão de amostra e o tratado por calor (10 min, 80°C) antes de carregar nos géis 3-8% Tris-acetato SDS-PAGE duplicados (Invitrogen). Um gel foi colorido com Coomassie, o segundo foi eletrotransferido para a análise de western. Um antissoro de coelho específico de toxina B e específico de toxina A (Fitzgerald; Biodesign) foram usados para detectar as variantes da toxina A e B mutante. A expressão da toxina mutante B hepta (SEQ ID NO: 8) também foi confirmada pela hibridização de western blot.

EXEMPLO 12: REVOGAÇÃO DA ATIVIDADE DE GLUCOSILTRANSFERASE DAS TOXINAS MUTANTES

[0645] As toxinas A e B mutantes duplas genéticas (DM) (SEQ ID NOs: 3 e 5, respectivamente) e as toxinas A e B mutantes triplas (TM) (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) não transferiram ^{14}C -glicose para 10 μg de RhoA, Rac1 e Cdc42 GTPases em ensaios de glicosilação *in vitro* na presença de UDP- ^{14}C -glicose [30 μM], 50 mM HEPES, pH 7,2, 100 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 2 mM MnCl_2 , 1 mM DTT, e 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA. Entretanto, os controles de toxina A e B do tipo selvagem (tendo a SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente) transferiram ^{14}C -glucose para GTPases eficazmente a uma dose baixa de 10 e 1 ng cada (e dados inferiores não mostrados) (Figuras 4A e 4B), mesmo na presença de 100 μg de toxina mutante (Figura 4B) indicando pelo menos 100.000-dobras de redução comparado com as toxinas do tipo selvagem respectivas. Os resultados similares foram detectados para Cdc42 GTPase (dados não mostrados).

[0646] Especificamente, na Fig. 4B, toxina do tipo selvagem A and toxin B (1ng) or toxina mutante tripla A and toxina mutante tripla B (100 μg) foram incubadas com RhoA GTPase na presença de UDP- ^{14}C -glicose por 2 hr a 30°C. Como ilustrado, 1 ng do TcdA e TcdB do tipo selvagem transferiram ^{14}C -glicose para RhoA, mas 100 μg de toxina mutante tripla A e toxina mutante tripla B não. Quando 1 ng de TcdA ou TcdB do tipo selvagem foi cravada na reação com 100 μg de toxina mutante tripla A ou toxina mutante tripla B respectiva, a glicosilação de RhoA foi detectada, indicando a ausência de inibidores de glicosilação. A sensibilidade da detecção para a atividade de glicosilação foi estabelecida para ser 1 ng de toxina do tipo selvagem em um antecedente de 100 μg de toxina mutante (proporção de 1:100.000). Os resultados mostram que as mutações no local ativo de glucosiltransferase na toxina mutante tripla A e na toxina mutante tripla B reduziu qualquer (menos do que 100.000-dobra atividade menor

comparado a atividade das toxinas do tipo selvagem respectivas) atividade glucosiltransferase mensurável. Um ensaio similar também foi realizado para quantificar a atividade glucosiltransferase por precipitação de TCA do GTPases glicosilado.

EXEMPLO 13: REVOGAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASE DE CISTEÍNA AUTO-CATALÍTICA

[0647] A função de clivagem auto-catalítica foi revogada nos mutantes genéticos triplos A e B (TM) (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) quando o local de protease de cisteína foi mutado. Como ilustrado na Figura 5, as toxinas do tipo selvagem (*wt*) A e B (SEQ ID NOs: 3 e 5, respectivamente) são clivadas na presença de inositol-6-fosfato. As toxinas mutantes duplas A e B (SEQ ID NOs: 3 e 5, respectivamente) também são clivadas na presença de inositol-6-fosfato (dados não mostrados), similar a aquele para o tipo selvagem. A toxina A (SEQ ID NO: 3) é clivada a partir de 308 kDa em 2 fragmentos de 245 e 60 kDa. A toxina B (SEQ ID NO: 5) é clivada a partir de 270 kDa em dois fragmentos de 207 e 63 kDa. Os mutantes genéticos triplos A e B (TM) (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) permanecem não afetados a 308 e 270 kDa respectivamente, mesmo na presença de inositol-6-fosfato. Veja figura 5. Portanto, the atividade de protease de cisteína foi inativada pela modificação genética.

[0648] Mais especificamente, na figura 5, um µg de um mutante triplo A e um mutante triplo B foram incubadas por 90 minutos em temperatura ambiente ($21 \pm 5^{\circ}\text{C}$) em paralelo com um TcdA e TcdB do tipo selvagem da List Biologicals. A reação de clivagem foi realizada em 20 µL volume em Tris-HCl, pH 7,5, 2mM DTT na presença ou ausência de inositol-6-fosfato (10mM para TcdA e 0,1 mM para Tcd B). O volume inteiro da reação foi então carregado em um 3 -8% SDS/PAGE; as faixas de proteína foram visualizadas por uma coloração prata. Como ilustrado, *wt* Tcd A e TcdB foram clivadas em

duas faixas de proteínas de 245kD e 60kD e 207kD e 63 kD, respectivamente, na presença de inositol-6-fosfato. A toxina mutante tripla A e a toxina mutante tripla B não foram clivadas, confirmando assim a mutação C700A na toxina mutante tripla A e a mutação C698A toxina mutante tripla B bloquearam a clivagem.

EXEMPLO 14: CITOTOXICIDADE RESIDUAL DAS TOXINAS MUTANTES TRIPLAS A E B (SEQ ID NOS: 4 E 6, RESPECTIVAMENTE)

[0649] As toxinas mutantes genéticas foram avaliadas para sua citotoxicidade por um ensaio de citotoxicidade *in vitro* citotoxicidade em células IMR90, uma linha de célula de fibroblasto deplóide humano. Estas células são sensíveis a ambas as toxinas A e B. Como uma modalidade alternativa, as células de rim Vero de *Cercopithecus aethiops* podem ser usadas no ensaio de citotoxicidade uma vez que foram observados por ter sensibilidades razoáveis para a toxina A e B. Preferencialmente, as células de adenocarcinoma colorretal humano HT-29 não são usadas no ensaio de citotoxicidade porque elas têm mostrado uma sensibilidade significativamente diminuída para as toxinas, quando comparado as linhas de células Vero e IMR90. Veja, por exemplo, Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Sensitividades da linha de célula para as toxinas A e B*				
Linha de célula	Toxina 50 µg/ml	Célula/poço	EC ₅₀ (pg/ml)	
			48 horas	72 horas
Vero (ATCC CCL-81™)	A	10000	1816	244
	B	10000	62	29
IMR90 (ATCC CCL-186™)	A	10000	1329	1152
	B	10000	14	13
HT-29 (ATCC HTB-38™)	A	10000	>1E6	>1E6
	B	10000	11089	53313
*ensaio de citotoxicidade In vitro foi realizado medindo o ATP celular usando um substrato a base de luciferase, CellTítulo-Glo® (Promega, Madison, WI)				

[0650] As amostras de toxina *wt* ou toxina mutante genética diluída serialmente foram adicionadas ao crescimento de monocamadas celulares em placas de cultura de tecido de 96 poços. Após a incubação a 37°C por 72h, as placas foram avaliadas para células ativas metabolicamente medindo os níveis de ATP celular pela adição de um reagente CellTítuloGlo® com base de luciferase (Promega, Madison, WI) gerando luminescência expressa como unidades de luminescência relativas (RLUs). Os RLUs altos mostram que as células são viáveis, os RLUs baixos mostram que as células não são metabolicamente ativas e são coloridas. O nível de citotoxicidade, expresso como EC₅₀, é definido como a quantidade de toxina *wt* ou toxina mutante genética que provoca uma redução de 50% no RLUs comparado a níveis de controle de cultura em células (os detalhes deste ensaio são proporcionados abaixo). Como mostrado na Figura 6, a Tabela 7A, e Tabela 8A, os valores de EC₅₀ de TcdA e TcdB foram cerca de 0,92 ng/mL e 0,009 ng/mL, respectivamente. Os valores de EC₅₀ da toxina mutante tripla A e da toxina mutante tripla B foram cerca de 8600 ng/mL e 74 ng/mL, respectivamente. Apesar de uma redução de aproximadamente 10,000-dobra na citotoxicidade relative as toxinas *wt*, ambas toxinas mutantes genéticas ainda demonstram níveis residuais baixos de citotoxicidade. Esta citotoxicidade residual poderia ser bloqueada neutralizando os anticorpos monoclonais antitoxina indicando que foi específico para as toxinas mutantes triplas, mas não provavelmente relacionada às atividades enzimáticas conhecidas das toxinas *wt* (glicosilação ou autoproteólise).

[0651] Ambas as toxinas *wt* exibem uma citotoxicidade potente *in vitro*, com pequenas quantidades das toxinas sendo suficientes para ausar vários efeitos nas células de mamíferos tais como o arredondamento da célula (efeito citopático ou CPE) e carência de atividade metabólica (como medido pelos níveis ATP). Consequentemente, dois ensaios *in vitro* (um ensaio CPE ou de arredondamento de célula e um ensaio ATP)

tem sido desenvolvido para verificar que nenhuma citotoxicidade residual permanence nas substâncias de drogas de toxina mutante. Os resultados são expressos como EC_{50} , que é a quantidade de toxina ou toxina mutante que causa 1) 50% das células para desenvolver CPE ou 2) 50% de redução nos níveis de níveis de ATP como medido em unidades de luz relativas.

[0652] No ensaio CPE, uma amostra de substância de droga é diluída serialmente e incubada com células IMR90, que são observadas para um efeito citopático potencial. O ensaio CPE é pontuado em uma escala de 0 (células normais) a 4 (~100 % arredondamento de célula) e uma pontuação de 2 (~50% arredondamento da célula) é definido como valor de EC_{50} da amostra teste. Este método é usado para testar uma substância de droga de toxina mutante na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que é a concentração máxima tolerável que pode ser testada neste ensaio sem interferência da matriz. Consequentemente, nenhuma citotoxicidade detectável é reportada como $EC_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$.

[0653] O Ensaio ATP é com base na medição da quantidade de sinal de luminescência gerado a partir de ATP, que é proporcional ao número das células ativas metabolicamente. A concentração máxima tolerável que pode ser testada sem o ensaio interferente sem ensaio ou interferência é de cerca de 200 de concentração máxima 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Portanto, a citotoxicidade neste ensaio é reportada como $EC_{50} > 200 \mu\text{g}/\text{ML}$.

[0654] As concentrações diferentes de toxina mutante A e B foram adicionadas as células em paralelo com os controles de toxina paralelos. Os pontos finais do ensaio de viabilidade determinado pelos níveis celulares usando o CellTítulo-Glo® (Promega). O grau de luminescência é proporcional aos níveis de ATP ou número de células viáveis.

[0655] A citotoxicidade *in vitro* (EC₅₀) da toxina A (wt) do tipo selvagem foi 920 pg/mL e 9 pg/mL para a toxina B. A citotoxicidade *in vitro* (EC₅₀) de uma toxina mutante A (SEQ ID NO: 4) foi 8600 ng/mL e 74 ng/mL para toxina mutante B (SEQ ID NO: 6). Embora estes valores representem reduções de 9348 e 8222-dobra, respectivamente, a citotoxicidade residual foi detectada em ambas as toxinas mutantes.

[0656] Em outras palavras, a citotoxicidade das toxinas mutantes triplas A e B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) foi reduzida significativamente no ensaio de *citotoxicidade in vitro* em células IMR-90 relativas a uma citotoxicidade das toxinas wt A e B (SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente). Como ilustrado na Figura 6, embora ambas as toxinas mutantes triplas exibiram uma redução significativa na citotoxicidade (10⁴ dobra) relativa a toxina wt, a citotoxicidade residual foi observada em altas concentrações de ambas as toxinas mutantes triplas.

[0657] Além disso, a citotoxicidade residual de cada toxina mutante tripla poderia ser completamente neutralizada (por exemplo, pelo menos 6-8 log₁₀ de redução na toxicidade, relativo a toxicidade da toxina do tipo selvagem) pelos anticorpos específicos de toxina. Veja Exemplo 16, abaixo.

[0658] Os ensaios de cultura de célula são mais sensíveis para a detecção de citotoxicidade do que os modelos de animal *in vivo*. Quando entregue tanto por rotas i.p. quanto i.v no modelo de desafio letal de camundongo, o TcdA wt tem um LD₅₀ de ~50 ng por camundongo enquanto que o TcdB wt é mais potente com um LD₅₀ de ~5 ng por camundongo. Em contraste, a cultura de células com base nos ensaios *in vitro* descritos acima tem valores EC₅₀ de 100 pg por poço para TcdA wt e 2 pg por poço para TcdB wt.

EXEMPLO 15: A CITOTOXICIDADE RESIDUAL DA TOXINA HEPTA MUTANTE B GENÉTICA (SEQ ID NO: 8), E A CITOTOXICIDADE DA

TOXINA PENTA MUTANTE B (SEQ ID NO: 184)

[0659] Como ilustrado na Figura 7, os valores de EC₅₀ são similares para a toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6) (20,78 ng/mL) e a toxina hepta mutante B (SEQ ID NO: 8) (35,9 ng/mL) os mutantes indicando que as quatro mutações adicionais para ainda modificar o local ativo por glucosiltransferase e o local de ligação ao substrato GTPase ainda não reduziu a citotoxicidade da toxina mutante genética. Os valores de EC₅₀ também foram similares para a toxina mutante dupla B (SEQ ID NO: 5) como elas são para as toxinas heptas mutantes e triplas (dados não mostrados). Esta observação sugere que o mecanismo para a citotoxicidade das toxinas mutantes é surpreendentemente independente do mecanismo de reconhecimento de substrato e glucosiltransferase.

[0660] A toxina penta mutante B (SEQ ID NO: 184) foi avaliada para sua citotoxicidade por um ensaio de citotoxicidade ATP in vitro em células IMR90, como descrito acima. Veja, por exemplo, Exemplo 14. Como mostrado na Figura 26, a citotoxicidade da toxina penta mutante B foi bastante reduzida, quando comparado a toxina do tipo selvagem B (por exemplo, SEQ ID NO: 2), que foi obtida comercialmente pela List Biologicals), e quando comparado a toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 86). O controle “apenas célula” refere-se a células IMR-90. Veja Tabela 62 abaixo, mostrando os valores de EC₅₀ respectivos.

TABELA 62

Amostra	EC ₅₀	Redução da dobra em EC ₅₀
Penta Mutante B (lisato concentrado)	11,5 µg/mL	1.642.857
Mutante triplo B (Purificado)	18,9 ng/mL	2700
Lista de Toxina B lot127902-115	7,0 pg/mL	1

[0661] Além disso, a toxina penta mutante B (“PM-B”) (SEQ ID

NO: 184) foi avaliada para a inibição competitiva de citotoxicidade que é mediada pela toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 86) nas células IMR-90. Veja figura 27. Para preparar as amostras, a toxina mutante tripla B (TM B) (SEQ ID NO: 86) foi mantida em uma concentração constante de 200 ng/mL ($10 \times EC_{50}$) em todas as células. Uma 2-dobra toxina penta mutante B diluída serialmente iniciando de 5 µg/mL foi adicionada aos poços contendo a toxina mutante tripla B. As amostras foram então transferidas para uma placa de 96 poços contendo células IMR-90, então incubada por 72 horas. Um ensaio ATP foi completado, como descrito acima, por exemplo, no Exemplo 14. Como pode ser mostrado na Figura 27, uma toxina penta mutante B inibiu competitivamente a citotoxicidade da toxina mutante tripla B.

EXEMPLO 16: A CITOTOXICIDADE RESIDUAL DAS TOXINAS MUTANTES TRIPLAS A E B (SEQ ID NOS: 4 E 6, RESPECTIVAMENTE)

[0662] Para ainda avaliar a natureza da citotoxicidade residual, as toxinas mutantes (SEQ ID NOS: 4 e 6) foram misturadas e incubadas com anticorpos de neutralização respectivos antes e a mistura foi adicionada a uma monocamada celular de IMR90.

[0663] Os resultados (Figura 8) mostraram que a citotoxicidade residual de uma toxina mutante A e B (SEQ ID NOS: 4 e 6, respectivamente) pode ser completamente revogada com os anticorpos de neutralização específicos para a toxina mutante A (painel superior, Figura 8) e a toxina mutante B (painel inferior, Figura 8). Concentrações elevadas de uma toxina mutante A (painel superior) e B (painel inferior) foram incubadas com anticorpos policlonais antitoxina de coelhos (pAb, 1:10 diluição) ou monoclonal de murino (1:50 diluição a partir de armazenamento contendo 3,0 mg IgG/mL) antes de adicionar as células IMR90. Após 72-hr de tratamento de incubação com células IMR90 a 37°C, o substrato CellTítulo-Glo® foi

adicionado e as unidades de luz relativas (RLU) foram medidas em um espectrofotometro com um programa de luminescencia para medir os níveis de ATP. Quanto menor o nível de ATP, maior o de toxicidade. Os controles incluíram TcdA e TcdB adicionados em 4 vezes seus valores EC₅₀ correspondentes.

[0664] Os relatórios publicados sugerem que as mutações no domínio de protease auto-catalítica ou glucosiltransferase das toxinas resultam em inativação completa da toxicidade. Entretanto, nossos dados não concordam com estes relatórios publicados e isto pode ser atribuído ao aumento de concentrações toxinas mutantes altamente purificadas testadas em nossos laboratórios como oposto aos lisatos de cultura cru nos relatórios publicados; pontos de tempo aumentados no qual o arredondamento celular das células tratadas com toxina mutante foi observada (por exemplo, 24 horas, 48 horas, 72 horas, ou 96 horas) como oposto as observações feitas em menos do que 12 horas; o uso de linhas de célula que exibiram sensibilidades significativamente maiores para as toxinas nos presentes ensaios de citotoxicidade em contraste com as células adenocarcinoma colorretal humano nos ensaios de citotoxicidade divulgados nos relatórios publicados; e/ou a uma atividade ou processo desconhecido, outro que não a glicosilação, que poderia estar conduzindo a toxicidade residual das toxinas mutantes.

EXEMPLO 17: NOVO MECANISMO DE CITOTOXICIDADE DAS TOXINAS MUTANTES GENÉTICAS

[0665] Para investigar o mecanismo de uma citotoxicidade residual das toxinas mutantes genéticas, as células IMR-90 foram tratadas com a toxina wt B (SEQ ID NO: 2) ou a toxina mutante genética B (SEQ ID NO: 6), e a glicosilação de Rac1 GTPase foi estudada com o tempo do tratamento. As amostras foram coletadas de 24 a 96 horas e os extratos de células foram preparados. O Rac1 glicosilado é distinguido

do Rac1 não glicosilado por western blots com dois anticorpos para Rac1. Um anticorpo reconhece ambas as formas de Rac1 (23A8) e a outra apenas reconhece o (102) Rac1 não glicosilado. Como ilustrado na Figura 22, para a toxina B, os níveis de Rac1 totais ficaram inalterados durante o tempo com a maioria do Rac1 sendo glicosilada. O tratamento com a toxina mutante genética B (SEQ ID NO: 6), por outro lado, resultou em uma redução significativa do Rac1 total, entretanto, o Rac1 não foi glicosilado em todos os pontos de tempo. Isto mostra que os níveis de Rac1 foram afetados negativamente pelo tratamento com a toxina mutante genética, mas não pela toxina wt. Como ilustrado na Figura 22, o nível de actina foi similar na toxina e nas células tratadas com a toxina mutante genética B e similar as células tratadas com mock nos pontos de tempo indicados. Isto mostrou que as toxinas mutantes genéticas exerceram uma citotoxicidade por um mecanismo que é diferente do caminho de glicosilação conduzido pela toxina do tipo selvagem.

EXEMPLO 18: TRATAMENTO QUÍMICO DAS TOXINAS MUTANTE GENÉTICA

[0666] Embora as toxinas mutantes modificadas geneticamente mostrassem uma redução de 4-log na atividade citotóxica é preferida, outra redução (2 a 4 logs) na atividade citotóxica foi considerada. Duas estratégias de inativação química foram avaliadas.

[0667] O primeiro método usa formaldeído e glicina para inativar as toxinas mutantes. A inativação por formaldeído ocorre formando uma base Schiff (imina) entre o formaldeído e as aminas primárias na proteína. As bases Schiff podem então reagir com um número de resíduos de aminoácidos (Arg, His, Trp, Tyr, Gln, Asn) para formar tanto ligações em cruz intra- ou intermolecular. Estas ligações em cruz fixam a estrutura da proteína tornando-a inativa. Além disso, o formaldeído pode reagir com a glicina para formar uma base Schiff. A

base glicil Schiff pode então reagir com os resíduos de aminoácidos para formar ligações em cruz de glicina proteína intermolecular. O formaldeído reduziu a atividade citotóxica das toxinas mutantes genéticas para os limites abaixo detectáveis (redução na citotoxicidade $>8 \log_{10}$ para mutante tripla B (SEQ ID NO: 6) e $>6 \log_{10}$ para mutante tripla A (SEQ ID NO: 4). Entretanto, uma reversão foi observada ao longo do tempo quando as toxinas mutantes triplas inativadas por formaldeído (FI) foram incubadas a 25°C. A reversão citotóxica pode ser prevenida pela adição de uma quantidade baixa de formaldeído (0,01-0,2%) nas soluções de armazenamento de toxinas mutantes triplas FI. Veja Exemplo 23.

[0668] Outro método usa o tratamento de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS) para gerar toxinas mutantes inativadas. Neste método, o EDC/NHS reage com os grupos carboxílicos na proteína para formar ésteres ativados. Os ésteres ativados podem então reagir com as aminas primárias na proteína para formar ligações de amina estáveis. Como com a reação de formaldeído, esta reação resulta em ligações em cruz intra- e intermolecular. A ligação de amida formada pelo tratamento com EDC/NHS é mais estável e não reversível do que a ligação de amina lábil formada pela inativação de formalinaa. Além disso para as ligações em cruz formadas pela reação dos ésteres com as aminas primárias no polipeptídeo, ambos adutos de glicina e de beta-alanina podem ser formados. Sem estar limitado pela teoria ou mecanismo, os adutos de glicina são produzidos quando a glicina é adicionada para temperar os ésteres ativados que não reagiram. A amina da reação de glicina com o éster ativado no polipeptídeo para formar ligações de amida estáveis. Sem estar limitado pela teoria ou mecanismo, os adutos de beta-alanina são formados pela reação da beta-alanina ativada com as aminas primárias no polipeptídeo. Esta reação resulta

em ligações de amida estáveis. A beta-alanina ativada é produzida pela reação de três moles de NHS com um mole de EDC.

[0669] Para alcançar a redução de 2-4 logs da atividade citotóxica relativa às toxinas mutantes modificadas geneticamente (6-8 logs, relativo às toxinas nativas), as toxinas mutantes inativadas quimicamente devem ter valores de EC_{50} de $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$. Além disso, para a redução na atividade citotóxica, seria vantajoso reter os epítomos chave como determinado pela análise de pontos manchados. Até hoje, um número de condições de reação tem identificado que reúne ambas a redução de citotoxicidade e o critério de reconhecimento de epítomo. Vários lotes de toxinas mutantes inativadas foram preparados para os estudos em animais e os dados analíticos de alguns lotes representativos são mostrados nas tabelas 7A e 7B, Tabela 8A e 8B.

Tabela 7A: Toxina mutante A inativada quimicamente é segura e antigênica					
Amostra #	Amostra da toxina ID	Tratamento	CPE EC_{50}	Redução na toxicidade	Reatividade para mAbs
			$\mu\text{g/mL}$	Log Scale	
1	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	Formalina	>1000	6,4	Médio/alto
2	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44166-166	EDC	>1000	6,4	Alto
3	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-170A	Formalina	>1000	6,4	Baixo
CONTROLES					
4	TcdA wt (da List Bio)	nenhum	390 pg/mL	1	Alto
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	3,90 pg/mL	Não aplicável	Nenhum
6	rTcdA mutante genética L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	nenhum	12,5 $\mu\text{g/mL}$	4,5	Alto
7	Toxóide A	Form	Não	---	Baixo

Tabela 7A: Toxina mutante A inativada quimicamente é segura e antigênica								
Amostra #	Amostra da toxina ID	Tratamento	CPE EC ₅₀	Redução na toxicidade	Reatividade para mAbs			
	List Bio	alina	feito					
Tabela 7B: Toxina mutante A inativada quimicamente é segura e antigênica								
Amostra #	Amostra da toxina ID	Tratamento	Reatividade com mAb (manchas no ponto, desnaturante)					
			N-terminal mAb#6	Domínio médio mAb # 102	C-terminal (neut)			
					A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
1	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	Formalina	++	++	++++	++	++++	++++
2	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	+++ +	++++	++++
3	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-170A	Formalina	+	+	++	++	++	+
CONTROLES								
4	TcdA wt	nenhum	++++	+++	++++	+++	++++	+

Tabela 7A: Toxina mutante A inativada quimicamente é segura e antigênica								
Amostra #	Amostra da toxina	ID	Tratamento	CPE EC ₅₀	Redução na toxicidade	Reatividades para mAbs		
	(da List Bio)					+		+
								+
								+
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	—	—	—	—	—	—
6	rTcdA mutante TM Genetic a L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	nenhum	++++	++++	++++	+++ +	++++	+
								+
								+
								+
7	Toxóide A List Bio	Formalina	—	—	+	—	++	+

List =List Biologicals; CPE= ensaio de efeito citopático; EC₅₀ = a concentração mais baixa onde 50% das células mostra citotoxicidade; mAbs= anticorpos monoclonais; neut= neutralização; ND= não feito; TM= local ativo e mutante clivado (“mutante triplo”)

Tabela 8A: Toxina mutante B inativada quimicamente é segura e antigênica					
Amostra #	Amostra da toxina ID	Tratamento	CPE EC ₅₀	Redução na toxicidade	Reatividades para mAbs
			µg/mL	Escala Log	
1	TcdB mutante L44905-182 (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1000	8,4	Médio/alto
2	TcdB mutante L34346-38A (SEQ ID NO: 6)	EDC	>1000	8.4	Alto
3	TcdB mutante L44905-170B (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1000	8.4	Baixo
CONTROLES					

Tabela 8A: Toxina mutante B inativada quimicamente é segura e antigênica						
Amostra #	Amostra da toxina ID	Tratamento	CPE EC ₅₀	Redução na toxicidade	Reatividades para mAbs	
4	Tcda wt (da List Bio)	nenhum	390 pg/mL	Não aplicável	Nenhum	
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	3,90 pg/mL	1	Alto	
6	rToxina mutante B TM Genetica (SEQ ID NO: 6) L34346-022	nenhum	69 ng/mL	4.2	Alto	
7	Toxóide A List Bio	Formalina	Não feito	---	meio	
Tabela 8B: Toxina mutante B inativada quimicamente é segura e antigênica						
Amostra #	Amostra da toxina ID	Tratamento	Reatividade com mAb (mancha de ponto, condições de não desnaturante)			
			N-terminal a 1-543		médio-/C-terminal aa 544-2366	
			B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
1	TcdB mutante (SEQ ID NO: 6) L44905-160A	Formalina	+++	+++	++	++
2	TcdB mutante (SEQ ID NO: 6) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++
3	TcdB mutante (SEQ ID NO: 6) L44905-170A	Formalina	++	+	+/-	-
CONTROLES						
4	TcdA wt (da List Bio)	nenhum	—	—	—	—
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	++++	+++	++++	++++
6	rTcdB mutante TM Genetica L34346-022 (SEQ ID NO: 6)	nenhum	++++	++++	++++	++++
7	Toxóide B List	Formalina	+++	+++	+++	+++

List =List Biologicals; CPE= ensaio de efeitos citopáticos; EC₅₀ = a concentração onde 50% das células mostra citotoxicidade; mAbs= anticorpos monoclonais; neut= neutralização; ND= não feito; TM= local ativo e clivagem mutante (“mutante triplo”)

EXEMPLO 19: FERMENTAÇÃO E PURIFICAÇÃO

[0670] As fermentações foram iniciadas a partir de uma fonte congelada de um *Clostridium difficile* recombinante incluindo um promotor *fdx* descrito acima. Os armazenamentos congelados eram

suspensões de células feitas para um $OD_{600} = 2,0$ e 20% de glicerol. Uma cultura iniciadora foi inoculada com 0,2 mL do armazenamento de cultura em 500mL SHYG10 de meio (30 g/L hidrolisato de soja SE50MK, 20 g/L extrato de levedura HY YEST 412, 10 g/L glicose, 15 mg/L tianfenicol, pH7). O meio foi contido em uma garrafa ventilada de 500mL. A inoculação foi realizada em um gabinete bioseguro convencional, a garrafa foi borbulhada com nitrogênio, e a garrafa foi então incubada estática (respiradouros fechados) por ~ 16-18 horas a 37°C em um incubador convencional.

[0671] Um biorreator de dez litros contendo 8L de meio SHYG60 (30 g/L hidrolisato de soja SE50MK, 20 g/L extrato de levedura HY YEST 412, 60 g/L glicose, 15 mg/L tianfenicol, pH7) foi usado para a fase de fermentação. O conteúdo de 500mL da garrafa inóculo foram inoculados para o fermentador que foi operado a 37°C, 400 rpm (1,47 m/s) com 0,1 vvm asperção de nitrogênio. O pH foi controlado a 7,0 por auto-adição de 5N NaOH. Fermentação foi tipicamente executada por ~ 24 horas para alcançar um pico de potência. O crescimento durante o curso da fermentação foi monitorado por leituras de OD_{600} . As amostras tomadas para a toxina quantificação mutante foram giradas a ~5000xg e os grânulos resultantes foram congelados a -70°C. Os grânulos de células foram então descongelados e resuspendos em um tampão consistindo de 20mM Tris, 3mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 6,5 e sonicado a uma amplitude de 40 por 20 segundos. O lisato de célula resultante foi girado a 5,000xg por 10 min. O sobrenadante foi combinado com o tampão de carregamento e reduzindo o agente e executado em um gel 3,8% Tris-acetato PAGE a 150 volts por 50-55 min versus os padrões de toxina autênticos. O gel foi manchado durante a noite, então descorado e quantificado em um densitometro de escaneamento. Tipicamente, os valores de OD_{600} de ~ 10-12 foram observados com os valores de toxina de 80-120 mg/L.

[0672] A seguinte tabela é um exemplo de dados de fermentação para a toxina mutante A

Tabela 63		
Tempo de fermentação passado (hrs)	OD ₆₀₀	Rendimento da 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

[0673] Um exemplo de dados de fermentação para a toxina mutante B é apresentado na tabela abaixo.

Tabela 64		
Tempo de fermentação passado (hrs)	OD ₆₀₀	Rendimento da 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

[0674] As modificações da composição e dos métodos para a cultura da célula *C. difficile* recombinante e/ou a produção de toxinas mutantes tem sido testado e estão dentro do escopo da invenção. Por exemplo, embora SE50MK (e variadamente SE50MK-NK, asmbas fontes de Friesland-Campaigna) foi a escolha preferida para a fonte de nitrogênio, uma variedade de outros hidrolisados de soja de outros fabricantes forma identificadas que funcionaram bem no processo. Um meio de cultura incluindo o hidrolisado de soja na ausência do extrato de levedura proporcionou 30-40% do rendimento esperado.

[0675] Os extratos de levedura de fabricantes alternativos mostraram suportar rendimentos equivalentes. Um meio de cultura incluindo um extrato de levedura na ausência do hidrolisado de soja proporcionou 60-70% de rendimento esperado.

[0676] O uso de um meio de cultura com base em hidrolisado de soja/extrato de levedura, na ausência de uma fonte de carbono, rendeu cerca de 2-3 OD₆₀₀ e cerca de 10-15 mg/L de toxina. Embora a glicose seja uma fonte de carbon preferida para a culturação, os resultados equivalentes foram obtidos com mannitol. Uma triagem de fontes de carbono em garrafas, indicou que o *C. difficile* também pode utilizar fructose e manose que também seria esperado para suportar um alto OD/rendimento, quando comparado ao meio de cultura na ausência de uma fonte de carbono. As fontes de carbono seguintes não parecem suportar um crescimento ótimo: arabinose, xilose, sucrose, lactose, maltose, glicerol, ramnose e galactose.

[0677] Além disso, estendendo o tempo de fermentação para 48 horas (requerendo a adição de mais glicose) não pareceu melhorar substancialmente o rendimento.

[0678] Ainda, a fermentação ao pH 6,5 e 7,5 deu rendimentos em uma faixa esperada de 80-120 mg/L. A fermentação em um pH mais extremo pH (pH 6,0 ou 8,0) ainda deu os valores de OD₆₀₀ esperados, mas reduziu o rendimento (40-60 mg/L) da toxina.

[0679] A fermentação usando um meio de cultura na ausência de tianfenicol resultou em uma perda de plasmídeo, por exemplo, cerca de 10-20% para um plasmídeo codificando a toxina mutante B, e cerca de 30-40% para um plasmídeo codificando a toxina mutante A. Portanto, a fermentação usando um meio de cultura na ausência de um derivado de cloranfenicol foi viável.

[0680] Os modos alternativos de operar a fermentação também foram testados e estão dentro do escopo da invenção. Por exemplo, a

fermentação pode ser executada a 400 rpm ou menos e a sobrecoopição do nitrogênio pode ser usada, ambas técnicas das quais foram tentadas e usadas com sucesso.

[0681] Além disso, um meio de anticorpo monoclonal SFM4MAb foi testado e mostrou dar cerca de 10 OD₆₀₀ das células e cerca de 40 mg/L de toxina mutante.

[0682] Por último, a adição de um inosineto contendo fosfato na fermentação pareceu reduzir a produção de toxina, quando comparado ao meio de cultura na ausência do ingrediente contendo fosfato.

[0683] Ao final da fermentação, o fermentador é resfriado. A lama de célula é recuperada pela centrifugação contínua e ressuspensa em um tampão apropriado. A lise da suspensão celular é alcançada pela homogeneização por alta pressão. Para a toxina mutante A, o homogenado é floculado e a solução floculada submetida a centrifugação contínua. Esta solução é filtrada e então transferida para um processamento abaixo. Para a toxina mutante B, o homogenado é clareado por uma centrifugação contínua, e então transferido para o processamento abaixo.

[0684] A toxina mutante A (SEQ ID NO: 4) é purificada usando duas etapas de cromatografia seguidas por uma troca de tampão final. O lisado clareado é carregado em uma coluna de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e a toxina mutante ligada é eluída usando um gradiente de citrato de sódio. O conjunto de produtos da coluna HIC é então carregado em uma coluna de troca de cátion (CEX) e a toxina mutante A ligada é eluída usando um gradiente de cloreto de sódio. O conjunto CEX contendo a toxina mutante A purificada é trocado no tampão final pela diafiltração. A toxina mutante A purificada é trocada no tampão intermediário de substância de droga final por diafiltração. Após a diafiltração, o retido é filtrado através de um filtro 0,2 micron antes da inativação quimicamente para a substância de

droga final. A concentração de proteína é almejada a 1-3 mg/mL.

[0685] A toxina mutante B (SEQ ID NO: 6) é purificada usando duas etapas de cromatográficas seguidas por uma troca de tampão final. O lisado clareado é carregado em uma coluna de troca de ânion (AEX), e a toxina mutante ligada é eluída usando um gradiente de cloreto de sódio. O citrato de sódio é adicionado ao conjunto de produto a partir da coluna AEX e carregado em uma coluna de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). A toxina mutante ligada é eluída usando um gradiente de citrato de sódio. O conjunto de HIC contendo o polipeptídeo de toxina mutante purificada (SEQ ID NO: 6) é trocado no tampão final pela diafiltração. A toxina mutante B purificada é trocada em um tampão intermediário de substância de droga final. Após a diafiltração, o retido é filtrado através de um filtro 0,2 micron antes da inativação quimicamente para uma substância de droga final. A concentração de proteína é almejada a 1-3 mg/mL.

EXEMPLO 20: INATIVAÇÃO DE FORMALDEÍDO /GLICINA

[0686] Após a purificação, as toxinas mutantes A e B genéticas (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) são inativadas por 48 horas a 25°C usando 40 mM (1.2 mg/ml) de formaldeído. A inativação é realizada ao pH $7,0 \pm 0,5$ em 10 mM fosfato, 150 mM de tampão de cloreto de sódio contendo 40 mM (3 mg/ml) glicina. O período de inativação é configurado para exceder três vezes o período necessário para a redução no EC50 nas células IMR90 para 1000 ug/mL. Após 48 horas, a atividade biológica é reduzida 7 a 8 log10 relativo a toxina nativa. Seguindo a incubação de 48 horas, a toxina mutante inativada é trocada em um tampão de substância de droga final por diafiltração. Por exemplo, usando um cassete de ultrafiltração de acetato de celulose regenerado 100 kD, a toxina inativada é concentrada a 1-2 mg/mL e trocada por tampão.

EXEMPLO 21: INATIVAÇÃO POR N-(3-DIMETILAMINOPROPIL)-N'-

ETILCARBODIIMIDA (EDC)/N-HIDROXISUCCINIMIDA (NHS)

[0687] Após a purificação, as toxinas mutantes genéticas (SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6) são inativadas por 2 horas a 25°C usando 0,5 mg EDC e 0,5 mg NHS por mg de toxina mutante genética A e B purificada (aproximadamente 2,6 mM e 4,4 mM respectivamente). A reação é temperada pela adição de glicina a concentração final de 100 mM e as reações incubadas por 2 horas adicionais a 25°C. A inativação é realizada ao pH $7,0 \pm 0,5$ em 10 mM fosfato, 150 mM tampão de colreito de sódio. O período de inativação é configurado para exceder três vezes o período necessário para a redução no EC50 nas células IMR90 para maior do que 1000 ug/mL. Após 2 horas, a atividade biológica é reduzida 7 a 8 log10 relativo a toxina nativa. Seguindo a incubação de 4 horas, a toxina mutante inativada é trocada em um tampão de substância de droga final por diafiltração. Por exemplo, usando um cassete de ultrafiltração de acetato de celulose regenerado 100 kD, a toxina inativada é concentrada a 1-2 mg/mL e trocada por tampão.

[0688] A menos que do contrário especificado, os termos abaixo como usados na seção de Exemplos referem-se a composição produzida de acordo com a presente descrição no Exemplo 21: “toxina mutante tripla tratada com EDC/NHS-”; “toxina mutante inativada por EDC”; “substância de droga [A/B] de toxina mutante”; “toxina mutante EI”; “toxina mutante tripla EDC/NHS.” Por exemplo, os seguintes termos são sinônimos: “toxina mutante tripla A tratada por EDC/NHS”; “toxina mutante A inativada por EDC”; “substância de droga A de toxina mutante”; “toxina mutante A EI”; “toxina mutante tripla A EDC/NHS.” Como outro exemplo, os seguintes termos são sinônimos: “toxina mutante tripla B tratada por EDC/NHS”; “toxina mutante B inativada por EDC”; “substância de droga B de toxina mutante”; “toxina mutante B EI”; “toxina mutante tripla B EDC/NHS.”

[0689] A substância de droga A de toxina mutante e a substância de

droga B de toxina mutante são cada uma fabricadas usando um processo de lote, que inclui (1) fermentação das cepas *C. difficile* de toxina negativa (VPI 11186) contendo um plasmídeo codificando o peptídeo de toxina mutante tripla genética respectivo (em um meio incluindo hidrolisado de soja, extrato de levedura HY YESTTM 412 (Sheffield Bioscience), glicose, e tianfenicol), (2) purificação da toxina mutante genética (o “intermediário da substância de droga”) a partir de um lisato livre de célula usando procedimentos de cromatografia de interação e troca de íon pelo menos maior do que 95% de pureza, (3) inativação química por tratamento com EDC/NHS seguido por temperamento/fechamento com glicina, e (4) troca em uma matriz de tampão final.

EXEMPLO 22: CONDIÇÕES SUPORTANDO OS ESTUDOS DE INATIVAÇÃO E FORMULAÇÃO

[0690] Para otimizar a inativação química das toxinas mutante genética, projeto estatístico de experimento (DOE) foi realizado. Os fatores examinados no DOE incluíram temperatura, concentração formaldeído/glicina, tempo e concentração de EDC/NHS (Tabela 9 e 10). Para monitorar a perda de atividade biológica, os valores EC₅₀ nas células IMR90 foram determinados. Além disso, a morfologia celular das células IMR-90 em vários pontos de tempo pós-tratamento também foram observados. Veja figura 9, mostrandoa morfologia em 72 horas pós-tratamento. Para determinar o efeito emu ma estrutura de proteína, o reconhecimento do epítipo foi monitorado usando uma análise de ponto de mancha usando um painel de anticorpos monoclonais levantado contra diferentes domínios de toxina.

Tabela 9: parâmetros testados Formaldeído /Glicina DOE	
Parâmetros	Faixa testada
Tempo (dias)	1 a 14
Temperatura (°C)	4 a 37

Tabela 9: parâmetros testados Formaldeído /Glicina DOE	
Concentração de toxina (mg/ml)	1 a 1,25
Concentração de Formaldeído (mM)	2 a 80
Concentração de glicina (mg/ml)	0 a 80
Tabela 10: parâmetros testados EDC/NHS DOE	
Parameters	Faixa testada
Tempo (horas)	1 a 4
Temperatura (°C)	25 a 35
Concentração de toxina (mg/ml)	1 a 1,25
EDC (mg/mg toxina)	0,25 a 2,5
NHS (mg/mg toxina)	0 a 2,5

[0691] Na inativação de formaldeído /glicina inactivation das toxinas mutantes de *C. difficile*, as condições de reação final foram escolhidas de forma que o nível desejado de redução na atividade citotóxica (7 a 8 log10) fosse alcançado enquanto maximiza o reconhecimento do epítipo. Veja Exemplo 20 acima.

[0692] Na inativação de EDC/NHS das toxinas mutantes de *C. difficile*, as condições de reação final foram escolhidas de forma que o nível desejado de redução na atividade citotóxica (7 a 8 log10) fosse alcançado enquanto maximiza o reconhecimento do epítipo. Veja Exemplo 21 acima.

[0693] Em uma modalidade alternativa, a reação de EDC-NHS temperada pela adição de alanina, que temperou suficientemente a reação. O uso da alanina pode resultar em uma modificação na proteína de toxina mutante que é similar a modificação quando a reação é temperada por glicina. Por exemplo, tempera adicionando alanina pode resultar em uma metade de alanina em uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico e/ou ácido aspártico da toxina mutante. Em outra modalidade alternativa, a reação de EDC-NHS foi temperada pela adição glicina metil éster, que temperou

suficientemente a reação.

[0694] A produção de toxina A e toxina B de *C. difficile* mutante triplo inativo quimicamente sob condições otimizadas resultou em uma outra redução de uma citotoxicidade residual para um nível indetectável (>1000 µg/mL – a menor concentração testada através de um ensaio CPE), enquanto retêm a antigenicidade como medido por sua reatividade aos anticorpos de neutralização específicos de toxina. Os resultados mostrados na Tabela 28 demonstram um passo a passo na redução da citotoxicidade a partir da toxina wt até as toxinas mutantes triplas tratadas por EDC/NHS. A marcação por imunofluorescência confirmou que as toxinas mutantes triplas (SEQ ID NO: 4 e 6) e as substâncias de droga de toxina mutante exibiram ligações comparáveis às células IMR-90 sugerindo que a perda de citotoxicidade não foi devido a ligação reduzida nas células (dados não mostrados). Comparado a substância de droga de toxina mutante A, a substância de droga de toxina mutante B alcançou uma redução na citotoxicidade dobra maior, que é consistente com a potência maior dobra ~600 do TcdB comparado ao TcdA.

Tabela 28. Sumário de Citotoxicidade

Toxina	Amostra	EC ₅₀	Redução na citotoxicidade dobra
A	TcdA (SEQ ID NO: 1)	1,6 ng/mL	1
	Toxina mutante tripla A (SEQ ID NO: 4)	12,5 µg/mL	7800
	Toxina mutante A Drug Substance	>1000 µg/mL	>625.000
B	TcdB (SEQ ID NO: 2)	2,5 pg/mL	1
	Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6)	45 ng/mL	18.000
	Toxina mutante B Drug Substance	>1000 µg/mL	>400.000.000

Resultados do ensaio de citotoxicidade para a toxina mutante B modificado por EDC sozinho, ou por EDC e sulfo-NHS também foram

avaliados. Ver Tabela 29

TABELA 29

Amostra	Citotoxicidade EC ₅₀ , mg.mL ⁻¹ (CPE)	Comentário
TcdB TM (SEQ ID NO: 6), não modificado	0,03	
TM TcdB-EDC 1, sem NHS	<0,97	Reagiu com EDC sozinho
TM TcdB-EDC 2, sem NHS	<0,97	Preparação duplicada
TM TcdB-EDC 3, sulfo- NHS (0,5x)	125	Reagiu com EDC e sulfo- NHS
TM TcdB-EDC 4, sulfo- NHS (0,5x)	125	Preparação duplicada
TM TcdB-EDC 3, sulfo- NHS (1,0x)	250	Reagiu com EDC e sulfo- NHS
TM TcdB-EDC 4, sulfo- NHS (2,0x)	750	Reagiu com EDC e sulfo- NHS

[0695] Condições: a toxina mutante tripla B (“TM TcdB”) (SEQ ID NO: 6) foi modificada nas proporções de peso de toxina mutante B:EDC:sulfo-NHS = 1: 0,5: 0,94. Esta proporção é o equivalente molar (corrigido para o maior MW de sulfo-NHS) para a reação EDC/NHS padrão como descrito no Exemplo 21. Para determinar o efeito de sulfo-NHS, a proporção de sulfo-NHS foi variada de 0,5x a 2x a proporção padrão. As reações duplicadas foram realizadas em 1 x PBS pH 7,0 a 25 °C, e foram iniciadas pela adição da solução EDC. Após 2 horas, as reações foram temperadas pela adição de 1 M glicina pH 7,0 (0,1 M concentração final) e incubado por ainda 2 horas. As reações temperadas foram dessalgadas alinizadas e a substância de droga de toxina mutante B (“TM TcdB-EDC”) foi concentrada usando dispositivos Vivaspin 20, e estéril filtrados em frascos estéreis e submetidos para avaliação em um ensaio de citotoxicidade.

[0696] Na mesma proporção molar, o sulfo-NHS reduziu o EC₅₀ para cerca de 250 ug/mL quando comparado a >1000 ug/mL para NHS. Mesmo em duas vezes a proporção molar, o sulfo-NHS não aparece como eficaz como o NHS na diminuição da citotoxicidade. Veja Tabela 30.

TABELA 30

Modificação	Digestão de referência (TcdB 004)	de EDC	Digestão de controle (TcdB 001)	de NHS EDC	Digestão da amostra de Sulfo-NHS
Aduto de glicina (+57 da)	49		29		35
beta-alanina (+71 da)	24		19		0
Ligação em cruz (-18 da)	7		4		3
deidroalanina (-34 da)	6		5		4
Não modificada	273		195		217

[0697] Para determinar o número e o tipo de modificações, o mapeamento de peptídeo foi realizado em ambas as amostras de toxina mutante tripla Binativada EDC/NHS e EDC/sulfo-NHS. Quantidades similares de modificações de deidroalanina, adutos de glicina e ligações em cruz foram observadas em ambas as amostras. Entretanto, na amostra de sulfo-NHSa, nenhuma beta-alanina foi observada.

[0698] A toxina do tipo selvagem B (SEQ ID NO: 2) foi inativada usando o protocolo padrão (veja Exemplo 21); toxina B:EDC:NHS 1:0,5:0,5, 25°C por 2 horas em 1 x PBS pH 7,0, então temperada com 1 M glicina (0,1 M concentração final) e incubada por mais 2 horas adicionais. A amostra foi dessalinizada, concentrada e submetida a um ensaio de citotoxicidade. O EC₅₀ para estas amostras foi <244 ng/mL

EXEMPLO 23: ESTUDOS DE REVERSÃO

[0699] Para determinar se a reversão ocorre tanto com as toxinas mutanets de *C. difficile* inativadas por EDC/NHS quanto com o formaldeído /glicina, as amostras de toxinas mutantes inativadas (1

mg/mL) foram incubadas a 25°C por seis semanas. As alíquotas foram removidas a cada semana e os valores de EC₅₀ nas células IMR90 foram determinados. Uma amostra de formaldeído /glicina inativada contendo nenhum formaldeído e uma amostra contendo 0,01% formaldeído. O EC₅₀ foi medido pelo ensaio CPE.

Tabela 11: Resultados do estudo de reversão de TcdA inativado			
Tempo de incubação (Dias)	EC ₅₀ (ensaio de célula IMR90)		
	Formalina-inativado		EDC/NHS
	sem formaldeído	0.01% formaldeído	
0	1000 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml
7	740 ug/mL	ND	1000 ug/ml
14	493 ug/mL	1000 ug/ml	1000 ug/ml
21	395 ug/mL	ND	1000 ug/ml
28	395 ug/mL	1000 ug/ml	1000 ug/ml
35	326 ug/M	ND	ND

[0700] A 25°C na ausência do formaldeído residual, uma reversão parcial é observada (Tabela 11). Wpós cinco semanas, a atividade citotóxica aumentou aproximadamente 3-dobras. Embora a atividade citotóxica tenha aumentado, após cinco semanas ainda tinha uma redução de 7 log₁₀ relativa a toxina nativa. Uma reversão foi completamente prevenidapela inclusão de formalina a uma concentração de 0,010%. Nenhuma reversão foi observada na amostra de EDC/NHS inativada. Por todas as 6 semanas de incubação, os valores EC₅₀ permaneceram no nível inicial de >1000 µg/mL para todos os quatro lotes de ambas as toxinas mutantes triplas A tratadas EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) and EDC/NHS-treated toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6). Em contraste, os valores EC₅₀ da toxina mutante tripla A tratada FI (SEQ ID NO: 4) e toxina mutante tripla B tratada FI (SEQ ID NO: 6) não foram estáveis e diminuíram para valores de EC₅₀ baixo não aceitáveis, indicando um aumento na citotoxicidade ou reversão de inativação. Veja Tabela 11.

[0701] Além disso para reduzir estavelmente a citotoxicidade para

um nível indetectável (>1000 µg/mL, como medido pelo ensaio CPE), as toxinas mutantes inativadas usando EDC/NHS reteram epítomos importantes que são alvos dos mAbs neutralizando a toxina. Veja Tabela 31. As toxinas mutantes FI mostram uma perda dos mesmos determinantes antigênicos.

Tabela 31: inativação de EDC/NHS reduziu a Citotoxicidade das Toxinas mutantes genéticas e manteve os determinantes antigênicos importantes

Amostra	EC ₅₀	Redução na citotoxicidade relativa a toxina wt (log ₁₀) ^a	Ligação Max (Rmax) ^b Neut mAb ^d		
			1 ^c	2	3
Mutante tripla A (SEQ ID NO: 4)	12,5 µg/mL	4, 5	100	100	100
Mutante tripla A FI	>1000 µg/mL	>6, 4	55	59	53
Mutante tripla AEDC/NHS	>1000 µg/mL	>6, 4	90	94	103
Mutante tripla B (SEQ ID NO: 6)	69 ng/mL	4, 3	100	100	100
Mutante tripla B FI	>1000 µg/mL	8, 4	67	67	36
Mutante tripla B EDC/NHS	>1000 µg/mL	8, 4	87	78	73

a citotoxicidade como medido usando o ensaio CPE nas células IMR90

b os valores determinados por uma análise Biacore™ usando multiple neutralizing mAbs de neutralização múltiplos direcionados a

vários epítomos de toxina não sobreposta

c valores são medias de dois experimentos

d para as três primerias fileiras, o neut mAb “1,” “2,” “3” refere-se ao mAbs A60-22, A80-29, e A65-33 para a toxina A, respectivamente. Para as três fileiras de baixo, o neut mAb “1,” “2,” “3” refere-se ao mAbs B8-26, B59-3, e B-56-15 para a toxina B, respectivamente.

Exemplo 24: ESTUDOS DE IMUNOGENICIDADE PRECLÍNICOS

[0702] Os objetivos preclínicos chave incluem composições de teste incluindo toxinas mutantes A e B de *C. difficile* em pequenos animais e primatas não humanos (NHP). Os camundongos e os hamsters foram imunizados para determinar, entre outras coisas, se as composições de *C. difficile* são capazes de provocar anticorpos de neutralização contra a toxina mutante A e B. Os antígenos foram testados para a indução de respostas de neutralização de soro seguindo as séries de imunizações em camundongos, hamsters, e macacos cinomolgos. As toxinas mutantes inativadas quimicamente e/ou genéticas foram formuladas tanto em um tampão neutro, tampão de fosfato de alumínio, quanto em um tampão contendo ISCOMATRIX como um adjuvante em algumas modalidades. As respostas de anticorpo de neutralização foram geralmente testadas por duas ou quatro semanas após cada reforço ou dose final.

[0703] O ensaio de neutralização de toxina demonstrou a capacidade de um antissoro neutralizar o efeito citotóxico mediado por *C. difficile* TcdA ou TcdB e é, portanto capaz de medir a atividade funcional dos anticorpos que estão presentes em uma. Um ensaio de neutralização de toxina foi realizado em uma linha de célula de fibroblasto de pulmão humano, IMR-90, que é sensível a ambos o TcdA e o TcdB. Resumidamente, uma placa de microtítulo com 96 poços foi semeada com células IMR-90 servindo como alvo da citotoxicidade mediada por toxina. Cada amostra de soro teste foi analisada

separadamente para a capacidade de neutralizar o TcdA e o TcdB. As diluições seriadas apropriadas de teste antissoro foram misturadas com as concentrações fixadas para TcdA ou TcdB e incubada a 37°C por 90 minutos em um incubador umidificado (37°C /5% CO₂) para permitir que a neutralização das toxinas ocorra. Para um controle de qualidade, todas as placas incluíram controles e padrão de referência que incluem anticorpos antitoxina de título conhecido. Após 90 minutos, a mistura antissoro de toxina foi adicionada a monocamada das células IMR-90 e as placas foram incubadas por 72 horas adicionais. Subsequentemente, um substrato CellTítulo-Glo® foi adicionado a placa de ensaio para determinar os níveis de Adenosina Trifosfato (ATP) presentes em células ativas metabolicamente e foi medido como Unidades de Luminescência Relativa (RLU). Um nível alto de ATP indica uma alta viabilidade celular, e os níveis são diretamente proporcionais à quantidade de neutralização da toxina pelo anticorpo presente na amostra. Para os dados preclínicos, os dados RLU foram plotados contra o valor de diluição da amostra antissoro teste para gerar uma curva de encaixe de resposta de regressão de Quatro Parâmetros Logísticos (4-PL). Os títulos de neutralização foram expressos como o valor de diluição na amostra que exibiu 50% de redução na citotoxicidade.

EXEMPLO 25: ESTUDO DE IMUNOGENICIDADE EM CAMUNDONGO: MUC. *DIFFICILE* 2010-06

[0704] A proposta deste estudo foi avaliar a imunogenicidade de duas formas da de *C. difficile* mutante B (SEQ ID NO: 6), cada uma inativada quimicamente por dois métodos diferentes. Neste estudo, a toxina mutante B não tratada (SEQ ID NO: 6) (inativada geneticamente, mas não inativada quimicamente) foi usada como um controle, com e sem o adjuvante.

[0705] Os grupos de 10 camundongos foram imunizados intramuscularmente com 10 µg de um imunogênio de acordo com a

Tabela 12.

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

Grupo	Imunogênio	Dose	No.	Rota	Esquema
1	Toxina mutante inativada por formalina B ^a in AIPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8
2	Toxina mutante inativada B form 2 ^b in AIPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8
3	Toxina mutante inativada genética B sem adjuvante	10 µg	10	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8,
4	Toxina mutante inativada genética B in AIPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8,
^a inativação química = Formalina/glicina tratado 10°C por 7 dias ^b inativação química = EDC/NHS tratado, 30°C por 2 horas ^c concentração de íon de alumínio = 0,5 mg/mL					

Resultados: não houve eventos adversos nos camundongos seguindo cada administração das vacinas candidatas. Como ilustrado na Figura 10, os camundongos em cada grupo desenvolveram anticorpos de neutralização antitoxina B robustos significantes após a terceira dose com as toxinas mutantes respectivas.

[0706] Com base em um título de 12 semanas, parece que nos camundongos a toxina mutante inativada B de EDC (Grupo 2) e as toxinas mutantes inativadas por formalina (Grupo 1) geraram respostas de neutralização potentes.

[0707] Na ausência da inativação química, a toxina mutante

genética B (SEQ ID NO: 6) gerou respostas de neutralização após duas doses (Grupos 3-4, semana 8), que foram reforçadas após a terceira dose (Grupos 3-4, semana 12).

EXEMPLO 26: ESTUDO DE IMUNOGENICIDADE EM CAMUNDONGO: MUC. *DIFFICILE*2010-07:

[0708] O propósito deste estudo foi avaliar a imunogenicidade das toxinas mutantes A e B de *C. difficile* inativadas quimicamente (SEQ ID NOS: 4 e 6, respectivamente), tanto sozinhas quanto em combinação. Os imunogênios para todos os grupos foram formulados com fosfato de alumínio como um adjuvante.

[0709] Os grupos de 5 camundongos foram imunizados intramuscularmente com 10 µg de um imunogênio de acordo com Tabela 13.

TABELA 13. TESTANDO AS TOXINAS MUTANTES A E B GENÉTICAS INATIVADAS QUIMICAMENTE (SEQ ID NOS: 4 E 6, RESPECTIVAMENTE) EM CAMUNDONGOS

Grupo	Imunogênio	Dose	No.	Grupo	Esquema
1	Toxina mutante B inativada ^a por formalina (SEQ ID NO: 6) em AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
2	Toxina mutante B inativada ^b por EDC (SEQ ID NO: 6) em AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
3	Toxina mutante inativada A por formalina (SEQ ID NO: 4) forma 1 em AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
4	Toxina mutante inativada A por EDC (SEQ ID NO: 4) in AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12

Grupo	Imunogênio	Dose	No.	Grupo	Esquema
5	Toxinas mutantes A+B em inativadas por formalina em AlPO_4^c	10 µg cada	5	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
^a tratamento por formalina = formalina/glicina tratada por 2 dias a 25°C; a toxina mutante não foi citotóxica e reteve a ligação a todas os anticorpos monoclonais específicos de toxina mutante testados ^b tratamento por EDC = EDC/NHS tratado por 4hrs a 30°C; a toxina mutante não foi citotóxica e reteve a ligação a todos os anticorpos monoclonais específicos de toxina mutante testados ^c concentração de íon de alumínio = 0,5 mg/mL					

Resultados: não houve eventos adversos nos camundongos seguindo cada administração das vacinas candidatas. Como ilustrado na Figura 11, após duas doses da toxina mutante inativada genética quimicamente, os anticorpos de neutralização antitoxina A (Grupos 3-5) foram reforçados ao título entre 3 e $4\log_{10}$ enquanto anticorpos de neutralização antitoxina B (Grupos 1-2, 5) permaneceram de baixo a indetectável, que é consistente com os dados a partir dos estudos com camundongos descritos acima (Figura 10). Os anticorpos de neutralização antitoxina B reforçados para 2-3 $\log_{10}$ nos grupos 1, 2, e 5 seguindo a terceira dose (semana 12 de títulos) e alcançaram seu pico duas semanas seguindo a quarta dose (semana 14 de títulos). Os anticorpos de neutralização antitoxina A nos grupos 3-5 aumentou levemente seguindo da terceira (semana 12 títulos) e a quarta imunizações (semana 14 títulos).

EXEMPLO 27: ESTUDO DE IMUNOGENICIDADE EM RAMISTERS: HAMC. *DIFFICILE*2010-02:

[0710] O propósito deste estudo foi avaliar a imunogenicidade e o potencial de proteção das toxinas mutantes A e B inativadas quimicamente e mutante tripla de *C. difficile* nos modelos de ramister dourado Syrian. O modelo de ramister dourado Syrian representa o melhor modelo de desafio disponível para simular CDAD humano. Os mesmos lotes de toxinas mutantes A e B usados no estudo com camundongo muC. *difficile*2010-07 forma usados neste estudo. Como

um controle, foi dado para um grupo as toxinas mutantes sem o adjuvante contendo alumínio.

[0711] Os grupos de 5 ramisters dourados Syrian forma imunizados intramuscularmente com 10 µg de um imunogênio de acordo com a Tabela 14.

TABELA 14. TESTANDO AS TOXINAS MUTANTES A E B INATIVADAS QUIMICAMENTE (SEQ ID NOS: 4 E 6, RESPECTIVAMENTE) EM RAMISTERS (HAMC. *DIFFICILE*2010-02)

Grupo	Imunogênio		Dose	No.	Rota	Esquema
1	Toxinas mutantes A+B inativada ^a por formalina (SEQ ID NOS: 4 e 6) em AlPO_4^c		10 µg cada	5	IM	Primeira wk 0, Reforço semanas 4, 8, 12
2	Toxinas mutantes A+B inativada por formalina (SEQ ID NOS: 4 e 6) em PBS (sem adjuvante)		10 µg cada	5	IM	Primeira wk 0, Reforço semanas 4, 8, 12
3	Toxinas mutantes A+B inativada ^b por EDC (SEQ ID NOS: 4 e 6) em AlPO_4^c		10 µg cada	5	IM	Primeira wk 0, Reforço semanas 4, 8, 12
4	Lista biológica de toxóide em AlPO_4^c		10 µg cada	5	IM	Primeira wk 0, Reforço semanas 4, 8, 12
^a tratamento por Formalina = formalina/glicina tratada por 2 dias a 25°C; a toxina mutante não foi citotóxica e reteve a ligação para todos os anticorpos monoclonais específicos de toxina mutante testados ^b tratamento por EDC = EDC/NHS tratado por 4hrs a 30°C; a toxina mutante não foi citotóxica e reteve a ligação para todos os anticorpos monoclonais específicos de toxina mutante testados ^c concentração de íon de alumínio = 0,5 mg/mL 1. Animais: 15 ramisters dourados Syrian, fêmeas, 6-8 semanas de vida/ 100-130g cada uma. 2. Vacinação: IM, 0,05 ml cada, de acordo com o esquema acima. Os toxóides serão proporcionados pelo Desenvolvimento de Processo e serão formulados em um diluente AlPO_4 pelos grupos de formulações. O grupo 2 servirá como um grupo de controle não adjuvantado. 3. Sangramento : todos os ramisters serão sangrados nas semanas 0, 4, 8, e 12, apenas antes de cada imunização. 4. Análise de amostra de soro: ensaio de neutralização						

Resultados: não houve eventos adversos observados seguido da imunização com as toxinas mutantes. Como ilustrado na Figura 12, após

uma única dose das toxinas mutantes, as respostas de neutralização da antitoxina A foram entre 2-3 $\log_{10}$ para as toxinas mutantes inativadas por formalina (Grupos 1-2) e entre 3-4 $\log_{10}$ para as toxinas mutantes inativadas por EDC (Grupo 3). Após a segunda dose, os anticorpos antitoxina A potencializaram em todos os grupos. Os anticorpos antitoxina A em todos os grupos não pareceram aumentar após a terceira dose. Um resultado similar foi observado após a quarta imunização, onde um aumento no título foi observado no grupo inativado por formalina que não continha o adjuvante de alumínio (Grupo 2).

[0712] As respostas de neutralização de antitoxina B foram indetectáveis nos grupos de toxinas mutantes inativadas por formalina (Grupos 1-2) e foram apenas acima de 2 $\log_{10}$ para as toxinas mutantes inativadas por EDC (Grupo 3) após uma única dose. Após a segunda dose, os títulos de anticorpo de neutralização antitoxina B nos dois grupos inativados por formalina (Grupos 1-2) aumentaram para 3-4 $\log_{10}$ enquanto que no grupo inativado por EDC (Grupo 3) aumentou para 4-5 $\log_{10}$. Para todos os três grupos, aumentos nos títulos de anticorpo de neutralização antitoxina B foram observados após a terceira e/ou a quarta doses, com todos os grupos alcançando um pico de título na semana 16 (após a última dose). Veja a figura 12.

[0713] Na Figura 13, o nível de respostas de anticorpo de neutralização contra as toxinas mutantes genéticas inativadas quimicamente (Figura 12) foi comparada a aquela provocadas pelo List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, California) (também referido aqui como “List Bio” ou “List Biologicals”) toxóides (isto é, toxóides comprados da List Biological Laboratories foram preparados pela inativação da formalina das toxinas do tipo selvagem; o reagente de controle usado para estabilizar o modelo de desafio de ramister).

[0714] Como usado aqui, “FI” nas figuras e nas tabelas refere-se ao tratamento com formalina/glicina das toxinas, 2 dias a 25°C, a

menos que do contrário estabelecido. Como usado aqui, “EI” nas figuras e nas tabelas refere-se ao tratamento por EDC/NHS por 4 horas a 30°C, a menos que do contrário estabelecido. Na Figura 13, 5 animais ramisters foram tratados com a respectiva composição de toxina mutante, enquanto que 11 animais ramisters forma tratados com um toxóide comprado da List Biological.

[0715] Os dados na Figura 13 mostram que, nos ramisters administrados de acordo com a Tabela 14, os títulos de anticorpo de neutralização respectivos contra a toxina A (Figura 13A) e a toxina B (Figura 13B) induziram a composição imunogênica incluindo as toxinas mutantes inativadas por EDC após duas doses é menor do que os títulos de anticorpo de neutralização respectivos provocados pelos toxóides da List Biologicals.

EXEMPLO 28: ESTUDO DE IMUNOGENICIDADE EM RAMISTERS:
C. DIFFICILE HAM2010-02 (CONTINUADO)

[0716] Para avaliar a eficácia de proteção das toxinas mutantes, imunizados, junto com um grupo de controle dos animais não imunizados, foi dado primeiro uma dose oral de um antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para romper a flora intestinal normal. Após cinco dias, os ramisters foram desafiados com uma dose oral de esporos de *C. difficile* do tipo selvagem (630 cepas, 100 cfu por animal). Os animais forma monitorados diariamente por onze dias após o desafio para sinais de CDAD, que em ramisters é conhecido como cauda molhada. Usando um Sistema de pontuação clínica um número de parametros diferente, os animais que determinaram ter um CDAD grave foram sacrificados. Os parâmetros incluíram atividade seguida de estimulação, desidratação, excrement, temperature, e peso, etc., que são conhecidos na arte.

[0717] No dia 11, o estudo foi finalizado e todos os animais sobreviventes foram sacrificados. A Figura 14 mostra as curvas de sobrevivência para cada um dos três grupos imunizados (Grupos 1-3,

de acordo com a Tabela 14) quando comparado aos controles não imunizados. Como pode ser visto, todos os animais não imunizados desenvolveram um CDAD grave e requereram sacrifício entre os dias 1-3 após o desafio (0% de sobrevivência). Ambos os grupos administrados com a toxina mutante inativada por formalina tiveram 60% de curvas de sobrevivência, com animais não requerendo eutanásia até o dia 3 (Grupo 1) ou dia 4 (Grupo 2). O grupo administrado com a toxina mutante inativada por EDC tinha uma curva de sobrevivência de 80%, com 1 (fora 5) animal requerendo eutanásia no dia 7. Portanto, os ramisters foram protegidas do desafio letal com esporos de *C. difficile*.

EXEMPLO 29: estudo de imunogenicidade em ramisters: hamC.
*difficile*2010-03: Imunogenicidade de toxinas mutantes de *C. difficile* genética e inativadas quimicamente

[0718] O propósito deste estudo foi avaliar a imunogenicidade das toxinas mutantes A e B inativadas quimicamente e dos mutanes triplos de *C. difficile* adjuvantados (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) no modelo de ramister dourado Syrian. Os mesmos lotes de toxinas mutantes A e B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) usados nos estudos com camundongo muC. *difficile*2010-07 forma usdos neste estudo. Como um controle, a um grupo (Grupo 1) foi dado uma salina tamponada com fosfato como placebo.

[0719] Grupos de cinco ou dez ramisters dourados Syrian foram imunizados com um imunogênio de acordo com Tabela 15. Foi dado aos animais três doses. Além disso, os animais foram dosados a cada duas semanas.

Tabela 15: projeto experimental de desafio e imunização de ramister					
Grupo	Imunogênio	Dose	No.	Rota	Esquema
1	Placebo (tampão PBS)	NA	5	NA	
2	Toxina mutante A+B (SEQ ID NOs: 4 e 6,	10 µg cada	10	IM	Primeira semana 0, Reforço

Tabela 15: projeto experimental de desafio e imunização de ramister					
Grupo	Imunogênio	Dose	No.	Rota	Esquema
	respectivamente); inativada por Formalina				semanas 2, 4
3	Toxina mutante A+B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente); inativada por EDC	10 µg cada	10	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 2, 4
4	Toxina mutante A+B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente); genética	10 µg cada	10	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 2, 4

Resultados: Veja a figura 15. Nenhum anticorpo A ou B antitoxina foi observado no grupo de controle de placebo. Após uma dose, os anticorpos de neutralização A antitoxina foram observados entre 2-3 $\log_{10}$ para os grupos de toxina mutante genética (Grupo 4) e inativados por formalina (Grupo 2) e entre 3-4 $\log_{10}$ para o grupo inativado por EDC (Grupo 3). Os anticorpos de neutralização antitoxina A aumentaram em cada um destes grupos (2-4) após a segunda imunização com as toxinas mutantes relevantes (títulos comparados na semana 2 a semana 3 na Figura 15). Após a terceira dose das toxinas mutantes (dada na semana 4), os títulos de anticorpos de neutralização antitoxina A nos Grupos 2-4 aumentaram comparado com seus títulos na semana 4.

[0720] Os anticorpos de neutralização de antitoxina B foram detectáveis após a segunda dose, sendo que os anticorpos de neutralização antitoxina B inativados por formalina (Grupo 2) e inativados por EDC (Grupo 3) aumentaram para entre 3-4 $\log_{10}$ e par entre 2-3 $\log_{10}$ para o mutante triplo genético (Grupo 4). Seguindo a terceira imunização (semana 4), os títulos de anticorpo de neutralização antitoxina B potenciados para entre 3-4 $\log_{10}$ para toxinas mutantes inativadas por formalina (Grupo 2) e toxinas

mutantes genéticas (Grupo 4) e entre 4-5 $\log_{10}$ para as toxinas mutantes inativadas por EDC (Grupo 3).

[0721] Para ambos anticorpos de neutralização antitoxina A e antitoxina B, os títulos de pico foram observados na semana 6 (pós-dose 3) para todos os grupos vacinados (Grupos 2-4).

Avaliação de composições imunogênicas adjuvantadas com Alhidrogel/CpG ou ISCOMATRIX

[0722] Os ramisters imunizados com a composição imunogênica incluindo uma toxina mutante inativada quimicamente formulada com Alhidrogel, ISCOMATRIX, ou Alhidrogel/CpG24555 (Alh/CpG) desenvolveu um antissoro antitoxina de neutralização robusto. Foi observado que o pico de respostas antitoxina A e antitoxina B foram 2-3-dobras maior e estatisticamente significante nos grupos imunizados com as toxinas mutantes formuladas em Alh/CpG ou ISCOMATRIX quando comparado s vacina formulada com o Alhidrogel sozinho. Veja a Tabela 32 mostrando 50% de títulos de neutralização. Os ramisters (n=10/grupo) foram imunizados com IM a 0, 2, e 4 semanas com 10 μ g cada substância de droga de toxina mutante A e substância de droga de toxina mutante B formulada com 100 μ g de Alhidrogel, ou 200 μ g de CpG 24555 + 100 μ g de Alhidrogel, ou 10 U de ISCOMATRIX. O soro foi coletado em cada momento e analisado no ensaio de neutralização de toxina para a atividade antitoxina funcional. Os títulos principais geométricos são proporcionados na tabela 32. O asterisco (*) indica uma significância estatística ($p < 0,05$) quando comparado aos títulos no grupo Alhidrogel.

Tabela 32: Imunogenicidade das Substâncias de Droga Toxina Mutante Adjuvantada em Ramisters						
Antitoxina A	50% título de neutralização					
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6
Alhidrogel	10	26	88	7425	6128	15965

Tabela 32: Imunogenicidade das Substâncias de Droga Toxina Mutante Adjuvantada em Ramisters						
Antitoxina A 50% título de neutralização						
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6
Título:						
Alh/CpG Título:	10	103	*688	*34572	*23028	*62203
ISCOMATRIX Título:	10	27	*246	*12375	8566	*36244
Antitoxina B						
Alhidrogel Título:	10	15	10	218	1964	7703
Alh/CpG Título:	10	10	18	*5550	*5212	*59232
ISCOMATRIX Título:	10	12	12	*7412	*15311	*92927

A eficácia de proteção da composição imunogênica incluindo as substâncias de droga de toxina mutante formulada com estes adjuvantes foi testada. Os ramisters forma imunizados e dados via oral clindamicina (30 mg/kg) na semana 5 e desafiado de acordo com o método descrito acima. Um grupo de ramisters imunizados (n=5) foi inoculado como um controle. A eficácia aumentada foi observada nos ramisters imunizados com as substâncias de droga de toxina mutante adjuvantadas tanto com Alh/CpG quanto com ISCOMATRIX (100% de sobrevivência) quando comparado ao Alhidrogel sozinho (70% de sobrevivência). Portanto, os ramisters forma protegidos de um desafio letal com esporos de *C. difficile*.

EXEMPLO 30: VACINAÇÃO POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM MACACOS CINOMOLGOS

[0723] O propósito deste estudo foi testar a imunogenicidade de doses baixas e altas de toxinas mutantes de *C. difficile* inativado por formalina e inativado por EDC em macacos cinomolgos. Todas as toxinas mutantes forma formuladas em ISCOMATRIX® como um

adjuvante exceto para um grupo, que serviu como um controle não adjuvantado (Grupo 5).

Tabela 16: Imunização de Macacos cinomolgos					
Grupo	Imunogênio	Número	Dose	Rota	Esquema
1	Toxinas mutantes A+B FI (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 2, 4
2	Toxinas mutantes A+B FI (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 2, 4
3	Toxinas mutantes A+B EI (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 2, 4
4	Toxinas mutantes A+B EI (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 2, 4
5	Toxinas mutantes A+B EI (sem adjuvante)	5	100 µg cada	IM	Primeira semana 0, Reforço semanas 2, 4

Animais: 25 macacos cinomolgos

O asterisco, “*”, na figura 16 refere-se a tendo apenas 4 cinos no grupo para a semana 12, um cino no grupo foi terminalmente sangrado na semana 8

Vacinação: IM, 0,5mL por dose, nas semanas 0, 2, e 4. As composições de toxina mutante foram preparadas como descrito acima. As composições de toxina mutante forma formuladas em ISCOMATRIX, exceto o Grupo 5 foi formulado em um tampão sem adjuvante.

Sangramento: Semanas -2, 0, 2, 3, 4, 6, 8, e 12. Eutanásia e sangramento terminal nos animais com maiores títulos de *C. difficile* na semana 8.

Análise da amostra de soro: ENSaios de neutralização e proteína ELISA

Resultados: a Figura 16 mostra a resposta de anticorpo de

neutralização de antitoxina nestes animais nas semanas 0, 2, 3, 4, 6, 8, e 12. Os títulos de antitoxina A foram entre 2-3 $\log_{10}$ para todos os cinco grupos após uma única dose (semana 2 títulos). Estes títulos potenciaram após cada dose subsequente para cada grupo. Nestes animais, não houve uma gota no título entre as semanas 3 e 4. Para todos os grupos, o pico dos títulos foi entre 4-5 $\log_{10}$. Em todos os momentos, o grupo sem o adjuvante ISCOMATRIX (Grupo 5) teve os títulos menores, indicando a utilidade de ISCOMATRIX no reforço das respostas imunes. O grupo de controle sem adjuvante (Grupo 5) alcançou um pico de títulos na semana 12, como fez o grupo imunizado com uma alta dose de toxinas mutantes inativadas por EDC (Grupo 4); todos os outros grupos alcançaram picos de títulos na semana 6, duas semanas após a última dose. Os títulos em todos os grupos potenciaram após a segunda dose (semana 3 no momento). Como com as respostas antitoxina A, as respostas antitoxina B não diminuíram da semana 3 para a semana 4. Após a terceira dose (semana 6 no momento), os títulos de anticorpo de neutralização antitoxina B em todos os grupos foram entre 3-4 $\log_{10}$, exceto no grupo inativado por formalina de dose baixa (Grupo 1) e o grupo inativado por EDC de dose alta (Grupo 4), ambos que tiveram títulos apenas $>4 \log_{10}$. O pico de títulos foi observado na semana 12 para todos os grupos exceto o grupo inativado por EDC de dose baixa (Grupo 3), que tinha picos de títulos na semana 8. Todos os grupos tinham pico de títulos $>4 \log_{10}$.

EXEMPLO 31: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

[0724] Embora as toxinas A e B compartilhem muita da homologia estrutural, as atividades de neutralização dos anticorpos foram consideradas específicas para toxina. Nesta invenção, vários anticorpos foram identificados e são específicos para uma toxina individual, e direcionada a vários epítomos e domínios funcionais, e

tem uma alta afinidade e uma atividade de neutralização potente em direção as toxinas nativas. Os anticorpos forma isolados a partir de camundongos que foram imunizados tanto com uma toxina mutante (FI) inativada por formalina disponível comercialmente quanto uma toxina mutante holo (SEQ ID NOs: 4 e 6) rendeu um não tóxico introduzindo mutações específicas em seu local catalítico para a produção ode toxina A e B mAb, respectivamente. O mapeamento do epítopo dos anticorpos mostrou que a vasta maioria do mAb contra a toxina A (49 de 52) foram direcionadas para o domínio terminal C não catalítico da toxina.

[0725] Os monoclonais contra a toxina B foram almeçados para três domínios da proteína. De um total de 17 mAb específico para toxina B, 6 foram específicas para o N-terminal (por exemplo, aminoácidos 1-543 do *C. difficile* TcdB do tipo selvagem, tal como 630), 6 no C-terminal (por exemplo, aminoácidos 1834-2366 de um *C. difficile* TcdB do tipo selvagem, tal como 630) e 5 para o domínio de meia translocação (por exemplo, aminoácidos 799-1833 de um *C. difficile* TcdB do tipo selvagem, tal como 630). A abordagem de usar as toxinas de *C. difficile* mutante (por exemplo, SEQ ID NO: 4 e 6) como antígenos de imunização ainda oferecem uma vantagem chave de apresentar a maioria, se não todos os epítomos antigênicos quando comparado ao processo de inativação por formalina que tende a afetar adversamente que tende a afetar adversamente a estrutura antigênica da toxina mutante.

EXEMPLO 32: CARACTERIZAÇÃO DA TOXINA A MAB, A3-25, QUE INCLUI UMA CADEIA LEVE VARIÁVEL TENDO UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DA SEQ ID NO: 36 E UMA CADEIA PESADA VARIÁVEL TENDO UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO SEQ ID NO: 37.

[0726] O mAb A3-25 foi de particular interesse desde que este

anticorpo desafiou todas as tentativas de definir sua isotipagem de imunoglobulina (Ig) usando os kits de isotipagem comumente disponíveis para IgG, IgM e IgA. Outra análise por western blot usando um antissoro específico de cadeia H Ig mostraram que o A3-25 é do isótipo IgE, um evento raro na produção de mAb. Este foi ainda confirmado pela sequência de nucleotídeo de mRNA isolado de células de hibridoma A3-25. As sequências de aminoácido das sequências de nucleotídeo das cadeias L e H de regiões variáveis de A3-25 são conhecidas na Figura 17.

[0727] A fim de avaliar o mAb A3-25 em um modelo de animal para a infecção e doença por *C. difficile*, seu isótipo Ig foi mudado para IgG1 murino por um enxerto molecular da região variável de cadeia H e na cadeia pesada γ murino de acordo com os métodos publicados.

EXEMPLO 33: CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO E MAPEAMENTO DE EPÍTOPO DOS ANTICORPOS ESPECÍFICOS DE TOXINA

[0728] Ainda, em um esforço para identificar os anticorpos de neutralização/funcionais, todos os monoclonais foram avaliados para a capacidade de neutralizar as toxinas do tipo selvagem em um ensaio de efeito citopático padrão (CPE) ou em um ensaio quantitativo e mais estridente com base em uma medição de ATP como indicador de viabilidade celular.

[0729] De um total de 52 anticorpos específicos de toxina A, quatro mAb (A3-25, A65-33, A60-22 e A80-29 (Tabela 17 e Figura 18) exibiram níveis variados de atividade de neutralização. Um ensaio de ligação competitivo BiaCore e os ensaios de inibição de hemaglutinação (HI) foram realizados para mapear os epítopos de anticorpo. Os resultados indicaram que estes anticorpos podem ser almejados para diferentes epítopos da proteína de toxina A (Tabela

17). Para ainda identificar a localização do local de ligação na proteína, os anticorpos foram avaliados individualmente em ensaios de western blot ou dot blot usando fragmentos de toxina de sequências conhecidas. Todos os 4 mAb de neutralização foram considerados direcionados a região de C-terminal da toxina.

[0730] De um total de anticorpos específicos de toxina B, 9 foram considerados de neutralização. Dos nove mAb de neutralização, seis deles foram direcionados para o C-terminal e os outros três para o domínio de translocação da toxina B (Tabela 18). Com base em um ensaio de ligação competitiva Biacore, os nove anticorpos monoclonais de neutralização podem ser agrupados em quatro grupos de epítomos mostrado na Figura 19.

TABELA 17: características da toxina A mAb selecionada

Grupo do epítipo (Biacore)	mAb #	Atividade de neutralização	Inibição de Hemaglutinação	Especificidade de ligação	Isótipo Ig
1	A3-25	+	-	C-terminal	IgE, κ
2	A65-33	+	-	C-terminal	IgG2a, κ
3	A80-29	+	+	C-terminal	IgG1, κ
ND	A60-22	+	+	C-terminal	IgG1, κ
4	A64-6	-	-	Em progresso	IgG1, κ
	A50-10	-	-	C-terminal	IgG1, κ
	A56-33	-	-	Em progresso	IgG1, κ
ND	A1	-	-	N-terminal	IgG1, κ

TABELA 18: características da toxina B mAb selecionada

Grupo do epítipo (Biacore)	mAb #	Atividade de neutralização	Especificidade de ligação	Isótipo Ig
1	B2-31	+	N-terminal	IgG1, κ
	B5-40			IgG1, κ
	B8-26			IgG1, κ
	B70-2			IgG1, κ

Grupo do epítopo (Biacore)	mAb #	Atividade de neutralização	Especificidade de ligação	Isótipo Ig
2	B6-30	+	N-terminal	IgG1, κ
	B9-30			IgG1, κ
3	B59-3	+	Domínio de translocação	IgG1, κ
	B60-2			IgG1, κ
4	B56-6	+	Domínio de translocação	IgG1, κ
	B58-4	-		IgG1, κ
5	B12-34	-	C-terminal	IgG1, κ
	B14-23			IgG1, κ
	B80-3			IgG1, κ
6	B66-29	-	C-terminal	IgG1, κ
7	B84-3	-	C-terminal	IgG1, κ

EXEMPLO 34: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS COMBINAÇÕES DE ANTICORPOS DE TOXINA A COM ATIVIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO SIGNIFICANTEMENTE AUMENTADA:

[0731] As quatro toxinas A mAb (A3-25, A65-33, A60-22 e A80-29) mostraram uma neutralização incompleta ou parcial GDn da toxina A quando testadas individualmente no ensaio de neutralização com base em ATP. O mAb A3-25 foi o anticorpo mais potente e os outros três foram menos neutralizadores com o A80-29 pouco acima do anterior (Figura 18). Entretanto, quando A3-25 foi combinado com qualquer um dos outros três mAbs, um efeito sintético na neutralização foi observado em todas as três combinações que foi muito maior do que a soma total de neutralização de anticorpos individuais como mostrado na Figura 20A-C. Além disso, todas as três combinações exibiram uma capacidade de neutralização completa normalmente observada com os anticorpos policlonais antitoxina A.

EXEMPLO 35: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS COMBINAÇÕES DE ANTICORPOS DE TOXINA B COM ATIVIDADE DE

NEUTRALIZAÇÃO SIGNIFICANTEMENTE AUMENTADA

[0732] Também observamos que a neutralização sinérgica com a toxina B mAbs a partir de grupos de epítipo diferente identificados pela análise BiaCore. A toxina B mAb B8-26, o mAb mais dominante do grupo 1, foi combinado com o mAbs múltiplo do grupo 3. As combinações foram avaliadas em um ensaio de neutralização específico de toxina B e os resultados são mostrados na Figura 21 e na Tabela 19.

Tabela 19: Neutralização da toxina B com mAbs		
mAb	Título Neut	
	CPE	ATP
B8-26 sozinho	20,480	5,000
B59-3 sozinho	320	120
B60-2 sozinho	320	80
B8-26 + B59-3	655,360	~60,000
B8-26 + B60-2	327,680	nd
nd, não feito		

O efeito de neutralização sinérgico foi observado quando o B8-26 foi combinado com um epítipo do grupo 3 mAb (Figura 21B), mas não qualquer outro mAb (dados não mostrados)

EXEMPLO 36: TRIAGEM *IN VITRO* POR UM MAB PARA COMPOSIÇÕES DE TOXINA MUTANTE SEGURA E EFICAZ:

[0733] As toxinas mutantes A e B genéticas de *C. difficile* (por exemplo, SEQ ID NO: 4 e 6) geradas através de um projeto genético mostram uma citotoxicidade residual usando um ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Embora tenhamos alcançado ~4 log de redução na citotoxicidade para cada toxina mutante de toxina de *C. difficile* (Tabela 20), ainda uma inativação química das toxinas mutantes, tais como com o tratamento de formalina foi preferido. Entretanto, os tratamentos com inativação química podem ser severos e podem

afetar adversamente os epítomos antigênicos chave destas toxinas ou toxinas mutantes.

Tabela 20: Compação de citotoxicidade <i>In Vitro</i> de toxina WT, Toxina mutante tripla, e toxinas WT inativadas por formalina (FI, da List Biological) (List Biological, comercial)			
Tcd	fonte/tratamento	EC ₅₀ ng/mL	Dobra de Redução na citotoxicidade
TcdA			
Toxina A (SEQ ID NO: 1)	WT	0,92	1
Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4)	Mutante tripla	8600	9348
Toxóide A (FI)	Comercial, tratado com Formalina	>20.000	>21.739
TcdB			
Toxin B (SEQ ID NO: 2)	WT	0,009	1
Toxina mutante B (SEQ ID NO: 6)	Mutante tripla	74	8222
Toxóide B (FI)	Comercial, tratado com Formalina	4300	477.778

[0734] Para a otimização do bioprocesso, um projeto estatístico de experimento (DOE) foi realizado para a inativação química do Tcd A e B mutante triplo (1 mg/mL) usando um tratamento com

formalina e EDC/NHS. Para otimizar a inativação por formalina do TcdA mutante triplo, variamos as concentrações de formalina/glicina (20-40 mM), pH (6,5-7,5), e temperatura (25-40°C). Para o TcdB mutante triplo, variamos a concentração de formalina/glicina de 2 a 80 mM e a temperatura e pH foram 25 °C e 7,0 respectivamente. O tempo de incubação para todos os tratamentos com formalina foi de 24 horas. Para a inativação por formalina, “40/40” nas Tabelas 21 e 23 representam as concentrações de formalina e glicina usadas na reação. Para o tratamento com EDC/NHS, variamos as concentrações de EDC/NHS de 0,25 a 2,5 mg/mg de TcdA mutante triplo e de 0,125 a 2,5 mg/mg de TcdB mutante triplo e incubado por quatro horas a 25 °C. Ao final da reação, todas as amostras foram dessalinizadas em 10 mM fosfato, pH 7,0. Após a purificação, os Tcds tratados foram analisados para uma citotoxicidade residual e o reconhecimento de mAb dos epítomos por análise mancha pontilhada. A meta foi identificar as condições de tratamento que reduziram a citotoxicidade para o nível desejado ($EC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) sem impactar negativamente os epítomos reconhecidos pelo painel de mAbs de neutralização (++++ ou +++). As condições de tratamento (marcadas com uma marca de seleção “✓” nas Tabelas 21-24) renderam composições imunogênicas potencialmente eficazes e seguras que retiveram a reatividade para pelo menos quatro mAbs de neutralização enquanto exibia 6-8 $\log_{10}$ de redução na citotoxicidade, relativo citotoxicidade da toxina do tipo selvagem respectiva. Os resultados selecionados são ilustrados nas Tabelas 21 a 24. Os dados adicionais a partir das condições de tratamento variantes nas toxinas mutantes triplas e os dados a partir de ensaios de neutralização de toxina e citotoxicidade *in vitro* são mostrados na Tabela 33 e Tabela 34. Veja também, por exemplo, os Exemplos 20 e 21 acima, que proporcionam mais detalhes em

relação as condições de tratamento de ligação em cruz preferidos das toxinas mutantes.

Tabela 21: Citotoxicidade e neutralização de reatividade de mAb de TcdA mutante triplo inativado por formalina (SEQ ID NO: 4)

Condições de reação de inativação química no TcdA mutante triplo	CPE de $\mu\text{g/mL}$	Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições de desnaturação)					
		N-terminal Mab#6	Domínio de translocação Mab# 102	C-terminal (neut)			
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
25°C, pH 6,5, 20/20mM	250	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 6,5, 40/40mM ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,5, 40/40mM ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 6,5, 40/40mM	>1000	++	+++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 7,5, 40/40mM	>1000	++	++	++++	++++	++++	+++
Nenhum, Toxina mutante tripla A	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Toxóide A FIND (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+

Tabela 22: Citotoxicidade and Neutralização da reatividade de mAb de TcdA mutante triplo inativado por EDC (SEQ ID NO: 4)

Condições de reação	CPE de $\mu\text{g/mL}$	Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições de desnaturação)			
		N-terminal	Domínio de translocação	C-terminal (neut)	

Tabela 21: Citotoxicidade e neutralização de reatividade de mAb de TcdA mutante triplo inativado por formalina (SEQ ID NO: 4)

Inativação química no TcdA mutante triplo		Mab#6	Mab# 102	A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
25°C, 0,25mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,5mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 1,25mg/mg, 4hr ✓	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	++++
25°C, 2,5mg/mg, 4hr ✓	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	+++
Nenhum, TcdA mutante triplo	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Toxóide A FI (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+

Tabela 23: Citotoxicidade e neutralização da reatividade mAb do TcdB mutante triplo inativado por formalina (SEQ ID NO: 6)

Condições de reação de Inativação química no TcdB mutante triplo	CPE (µg /mL)	mAb # (N-terminal aa 1 – 543)		mAb # (meio-/C-terminal aa 544 – 2366)	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, pH 7,0, 80/80mM, 24hr ✓	>1000	++++	++++	++++	+++
25°C, pH 7,0, 40/40mM, 24hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,0, 10/10mM, 24hr	15,6	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,0, 2/2mM, 24hr	<0,98	++++	++++	++++	++++
Nenhum, TcdB mutante triplo	0,058	++++	++++	++++	++++
Toxóide B FI (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

Tabela 21: Citotoxicidade e neutralização de reatividade de mAb de TcdA mutante triplo inativado por formalina (SEQ ID NO: 4)

Tabela 24: Citotoxicidade e neutralização da reatividade mAb do TcdB mutante triplo inativado por EDC (SEQ ID NO: 6)

Condições de reação de Inativação química no TcdB mutante triplo	CPE (μg/mL)	mAb # (N-terminal aa 1 – 543)		mAb # (meio-/C-terminal aa 544 – 2366)	
		8-26	9-30	56-6	59-3
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, 0,125mg/mg, 4hr	3,9	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,25mg/mg, 4hr	250	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,5mg/mL, 4hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, 1,25mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	+++	+++	+++
25°C, 2,5mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	+++	+++	+++
Nenhum, TcdB mutante triplo	0,058	++++	++++	++++	++++
Toxóide B FI (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

TABELA 33

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições não desnaturadas)					
Amostr a #	Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h μg /mL	CPE, 72h μg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de translocaç ão Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80- 29	3-25	60- 22	65- 33
1	L44166- 157A	>100 0	>100 0	++++	++++	+++ +	+++	+++ +	+++ +
2	L44166- 157B	>100 0	>100 0	+++	++++	+++ +	+++	+++ +	+++ +
3	L44166- 157C	>100 0	>100 0	+++	+++	+++ +	+++	+++ +	+++ +

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições não desnaturadas)					
Amostr a #	Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4)	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de translocaç ão Mab#	C-terminal (neut)			
4	L44166- 157D	>100 0	>100 0	+++	+++	+++ +	+++ 	+++ +	+++ +
5	L44905- 160A	>100 0	>100 0	++	++	+++ +	++ 	+++ +	+++ +
6	L44166- 166	>100 0	>100 0	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
7	L44905- 170A	ND	>100 0	+	+	++ 	++ 	++ 	++
8	L44897- 61	>100 0	ND	+++	++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
9	L44897- 63	>100 0	ND	++++	+++	+++ +	+++ 	+++ +	+++ +
10	L44897- 72 Tubo#1	250	ND	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
11	L44897- 72 Tubo#2	>100 0	ND	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
12	L44897- 72 Tubo#3	>100 0	ND	+++	+++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
13	L44897- 72 Tubo#4	>100 0	ND	+++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
14	L44897- 72 Tubo#5	>100 0	ND	+++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições não desnaturadas)					
Amostr a #	Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4)	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de translocaç ão Mab#	C-terminal (neut)			
15	L44897- 75 Tubo#6	>100 0	ND	+++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
16	L44897- 75 Tubo#7	>100 0	ND	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
17	L44897- 75 Tubo#8	>100 0	ND	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
18	L44897- 75 Tubo#9	>100 0	ND	++	+++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
19	L44897- 75 Tubo#10	>100 0	ND	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
20	L44897- 75 Tubo#11	>100 0	ND	++	++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
21	L44897- 101 (controle TxA pre- modificaç ão	23,4	<7,8	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
22	L44897- 101, 2 hr	187,5	155,9	+++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
23	L44897- 101, 4 hr	375	380,3	+++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições não desnaturadas)					
Amostr a #	Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4)	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de translocaç ão Mab#	C-terminal (neut)			
24	L44897- 101, 6 hr	500	429,6	+++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
25	L44897 102, 24 hr	>100 0	>100 0	++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
26	L44897- 103, 51 hr	>100 0	>100 0	+	+++	+++	+++ +	+++ +	+++
27	L44897- 104, 74 hr	>100 0	>100 0	—	+++	+++	+++	+++	+++
28	L44897- 105, 120 hr	>100 0	>100 0	—	++	++	+++	+++	++
29	L44980- 004	>100 0	>100 0	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
30	Reação #1 Semana 0, 25C	750 ug/m L	ND	ND	++	++	+++	+++	++
31	Reação #1 Semana 1, 25C	375 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
32	Reação #1 Semana 2, 25C	375 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
33	Reação #1 Semana 3, 25C	375 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições não desnaturadas)					
Amostr a #	Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4)	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de translocaç ão Mab#	C-terminal (neut)			
34	Reação #1 Semana 4, 25C	250 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
35	Reação #1 Semana 3, 37C	93,8 ug/m L	ND	ND	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
36	Reação #2 Semana 0, 25C	375 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
37	Reação #2 Semana 1, 25C	375 ug/m L	ND	ND	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
38	Reação #2 Semana 2, 25C	750 ug/m L	ND	ND	++	++	++	+++	++
39	Reação #2 Semana 3, 25C	250 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++	+++ +	+++
40	Reação #2 Semana 4, 25C	250 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++	+++ +	+++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições não desnaturadas)					
Amostr a #	Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4)	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de translocaç ão Mab#	C-terminal (neut)			
41	Reação #2 Semana 3, 37C	187,5 ug/m L	ND	ND	+++	+++	+++ +	+++ +	+++
42	TxA Semana de controle 3, 25C	18,8 ug/m L	ND	ND	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
43	TxA Semana de controle 3, 37C	25 ug/m L	ND	ND	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
44	L44897- 116-6 29,5 hrs	> 2000 ug/m L	ND	ND	++	++	++	+++	++
45	L44897- 116-7 57,5 hrs	> 2000 ug/m L	ND	ND	++	++	++	+++	++
46	L44897- 116 -8 79,5 hrs	> 2000 ug/m L	ND	ND	+	+	+	+++	+

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (mancha pontilhada, condições não desnaturadas)					
Amostr a #	Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4)	CPE; 24h μg /mL	CPE, 72h μg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de translocaç ão Mab#	C-terminal (neut)			
47	L44897- 116-9 123,5 hrs	> 2000 ug/m L	ND	ND	++	++	++	+++	++
48	L44897- 139	>100 0	ND	++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +
49	L44166- 204	>100 0	ND	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +

Condições de reação de ligação em cruz química para as amostras de toxina mutante tripla A (SEQ ID NO: 4) referenciadas na Tabela 33

[0735] As amostras 1-4 forma modificadas com EDC/NHS. Condições: 30°C, 20 mM MES/150 mM NaCl pH 6,5. As reações foram iniciadas pela adição de EDC. Após 2 horas de reação, as amostras A, B, e C tinham 1 M glicina adicionada a 50 mM de concentração final de glicina. A amostra D não tinha glicina adicionada. As reações foram configuradas com diferentes proporções de peso de uma toxina mutante A (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS como indicado abaixo.

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

[0736] A amostra 5 L44905-160A 80 mM HCHO, 80 mM glicina, 80mM NaPO4 pH 7, 1mg/mL Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4) Proteína, 48 hrs reação a 25 °C.

[0737] A amostra 6 L44166-166 EDC/NHS modificação de uma toxina mutante A (SEQ ID NO: 4) a 25 °C em 20 mM MES/150mM

NaCl pH 6,5. Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5. Reação iniciada por adição de EDC. Após 2 horas de reação, 1M glicina adicionada a 0,1 M glicina de concentração final e outras 2 horas de incubação. Após este período, o tampão de reação trocou para 1 X PBS em Sephadex G25.

[0738] A amostra 7 L44905-170A 80 mM HCHO, 80 mM glicina, 80mM NaPO₄ pH 7, 1mg/mL Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4) Proteína, 48 hrs de reação a 35 C. esta reaação de formalina foi direcionada como produzindo ligações em cruz excessivas de forma que a ligação ao antígeno fosse gravemente diminuída.

[0739] A amostra 8 L44897-61 32 mM HCHO/80 mM glicina, 72 hrs de reação a 25 °C.

[0740] A amostra 9 L44897-63 80 mM HCHO/80 mM glicina, 72 hrs de reação a 25 °C.

[0741] Todas as seguintes reações tiveram 24 hrs de tempo de reação.

[0742] Amostra 10 L44897-72 Tubo#1 25°C, 80 mM NaPi pH 6,5, 20 mM HCHO/20 mM glicina

[0743] Amostra 11 L44897-72 Tubo#2 25 °C, 80 mM NaPi pH 6,5, 40 mM HCHO/40 mM glicina

[0744] Amostra 12 L44897-72 Tubo#3 32,5 °C, 80 mM NaPi pH 7,0, 30 mM HCHO/30 mM glicina

[0745] Amostra 13 L44897-72 Tubo#4 32,5 °C, 80 mM NaPi pH 7,0, 30 mM HCHO/30 mM glicina

[0746] Amostra 14 L44897-72 Tubo#5 32,5 °C, 80 mM NaPi pH 7,0, 30 mM HCHO/30 mM glicina

[0747] Amostra 15 L44897-75 Tubo#6 25 °C, 80 mM NaPi pH 7,5, 20 mM HCHO/20 mM glicina

[0748] Amostra 16 L44897-75 Tubo#7 25 °C, 80 mM NaPi pH 7,5, 40 mM HCHO/40 mM glicina

[0749] Amostra 17 L44897-75 Tubo#8 40 °C, 80 mM NaPi pH 6,5, 20 mM HCHO/20 mM glicina

[0750] Amostra 18 L44897-75 Tubo#9 40 °C, 80 mM NaPi pH 6,5, 40 mM HCHO/40 mM glicina

[0751] Amostra 19 L44897-75 Tubo#10 40 °C, 80 mM NaPi pH 7,5, 20 mM HCHO/20 mM glicina

[0752] Amostra 20 L44897-75 Tubo#11 40 °C, 80 mM NaPi pH 7,5, 40 mM HCHO/40 mM glicina

[0753] As seguintes 8 amostras foram reagidas a 25 °C pelas vezes indicadas em 80 mM NaPi pH 7,0 contendo 78 mM HCHO e 76 mM glicina

[0754] Amostra 21 L44897-101 (pre-modificação) TxA tempo de controle zero amostra de controle, não modificada ou exposta a HCHO/glicina

[0755] Amostra 22 L44897-101, 2 hr

[0756] Amostra 23 L44897-101, 4 hr

[0757] Amostra 24 L44897-101, 6 hr

[0758] Amostra 25 L44897 102, 24 hr

[0759] Amostra 26 L44897-103, 51 hr

[0760] Amostra 27 L44897-104, 74 hr

[0761] Amostra 28 L44897-105, 120 hr

[0762] Amostra 29 (L44980-004) foi a toxina mutante A modificada por EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) (toxina mutante tripla A (SEQ ID NO: 4)-EDC). As condições de reação são: 25 °C, tampão foi 20 mM MES/150 mM NaCl pH 6,6. Toxina mutante tripla A (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 w:w:w. Reação iniciada pela adição de EDC. Após 2 horas de reação, glicina adicionada a 0,1 M concentração final e reagida outras 2 horas a 25 C. Reação terminada por dessalinização em Sephadex G25.

[0763] As seguintes 12 amostras e os 2 controles foram

experimentos de reversão onde as amostras foram incubadas a 25°C e a 37 °C.

[0764] Reação 1 = 25 °C, 80 mM NaPi pH 7,0, 40 mM HCHO apenas (sem glicina), 24 horas de reação.

[0765] Reação 2 = 25 °C, 80 mM NaPi pH 7,0, 40 mM HCHO/40 mM glicina, 24 horas de reação

[0766] AmostraReação

[0767] 30 Reação #1 Semana 0, 25°C

[0768] 31 Reação #1 Semana 1, 25°C

[0769] 32 Reação #1 Semana 2, 25°C

[0770] 33 Reação #1 Semana 3, 25°C

[0771] 34 Reação #1 Semana 4, 25°C

[0772] 35 Reação #1 Semana 3, 37°C

[0773] 36 Reação #2 Semana 0, 25°C

[0774] 37 Reação #2 Semana 1, 25°C

[0775] 38 Reação #2 Semana 2, 25°C

[0776] 39 Reação #2 Semana 3, 25°C

[0777] 40 Reação #2 Semana 4, 25°C

[0778] 41 Reação #2 Semana 3, 37°C

[0779] 42 TxA Semana de controle 3, 25°C

[0780] 43 TxA Semana de controle 3, 37°C

[0781] As próximas 4 amostras foram geradas por reação para os tempos indicados a 25 °C em 80 mM NaPi pH 7,0, 40 mM HCHO/40 mM glicina

[0782] 44 L44897-116-6 29,5 hrs

[0783] 45 L44897-116-7 57,5 hrs

[0784] 46 L44897-116 -8 79,5 hrs

[0785] 47 L44897-116-9 123,5 hrs

[0786] Amostra 48 L44897-139 48 hrs reação a 25 °C, 80 mM

NaPi pH 7,0, 40 mM HCHO/ 40 mM glicina.

[0787] Amostra 49 L44166-204 EDC/NHS modificação de uma toxina mutante A (SEQ ID NO: 4). 25 C, tampão 1 x PBS pH7,0. Toxina mutante A (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 w:w:w. 2 horas reação com EDC/NHS, então 1 M glicina adicionada a 0,1 M concentração final e outras 2 horas de reação. Tampão trocado por Sephadex G25 em 20 mM L-histidina/100 mM NaCl pH 6,5.

Tabela 34							
	Ensaio Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (mancha pontilhada, condições de não desnaturação)				Reatividades fortes para todos os 4 mAbs
Toxina mutante B Amostra ID	CPE; 24h	ATP, 72h	mAb # (N-terminal aa 1 – 543) 8-26 9-30		mAb # (meio-/C-terminal aa 544 – 2366) 56-6 59-3		
L44905-86-01 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), controle não tratado	<0,1 µg/mL	<0,1µg/mL	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	√
L44905-86-02 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, dia1	≥100 µg/mL	2,2µg/mL	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	√

Tabela 34								
	Ensaio Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (mancha pontilhada, condições de não desnaturação)				Reatividade s fortes para todos os 4 mAbs	
L44905-86-03 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	+++ +	++	+++	√*	
L44905-86-04 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, dia1	>100 µg/mL	5,2 µg/mL	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	√	
L44905-86-05 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	+++ +	++	+++	√*	
L44905-86-06 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	-	+++ +	+++		

Tabela 34							
	Ensaio Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (mancha pontilhada, condições de não desnaturação)				Reatividade s fortes para todos os 4 mAbs
L44905-86-07 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	-	+++ +	+++	
L44905-86-08 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	+++ +	+++ +	+++	√
L44905-86-09 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	++	-	+	
L44905-86-10 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	√

Tabela 34							
	Ensaio Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (mancha pontilhada, condições de não desnaturação)				Reatividade s fortes para todos os 4 mAbs
L44905-86-11 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	+++ +	-	+	
L44905-86-12 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	-	+++ +	+++	
L44905-86-13 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	-	+++ +	+++ +	
L44905-86-14 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	√

Tabela 34							
	Ensaio Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (mancha pontilhada, condições de não desnaturação)				Reatividade s fortes para todos os 4 mAbs
L44905-86-15 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	+++ +	-	+	
L44905-86-16 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	+++ +	+++	+++ +	√
L44905-86-17 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	++	-	+	
L44905-86-18 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	-	+++ +	+++ +	

Tabela 34							
	Ensaio Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (mancha pontilhada, condições de não desnaturação)				Reatividade s fortes para todos os 4 mAbs
L44905-86-19 Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	-	++	++	
L34346-30A	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	√
L34346-30B	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	+++ +	+++ +	+++ +	√
Toxóide B FI comercial (List Biologicals)	ND	ND	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	√
Toxina B wt de controle comercial (List Biologicals)	22,5 pg/mL	7,8 pg/mL	+++	++	+++	+++	√
toxina mutante tripla B recombinant e de controle (SEQ ID NO: 6)	78 ng/mL	72 ng/ml	+++	++	+++ +	+++	√

Condições de reação de ligação em cruz químicas para as amostras de uma toxina mutante B referenciada na Tabela 34

[0788] A toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6) foi ligada em cruz quimicamente e testada de acordo com as seguintes condições de reação. As amostras L44905-86 foram testadas em um experimento envolvendo três variações de reação de formalina e duas temperaturas de incubação. Cada dia, 6 amostras foram tomadas para um total de 18 amostras. A primeira amostra na lista é o controle não tratado (que torna 19 amostras totais). O controle não tratado incluiu um polipeptídeo de toxina mutante tripla B não tratado (SEQ ID NO: 6).

[0789] Reação1 ("Rxn1") = 80 mM HCHO, 80 mM glicina, 80mM NaPO₄ pH 7, 1mg/mL Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6)
Proteína

[0790] Reação2 ("Rxn2") = 80 mM HCHO, sem glicina, 80mM NaPO₄ pH 7, 1mg/mL Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6)
Proteína

[0791] Reação3 ("Rxn3") = 80 mM HCHO, sem glicina, 80mM NaPO₄ pH 7, 1mg/mL Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6)
Proteína + capa de Cianoboroidreto. A capa de cianoboroidreto envolvendo 80mM CNBrH₄ adicionada para dessalinizar a reação final e incubada 24 hr a 36°C.

[0792] Para a amostra L34346-30A 0,5g EDC e NHS por grama de toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), 4 horas a 30°C, em 20 mM MES, 150mM NaCl, pH 6,5.

[0793] Para a amostra L34346-30B 0,5g EDC e NHS por grama de toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6), 2 horas a 30°C seguida pela adição de glicina (concentração final de g/L) e incubada outras 2 horas a 30°C, em 20 mM MES, 150mM NaCl, pH 6,5. A única diferença entre as duas reações para L34346-30A e L34346-30B é a adição de glicina na reação L34346-30B.

EXEMPLO 37: ANTICORPOS INDUZIDOS POR COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS SÃO CAPAZES DE NEUTRALIZAR AS TOXINAS DE VÁRIAS CEPAS DE *C. DIFFICILE*

[0794] Para avaliar se os anticorpos induzidos por composições imunogênicas incluindo as substâncias de droga de toxina mutante podem neutralizar um amplo espectro de diversas sequências de toxina, as cepas representando ribotipos diversos e toxinotipos forma sequenciadas para identificar a extensão da diversidade genética entre as várias cepas comparado as substâncias de droga de toxina mutante. A cultura de sobrenadantes contendo toxinas secretadas de várias cepas foram então testadas em um ensaio de neutralização *in vitro* usando soro de ramisters imunizados para determinar a cobertura da composição imunogênica e determinar a capacidade da composição imunogênica de proteger contra as toxinas diversas das cepas clínicas circulantes.

[0795] Ambas as células HT-29 (linha de célula de carcinoma de cólon) e as células IMR-90 foram usadas para testar a neutralização das toxinas expressas a partir das cepas CDC. As células HT-29 são mais sensíveis ao TcdA; o EC₅₀ do TcdA purificado nestas células é 100 pg/mL quando comparado a 3,3 ng/mL para TcdB. Por outro lado as células IMR-90 são mais sensíveis ao TcdB; o EC₅₀ do TcdB purificado nestas células varia entre 9-30 pg/mL quando comparado a 0,92-1,5 ng/mL para TcdA. A especificidade do ensaio para ambos TcdA e TcdB nestas linhas de células foi confirmada usando ambos anticorpos específicos de toxina monoclonal e policlonal. Para a normalização do ensaio, os filtrados da cultura de 24 CDC isolados foram testadas em uma concentração quatro vezes seu valor EC₅₀ respectivo. Três das cepas tiveram níveis de toxina que foram muito baixo para o teste no ensaio de neutralização.

[0796] Vinte e quatro cepas representando toxinotipos/ribotipos

diversos cobrindo mais do que 95% das cepas circulantes de *C. difficile* nos USA e no Canada foram obtidos a partir de CDC. Entre estes isolados estavam cepas representando os ribotipos 027, 001 e 078, três cepas epidêmicas de CDAD nos Estados Unidos, Canada e UK. As cepas 2004013 e 2004118 representaram o ribotipo 027; as cepas 2004111 representaram o ribotipo 001 e as cepas 2005088, 2005325 e 2007816 representaram o ribotipo 078. Para identificar a extensão da diversidade genética entre os isolados clínicos causando a doença e as 630 cepas, os genes de toxina (*tcdA* e *tcdB*) destas cepas clínicas foram completamente sequenciados. Veja a Tabela 35. As sequências de aminoácido das toxinas foram alinhadas usando ClustalW no programa Megalign™ (DNASTAR® Lasergene®) e analisado para a identidade de sequência. Para *tcdA*, as análises de alinhamento genômico mostraram que todos os isolados clínicos e as cepas 630 compartilharam no todo cerca de 98-100% de identidade da sequência de aminoácido. A parte C-terminal do gene *tcdA* foi um pouco mais divergente. A mesma análise foi realizada para o gene *tcdB* que exibiu maior divergência na sequência. Notavelmente as cepas 2007838/NAP7/126 e 2007858/NAP1/unk5 exibiram os padrões mais divergentes das cepas 630 cepas nos domínios N-terminal (79-100%) e no C-terminal (88-100%; dados não mostrados).

[0797] Um poço com soro de ramister (HS) foi coletado a partir de ramisters dourados Syrian que foram imunizados com um imunogênio incluindo o TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) e o TcdB mutante (SEQ ID NO: 6), sendo que as toxinas mutantes foram inativadas com EDC, de acordo com, por exemplo, o Exemplo 29, Tabela 15, descrito acima, e formulado com fosfato de alumínio. Os resultados na Tabela 35 mostram que pelo menos a toxina B dos respectivos sobrenadantes de cultura foram neutralizados, em um ensaio de neutralização *in vitro*, por soro a partir de ramisters imunizados.

Tabela 35. Descrição das cepas de *C. difficile* a partir de CDC e a capacidade do soro de ramister immune para neutralizar várias toxinas

Cepas	Tipo de PFGE	Ribotipo	Neutralizado por soro de ramister
2005088	NAP7	78	sim
2007816	NAP7- relacionado	78	sim
2005325	NAP7	78	sim
2004013	NAP1	27	sim
2007886	NAP1		sim
2008222	NAP4	77	sim
2004206	NAP4	154	sim
2005283	NAP5	Unk3	Não testado ^b
2009141	NAP2		sim
2007838	NAP7	126	sim
2004111	NAP2	1	sim
2007070	NAP10	70	sim
2006017	NAP12	15	sim
2009078	NAP11	106	Não testado ^b
2007217	NAP8	126	sim
2006376	NAP9	17	sim
2007302	NAP11	Unk2	sim
2004118	NAP1	27	sim
2005022	NAP3	53	sim
2009292	NAP1		sim
2004205	NAP6	2	sim
2007858	NAP1	Unk5	sim
2009087	NAP11	106	Não testado ^b
2005359	NAP1- relacionado		sim

Os níveis de toxina foram muito baixos para realizar o ensaio de neutralização.

[0798] Figura 23 retrata os resultados do ensaio de neutralização usando as preparações de toxina de várias cepas de *C. difficile* nas células IMR-90. Os dados mostram que os anticorpos de neutralização TcdB no antissoro de ramister foram capazes de neutralizar as toxinas de 21 isolados testados, incluindo as cepas hipervirulentas e as cepas de TcdA-negativo, TcdB-positivo. Pelo menos 16 cepas diferentes de *C. difficile* foram obtidas a partir de CDC (Atlanta, GA) (anteriormente descrito) e foram cultivadas em um meio de cultura de *C. difficile* sob condições compatíveis como conhecido na arte e como descrito acima. Os sobrenadantes da cultura contendo as toxinas secretadas foram analisados para determinar sua citotoxicidade (EC_{50}) nas monocamadas IMR-90 e subsequentemente testados em um ensaio de neutralização padrão *in vitro* em 4 vezes o EC_{50} usando várias diluições do soro de ramisters imunizados com a substância de droga toxina mutante A e substância de droga de toxina mutante B, formulada com fosfato de alumínio fosfato de alumínio. A toxina crua obtida a partir dos sobrenadantes de cultura de cada cepa e a toxina purificada (toxina comercial obtida a partir da List Biologicals) (não purificada dos respectivos sobrenadantes) foram testadas para citotoxicidade para as células IMR-90 usando o ensaio de citotoxicidade *in vitro* descrito acima.

[0799] Nas figuras 23A-K, os gráficos mostram os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* (anteriormente descrito) em que os níveis de ATP (RLUs) são plotados contra as concentrações elevadas de: meio de cultura de *C. difficile* e o poço de soro de ramister (▪); a toxina crua e o poço de soro de ramister (●); a toxina purificada e o poço de soro de ramister (▲); um controle de toxina crua (▼); e um controle de toxina purificada (◆). As toxinas a partir das respectivas

cepas foram adicionadas as células nos valores $4 \times EC_{50}$.

[0800] Como mostrado na Figuras 23A-K, os ramisters que receberam o imunogênio descrito surpreendentemente desenvolveram anticorpos de neutralização que exibiram uma atividade de neutralização contra as toxinas a partir de pelo menos dos seguintes pelo menos 16 cepas diferentes CDC de *C. difficile*, em comparação a um controle apenas da respectiva toxina: 2007886 (Figura 23A); 2006017 (Figura 23B); 2007070 (Figura 23C); 2007302 (Figura 23D); 2007838 (Figura 23E); 2007886 (Figura 23F); 2009292 (Figura 23G); 2004013 (Figura 23H); 2009141 (Figura 23I); 2005022 (Figura 23J); 2006376 (Figura 23K). Veja também a Tabela 35 para as cepas adicionais de *C. difficile* a partir das cepas das quais as toxinas foram testadas e foram neutralizadas pela composição imunogênica incluindo substância de droga de toxina mutante A drug e a substância de droga de toxina mutante B, formulada em um fosfato e alumínio.

[0801] Em outro estudo, os sobrenadantes de cultura contendo toxinas secretadas de várias cepas de *C. difficile* (obtidas a partir de CDC e do Leeds Hospital, UK) foram testadas em um ensaio de neutralização *in vitro* usando soro de ramisters que foram administrados com a substância de droga de toxina mutante A e a substância de droga de toxina mutante B, formulada com Alhidrogel. Veja aTabela 36 para o projeto experimental. Os resultados são mostrados na Tabela 37 e na Tabela 38.

Tabela 36: desenho experimental	
Controle de ensaio	Em um ensaio usando células HT-29: antissoro de coelhos (Antitoxina A policlonal Fitzgerald Industries, #70-CR65) e toxina A de referência (toxina do tipo selvagem A da List Biologicals) Em um ensaio usando células IMR-90: Antissoro de coelho (Antitoxina B policlonal Meridian Life Science, #B01246R) e toxina B de referência (toxina do tipo selvagem B da List Biologicals)
Controles de Amostra	Em um ensaio usando células HT-29: soro HS + toxina A de referência Em um ensaio usando células IMR-90: soro HS + toxina B de referência
	Soro HS + 630 toxina wt

Tabela 36: desenho experimental	
	Soro HS + meio de cultura de linhas de célula IMR-90 ou HT-29
	Soro HS + sobrenadante de cultura de VPI11186
Amostra teste	HS + sobrenadante de cultura respectivo de <i>C. difficile</i>
Fonte do antissoro de ramister (HS)	Animais administrados com uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B formulada com Alhidrogel

Tabela 37: anticorpos induzidos por composição imunogênica neutralizaram a Toxina A e a Toxina B de várias cepas de *C. difficile* do tipo selvagem a partir de CDC, incluindo cepas hipervirulentas

Cepas Cdiff	Tipo PFGE	Ribotipo	Toxinotipo	Outro método de tipagem	Neutralizado por HS (IMR-90, Toxina B)	Neutralizado por HS (HT-29, Toxina A)
2004111	NAP2	1	0	Respectiva sequência de toxina tem 100% de homologia para toxina a partir das Cepas 630	Sim	Sim
2009141	NAP2		0		Sim	Sim
2006017	NAP12	15	0		Sim	Sim
2007302	NAP11	Unk2	0		Sim	Sim
2009087	NAP11	106	0		Sim	Sim
2005022	NAP3	53	0		Sim	Sim
2005283	NAP5	Unk3	0		Sim	Sim
2009078	NAP5	53	0		Sim	Sim
2004206	NAP4	154	0		Sim	Sim
2008222	NAP4	77	0		Sim	Sim
2004205	NAP6	2	0		Sim	Sim
2007070	NAP10	70	0		Sim	Sim
2006376	NAP9	17	VIII	txnA-/txnB+	Sim	N/A
2007816	NAP7-relacionado	78	V	Aumentando o predomínio nos E.U.A e na Europa	Sim	Sim
2007838	NAP7	126			Sim	Sim
2005088	NAP7	78			Sim	Sim
2005325	NAP7	78			Sim	Sim
2007217	NAP8	126			Sim	Sim
2004013	NAP1	27	III	Hipervirulento NAP1/027/III	Sim	Sim
2004118	NAP1	27			Sim	Sim
2009292	NAP1				Sim	Sim
2005359	NAP1-relacionado				Sim	Sim
2007858	NAP1	Unk5	IX/XXIII	outro	Sim	Sim
2007886	NAP1		IX/XXIII		Sim	Sim

Tabela 38: anticorpos induzidos por composição imunogênica neutralizaram a Toxina A e a Toxina B de várias cepas de *C. difficile* do tipo selvagem a partir da Europa, incluindo as cepas Hipervirulentas

Cepas Cdiff	Tipo PFGE	Outro método de tipagem	Tipo de Toxina	Neutralizado por HS (IMR-90, Toxina B)	Neutralizado por HS (HT-29, Toxina A)
001	NAP2	Toxinotipo 000 Cepas	00	Sim	Sim
002	NAP6			Sim	Sim
012 (004)	NAPCR1			Sim	Sim
014	UK			Sim	Sim
015	NAP12			Sim	Sim
020	NAP4			Sim	Sim
029	UK			Sim	Sim

Tabela 36: desenho experimental					
046	UK			Sim	Sim
053	NAP5			Sim	Sim
059	UK			Sim	Sim
077	UK			Sim	Sim
078	UK			Sim	Sim
081	UK			Sim	Sim
087	UK			Sim	Sim
095	UK			Sim	Sim
106	UK			Sim	Sim
117	UK			Sim	Sim
017	NAP9	txnA-/txnB+	VIII	Sim	NA
027	NAP1	Hipervirulento	III	Sim	Sim
075	UK			Sim	Sim
003	NAP10	outro	I	Sim	Sim
023	UK		IV	Sim	Sim
070	UK		XIII	Sim	Sim
126	UK		UK	Sim	Sim
131	UK		UK	Em progresso	Sim
Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvage obtidas do Leeds Hospital, UK. “UK” = estado desconhecido NA, não aplicável; as cepas não fazem a toxina A; não foi testado em um ensaio de neutralização da Toxina A					

EXEMPLO 38: MAPEAMENTO DE PEPTÍDEO DAS TOXINAS MUTANTES TRIPLAS EDC/NHS

[0802] Para caracterizar as toxinas mutantes triplas inativadas por EDC/NHS, os experimentos de mapeamento de toxina foram realizados em quatro lotes de toxina mutante tripla A tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) e quatro lotes de mutante tripla B tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 6). Após a digestão das toxinas mutantes com tripsina, os fragmentos de peptídeo resultantes foram separados usando uma fase reversa HPLC. A análise spectral de massa foi usada para identificar as modificações que ocorrem como um resultado de um processo de inativação. Para ambas a substância de droga de toxina mutante A e a substância de droga de toxina mutante B, maior do que 95% dos peptídeos trípticos teóricos foram identificados. Os adutos de ligação cruzada e glicina (glicina foi usada como um agente de tamponamento) foram identificados. Em ambas as substâncias de droga de toxina mutante A e as substâncias de droga de toxina mutante B, os adutos de beta-alanina foram observados.

Sem estar limitado pela teoria ou mecanismo, os adutos de beta-alanina parecem resultar de uma reação de três moles de NHS com um mole de EDC que forma a beta-alanina ativada por NHS. Esta molécula pode então reagir com os grupos de lisina para formar adutos de beta-alanina (+70 Da). Nas amostras de toxina mutante tripla B tratada com EDC/NHS, níveis baixos (0,07 moles/mole de proteína) de deidroalanina (-34 Da) também foram observados. A deidroalanina é um resultado de uma dessulfonação de um resíduo de cisteína. O mesmo tipo e o mesmo grau de modificação foi observado em todos os quatro lotes de cada toxina mutante, indicando que o processo produz um produto consistente. O mapeamento do peptídeo (de mais de 95% de cobertura de sequência) confirma que as modificações estão presentes. Um sumário das modificações é mostrado na Tabela 39. Veja também as Figuras 24-25. Além disso, o tamanho e a carga de heterogeneidade da substância de droga de toxina mutante tripla A e a substância de droga de toxina mutante tripla B aumentou, quando comparado ao tamanho e a carga de heterogeneidade da respectiva toxina mutante tripla A e a toxina mutante tripla B na ausência de inativação química. Como resultado, os perfis da cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e da cromatografia de troca de ânion (AEX) tiveram amplos picos relativamente (dados não mostrados).

Tabela 39. Sumário das modificações observadas nas substâncias de droga de toxina mutante

Modificação	# de resíduos modificados	Total # de resíduos	Grau de modificação	Moles modificados/mole de proteína
Substância de droga de toxina mutante A				
Ligação em cruz	2	313 Asp/Glu	16-40%	0,6
Metade de glicina	8	313 Asp/Glu	10-53%	2,2

Modificação	# de resíduos modificados	Total # de resíduos	Grau de modificação	Moles modificados/ mole de proteína
Metade de Beta Alanina	19	233 Lys	10-60%	4,7
Substância de droga de Toxina mutante B				
Ligação em cruz	3	390 Asp/Glu	11-63%	0,8
Metade de glicina	23	390 Asp/Glu	10-31%	3,9
Metade de Beta Alanina	10	156 Lys	12-42%	2,6
deidroalanina	2	8 Cys	1,0-3,5%	,07

O grau de modificação é calculado dividindo a área HPLC do peptídeo modificado pela área HPLC do native + peptídeo modificado.

EXEMPLO 39: PRODUÇÃO DE PRODUTO DE DROGA

[0803] A composição imunogênica de *C. difficile* (produto de droga) contém dois ingredientes farmacêuticos ativos (substância de droga de toxina mutante A e a substância de droga de toxina mutante B):□. Um produto de droga exemplar é uma formulação liofilizada contendo 10 mM Tris tampão pH 7,4, 4,5% (w/w) diidrato de trealose, e 0,01% (w/v) polisorbato 80, incluindo cada uma das substâncias de droga de toxina mutante A e da substância de droga de toxina mutante B. Veja na Tabela 40. A composição imunogênica é preparada por injeção resuspendendo a vacina liofilizada tanto com o diluente quanto com o diluente contendo Alhidrogel. O placebo incluirá uma solução salina estéril normal para injeção (0,9% cloreto de sódio).

TABELA 40

Componente	Selecionado
Formulação da forma de dosagem	Liofilizado
Dose de antígeno por 0,5 mL	25, 50, 100 µg de cada toxina mutante tripla A tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) e toxina mutante tripla B tratada

Componente	Selecionado
	com EDC/NHS (SEQ ID NO: 6)
pH	7,4 ± 0,5
Tampão	10 mM Tris
estabilizador/agente espesante	4,5% diidrato de Trealose (3 – 6%)
sobrenadante	0,01% Polisorbato 80 (0,005 – 0,015%)
Fechamento de containers	2 mL 13 mm tipo 1 frasco de vidro sílex, Blowback, West - Flurotec

PREPARAÇÃO DO TAMPÃO

[0804] A água para injeção (WFI) é adicionada a um misturador. Enquanto mistura, os excipientes são adicionados e dissolvidos na solução. O pH é medido. Se requerido, o pH é ajustado para $7,4 \pm 0,1$ com HCl. A solução é diluída ao peso final com WFI então filtrada usando um filtro de 0,22 µm Millipore Express SHC XL150. Uma amostra de redução de materiais biológicos de pre-filtragem é tomada antes da filtragem. O tampão filtrado é amostrado para osmolaridade e Ph.

PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO

[0805] As substâncias de droga de toxina mutante descongeladas são agrupadas no reservatório de formulação com base nas quantidades precalculadas na seguinte ordem de operação: 50% do volume de tampão de diluição alvo para alcançar 0,6 mg/mL é adicionado ao primeiro reservatório, seguido pela adição de uma substância de droga de toxina mutante A e misturada por 5 minutos a 100 rpm. A substância de droga de toxina mutante B é então adicionada ao reservatório e a solução é ainda diluída a 0,6 mg/mL ponto de diluição e então misturada por outros 5 minutos a 100 rpm. A amostra é removida e testada para a concentração total de toxina mutante. A solução é diluída para um volume de 100 por cento com

base no valor da concentração de toxina mutante em processo então misturado por 15 minutos a 100 rpm. O produto de droga formulado é amostrado para o pH e a prefiltração de materiais biológicos. O produto de droga formulado é então filtrado usando um Millipore Express SHC XL150 para o armazenamento durante a noite, ou trazido para a linha de preenchimento para a filtração estéril.

[0806] O volume formulado é trazido para a área de preenchimento, amostrado para materiais biológicos, e então filtrado estéril com dois filtros em série Millipore Express SHC XL150. O volume formulado é preenchido em frascos de vidro depirogenados em um volume de preenchimento alvo de 0,73 mL. Os frascos preenchidos são parcialmente parados e então carregados para o liofilizador. O ciclo de liofilização é executado como mostrado na Tabela 41. Quando completado o ciclo, a câmara de liofilização é preenchida de volta com nitrogênio a 0,8 atm e então os paradores são posicionados por completo. A câmara é descarregada e os frascos são tampados usando seladores de tampa de fechamento.

Tabela 41. Pontos de ajuste no ciclo de liofilização do produto de droga de *C. difficile*

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (minutos)	Mergulho (minutos)	Pressão
Carregamento	5°C	N/A	60	-
Congelamento 1	-50°C	183	60	-
Recozimento	-10°C	133	180	
Congelamento 2	-45°C	117	90	
Iniciação a vácuo	-45°C	-	60	50
Secagem primária	-30°C	75	3420	50
Secagem secundária	30°C	300	600	50
Armazenamento	5°C	50	-	50

[0807] Os dados de estabilidade de produto de droga são sumarizados na Tabela 42. Os dados sugerem que o produto de droga seja fisicamente e quimicamente estáveis durante o armazenamento a 2-8°C por pelo menos 3 meses ou pelo menos 1 mês a 25° ou 40°C. sob ambas condições de armazenamento, o nível de impurezas detectado pela cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) não mudou, nem foram mudanças na antigenicidade *in vitro* através dos últimos pontos de tempo testados.

Tabela 42: Estabilidade do produto^a de droga liofilizado

	Drug Product Formulation 200 µg/mL de substância de droga de toxina mutante A, 200 µg/mL de substância de droga de toxina mutante B, 4,5% diidrato de Trealose, 0,01% Polisorbato 80, 10mM Tris tampão pH 7,4			
Teste	t=0	1 Mês@25°C	1 Mês@40°C	3 meses @2-8°C
Aparência antes da reconstituição.	Bolo branco essencialmente livre de particuladas estranhas visíveis	Bolo branco essencialmente livre de particuladas estranhas visíveis	Bolo branco essencialmente livre de particuladas estranhas visíveis	Bolo branco essencialmente livre de particuladas estranhas visíveis
Aparência após a reconstituição.	Solução transparente e incolor	Solução transparente e incolor	Solução transparente e incolor	Solução transparente e incolor
pH	7.5	7.6	7.6	7.5
Resistência por AEX (µg/mL)	• Su bstância de droga de toxina mutante A 212 • Su bstância de droga de toxina mutante B 235	• Su bstância de droga de toxina mutante A 193 • Su bstância de droga de toxina mutante B 223	• Su bstância de droga de toxina mutante A 191 • Su bstância de droga de toxina mutante B 222	• Su bstância de droga de toxina mutante A 193 • Su bstância de droga de toxina mutante B 230
Impureza por SEC	< 2.5%	2.8%	2.8%	2.9%
Caracterização por	HMMS: 29.6% Monômero:	HMMS: 30.2% Monômero:	HMMS: 30.2% Monômero:	HMMS: 28.5% Monômero:

	Drug Product Formulation 200 µg/mL de substância de droga de toxina mutante A, 200 µg/mL de substância de droga de toxina mutante B, 4,5% diidrato de Trealose, 0,01% Polisorbato 80, 10mM Tris tampão pH 7,4			
Teste	t=0	1 Mês@25°C	1 Mês@40°C	3 meses @2-8°C
SEC	68.0%	67.1%	67.1%	68.7%
Umidade	0.5	NA	NA	NA

a O DP liofilizado é reconstituído com 60 mM NaCl de diluente para estes testes.

EXEMPLO 40: DILUENTES DA VACINA

[0808] Para a salina, 60 mM NaCl é usada como um diluente para o produto de droga liofilizado sem nenhum adjuvante para assegurar uma solução isotônica após a reconstituição.

[0809] Alhidrogel: Alhidrogel “85” 2% (Brenntag) é um produto de grau comercialmente disponível Good Manufacturing Practice (GMP) composto de folhas octahedral criatalinas de hidróxido de alumínio. Uma formulação de diluente Alhidrogel exemplar é mostrada na Tabela 43. A formulação exemplar pode ser usada em combinação com o produto de droga descrito acima.

Tabela 43. Formulação lógica para o diluente Alhidrogel	
Componente	Selecionado
Formulação da forma de dosagem	Suspensão líquida
Dose de adjuvante por 0,5 mL	0,5 mg Al
pH	6,5 ± 0,5
Tampão	10 mM His
Sal	60 mM NaCl
Fechamento de containeres	2 mL 13 mm Tipo 1 frasco de vidro sílex, Blowback, West - Flurotec

[0810] Os estudos com o adjuvante Alhidrogel mostram 100% de ligação de uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B a 1 mg Al/mL Alhidrogel a partir do pH 6,0 a 7,5. A ligação máxima de ambas as substâncias de droga foi vista na maior concentração de proteína testada (300 µg/mL cada).

[0811] A ligação das proteínas ao Alhidrogel também foi testada com a formulação de produto de droga liofilizada contendo 200 µg/mL de cada substância de droga e Alhidrogel variadno de 0,25 a 1,5 mg/ml. O produto de droga foi reconstituído com diluentes contendo as concentrações variantes de Alhidrogel e o percentual de cada toxina mutante ligada foi medido. Todas as concentrações medidas de Alhidrogel demonstraram 100% de ligação dos antígenos.

[0812] As cinéticas de ligação das proteínas ao Alhidrogel na dose almejada de uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B (200 µg/mL cada) também foram avaliadas. Os resultados mostram que 100% das substâncias de droga de toxina mutante foram ligadas ao Alhidrogel ao longo de um curso de tempo de 24 horas a RT.

[0813] CpG 24555 e Alhidrogel: CpG 24555 é um oligodeoxinucleotídeo 21-mer sintético (ODN) tendo uma sequência de mutação 5-TCG TCG TTTTTC GGT GCT TTT-3 (SEQ ID NO: 48). Uma formulação exemplar para uma combinação de CpG 24555 e diluentes Alhidrogel é mostrada na Tabela 44. A formulação exemplar pode ser usada em combinação com o produto de droga descrito acima.

Tabela 44: Formulação lógica para o diluente CpG/Alhidrogel	
Componente	Selecionado
Formulação da forma de dosagem	Suspensão líquida
Dose de adjuvante por 0,5 mL	0,5 mg Al e 1mg cpG
pH	6,5 ± 0,5
tampão	10 mM His
Sal	60 mM NaCl
Fechamento de containeres	2 mL 13 mm Tipo 1 frasco de vidro sílex, Blowback, West - Flurotec

[0814] ISCOMATRIX®: o adjuvante ISCOMATRIX® é um adjuvante a base de saponina conhecido na arte. Uma formulação exemplar para a formulação de adjuvante ISCOMATRIX® é mostrada

na Tabela 45. A formulação exemplar pode ser usada em combinação com o produto de droga descrito acima.

Tabela 45: Formulação lógica para o diluente ISCOMATRIX®	
Componente	Selecionado
Formulação da forma de dosagem	Suspensão líquida
Dose de adjuvante por 0,5 mL	45 unidades
pH	6,2 ± 0,5
Tampão	10 mM fosfato
Sal	60 mM NaCl
Fechamento de containeres	2 mL 13 mm Tipo 1 frasco de vidro sílex, Blowback, West - Flurotec

EXEMPLO 41: IMUNOGENICIDADE DE COMPOSIÇÕES DE SUBSTÂNCIA DE DROGA DE TOXINA MUTANTE ADJUVANTADA COM ALHIDROGEL EM UM MODELO NHP E COMPROVAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE CONCEITO

[0815] A imunogenicidade das composições de uma substância de droga de toxina mutante A e de uma substância de droga de toxina mutante B adjuvantadas com Alhidrogel em NHPs foi avaliada, especificamente em macacos cinomolgos. Os NHPs imunizados em intervalos de duas semanas (semanas 0, 2, 4) com 10µg de cada uma das composições da substância de droga de toxina mutante A e da substância de droga de toxina mutante B (formuladas com Alhidrogel) por dose, desenvolveram respostas antitoxina de neutralização robustas. Veja Tabela 46. Ambas as respostas de neutralização antitoxina A e antitoxina B alcançaram uma media de proteção após a Terceira imunização e permaneceram dentro ou acima da média de proteção pelo menos até a semana 33 (último período de tempo estudado).

[0816] Os macacos cinomolgos (n=8) foram imunizados IM nas semanas 0, 2 e 4 com 10 µg cada de uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B formulada em 250 µg de Alhidrogel. O soro foi coletado em cada ponto

de tempo e analisado no ensaio de neutralização de toxina para a atividade antitoxina funcional. Os GMTs são proporcionados na Tabela 46. A media de título de proteção proporcionada na tabela retrata a media de título de anticorpo de neutralização que correlaciona a uma redução significativa na recorrência de infecção por *C. difficile* no julgamento da terapia de anticorpo monoclonal da Merck.

Tabela 46: Imunogenicidade de uma substância de droga de toxina mutante A e de uma Substância de droga de toxina mutante B (Formulada em 250 µg Alhidrogel) em macacos cinomolgos (50% de título de neutralização)												
Antitoxina A (media de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)												
Sem ana:	sem ana: 0	sem ana: 1	sem ana: 2	sem ana: 3	sem ana: 4	sem ana: 5	sem ana: 6	sem ana: 8	sem ana: 12	sem ana: 25	sem ana: 29	sem ana: 33
Título:	15	19	129	382	336	2469	3069	2171	1599	1520	1545	2178
Antitoxina B (media de proteção Merck/Medarex: 222- 2,222 para a antitoxina B)												
Título:	10	10	10	10	20	311	410	446	676	1631	2970	3510

CORRELAÇÃO DE TÍTULOS DE ANTICORPO DE PROTEÇÃO HUMANO DO JULGAMENTO DE TERAPIA DE MAB DA MERCK PARA OS TÍTULOS INDUZIDOS PELOS CANDIDATOS A VACINA DA PFIZER EM NHPS

[0817] O estudo de eficácia da fase 2 com mAbs da Merck/Medarex (Lowy et al., *N Engl J Med.* 21 de janeiro de 2010; 362(3):197-205) pareceu demonstrar uma correlação entre o nível de mAbs antitoxina de neutralização no soro e a prevenção de recorrência de CDAD. Após a administração de mAbs específicos de toxina a humanos, os níveis de anticorpo no soro em humanos recipientes na faixa de 10 a 100 µg/mL parece proteger contra as recorrências (70% de redução na recorrência de CDAD).

[0818] As composições imunogênicas incluindo as substâncias de

droga de toxina mutante foram testadas para medir se as composições imunogênicas são capazes de induzir respostas de anticorpo de neutralização potencialmente eficazes em humanos comparando os dados publicados a partir do estudo da fase 2 da Merck/Medarex para os níveis de anticorpo induzido pelas composições imunogênicas no modelo NHP. Isto foi realizado utilizando características publicadas anteriormente dos mAbs da Merck/Medarex para converter a media destes mAbs no soro obtido a partir dos sujeitos que exibiram nenhum sinal de recorrência (10-100 µg/mL) em 50% de títulos de neutralização e comparando estes títulos (“média de título de proteção”) para os títulos observados nos modelos pre-clínicos descritos aqui. Como mostrado na Tabela 46, as composições imunogênicas incluindo a substância de droga de toxina mutante A e a substância de droga de toxina mutante B adjuvantada com Alhidrogel geraram respostas imunes em NHPs que alcançaram a “média de proteção” após a terceira dose e tem permanecido dentro ou acima desta média até a semana 33. O nível de anticorpos de neutralização de toxina induzidos em NHPs pela composição imunogênica de *C. difficile* inventiva é comparável aos níveis de anticorpo no soro nos sujeitos julgados pela Merck/Medarex que pareceram estar protegidos da recorrência de CDAD.

EXEMPLO 42: IMUNOGENICIDADE DE COMPOSIÇÕES DE SUBSTÂNCIA DE DROGA DE TOXINA MUTANTE ADJUVANTADA COM ISCOMATRIX OU ALHIDROGEL/CPG 24555 (ALH/CPG) NO MODELO NHP

[0819] Nos NHPs, ambos ISCOMATRIX e Alh/CpG estatisticamente aumentaram significativamente os títulos de neutralização da antitoxina A e B quando comparado a vacina administrada com o Alhidrogel sozinho (Tabela 47). As respostas antitoxina antecedentes acima foram induzidas em pontos de tempo anteriores pela vacina administrada tanto com Alh/CpG quanto com ISCOMATRIX (semana 2-4) quando comparado ao

Alhidrogel sozinho (semana 4-6), que pode ter um efeito importante na proteção da recorrência de CDAD em humanos. Comparado ao Alhidrogel, a composição imunogênica adjuvantada com Alh/CpG ou com ISCOMATRIX geraram títulos de neutralização de toxina que alcançaram a média de proteção (veja também Exemplo 41) mais rapidamente e que tem permanecido dentro ou acima desta média até a semana 33.

[0820] Como mostrado na Tabela 47, os Macacos cinomolgos foram imunizados IM nas semanas 0, 2, e 4 com 10 µg cada de uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B formulada em 250 µg de Alhidrogel (n=8), ou 500 µg de CpG + 250 µg de Alhidrogel (n=10), ou 45 U de ISCOMATRIX (n=10). O soro foi coletado em cada ponto de tempo e analisado no ensaio de neutralização de toxina descrito acima para a atividade antitoxina funcional. Os GMTs são listados nas tabelas. Os asteriscos (*) indicam significância estatística ($p < 0,05$) quando comparado aos títulos no grupo Alhidrogel. A media de título de proteção representa a média de título de anticorpo de neutralização que correlaciona uma redução significativa na recorrência de infecção por *C. difficile* de acordo com o julgamento de terapia mAb da Merck/Medarex.

Tabela 47: Imunogenicidade de Substâncias de droga de toxina mutante adjuvantadas em NHPs (50% Título de neutralização)							
Antitoxina A (media de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)							
Semana:	semana 0	semana 2	semana 4	semana 6	semana 12	semana 25	semana 33
Título Alhidrogel:	15	129	336	3069	1599	1520	2178
Alhidrogel + título CpG:	17	*1004	*2162	*15989	*7179	*5049	*7023
ISCOMATRIX Título:	25	*1283	*3835	*19511	*12904	*6992	*7971
Antitoxina B (media de proteção Merck/Medarex: 222- 2,222 para a antitoxina B)							
Título	10	10	20	410	676	1631	3510

Tabela 47: Imunogenicidade de Substâncias de droga de toxina mutante adjuvantadas em NHPs (50% Título de neutralização)							
Antitoxina A (media de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)							
Alhidrogel:							
Alhidrogel + título CpG:	10	13	*136	*2163	*5076	*9057	*27971
ISCOMATRIX Título:	10	10	*269	*5325	*9161	*19479	*25119

[0821] Uma dose de uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B administrada, na presença de adjuvantes ISCOMATRIX ou Alh/CpG, nos títulos de anticorpo antitoxina de neutralização gerados em NHPs também foram avaliados. em um estudo, os NHPs foram administrados em uma dose baixa (10µg) ou uma alta (100µg) de cada substância de droga de toxina mutante formulada em ISCOMATRIX. As respostas foram comparadas em cada ponto de tempo após a imunização. Como mostrado na Tabela 48, os títulos de antitoxina de neutralização foram robustos em ambos os grupos de tratamento. Os títulos antitoxina A foram quase equivalentes na maioria dos pontos de tempo entre o grupo de dose baixa e o de dose alta, enquanto havia uma tendência para os títulos antitoxina B de serem maiores no grupo de dose alta.

Tabela 48: títulos de antitoxina de neutralização em NHPs seguido de imunização tanto com 10µg quanto com 100µg de cada substância de droga de toxina mutante e substância de droga de Toxina mutante administrada com ISCOMATRIX (50% Título de neutralização)							
Antitoxina A (média de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para antitoxina A)							
Semana	semana 0	semana 2	semana 3	semana 4	semana 6	semana 8	semana 12
10µg Título:	11	585	3522	4519	19280	10225	12084
100 µg Título:	11	400	1212	2512	9944	10283	18337
Antitoxina B (média de proteção Merck/Medarex: 222- 2,222 para antitoxina B)							

Tabela 48: títulos de antitoxina de neutralização em NHPs seguido de imunização tanto com 10µg quanto com 100µg de cada substância de droga de toxina mutante e substância de droga de Toxina mutante administrada com ISCOMATRIX (50% Título de neutralização)							
Antitoxina A (média de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para antitoxina A)							
Semana	semana 0	semana 2	semana 3	semana 4	semana 6	semana 8	semana 12
10µg Título:	10	10	112	266	3710	2666	7060
100 µg Título:	10	10	303	469	6016	4743	20683

[0822] Como mostrado na Tabela 48, os Macacos cinomolgos (n=5) foram imunizados IM nas semanas 0, 2, e 4 com 10 µg ou 100 µg cada de uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B formulada com 45U de ISCOMATRIX. O soro foi coletado em cada ponto de tempo e analisados no ensaio de neutralização de toxina para a atividade antitoxina funcional. Os GMTs são listados na tabela. A média de título de proteção representa a média de título de anticorpo de neutralização que correlaciona com uma redução significativa na recorrência de infecção por *C. difficile* no julgamento de terapia mAb da Merck/Medarex.

[0823] Em um esforço de aumentar as cinéticas de respostas antitoxina B, os NHPs foram imunizados com uma dose constante de uma substância de droga de toxina mutante A (10 µg) que foi misturada com uma dosed aumentada da substância de droga de toxina mutante B (10, 50, ou 100 µg) na presença de adjuvantes ISCOMATRIX ou Alh/CpG. Em relação aos adjuvants, havia uma tendência para os grupos que receberam doses maiores de uma substância de droga de toxina mutante B (tanto 50 quanto 100 µg) para induzir respostas de neutralização antitoxina B em comparação a 10 µg dose de uma droga de toxina mutante B (Tabela 50, marcada com um * para indicar estatisticamente um aumento significativo). Esta tendência foi observada na maioria dos pontos

de tempo após a imunização final. Entretanto, em alguns casos, as respostas de neutralização antitoxina A mostraram estatisticamente uma diminuição significativa (marcado com um ^ na Tabela 49) quando a quantidade de uma toxina mutante B foi aumentada.

[0824] Como mostrado na Tabela 49 e na Tabela 50, os NHPs (10 por grupo) foram imunizados IM nas semanas 0, 2, e 4 com diferentes proporções de uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B (10µg de uma substância de droga de toxina mutante A mais tanto 10, 50, ou 100 µg de uma substância de droga de toxina mutante B; projetada 10A:10B, 10A:50B e 10A:100B, respectivamente, na Tabela 49 e Tabela 50), formulada com ISCOMATRIX (45U por dose) ou com Alh/CpG/ (250 µg / 500 µg por dose). A tabela 49 mostra os títulos antitoxina A. A tabela 50 mostra títulos antitoxina B. Os GMTs são listados nas tabelas. A média de título de proteção representa a média de título de anticorpo de neutralização que correlaciona com uma redução significativa na recorrência de infecção por *C. difficile* no julgamento de terapia mAb da Merck. O símbolo ^, representa estatisticamente uma diminuição significativa nos títulos de neutralização ($p < 0,05$) comparado ao grupo 10A: 10B. o símbolo asterisco *, representa estatisticamente um aumento significativo nos títulos de neutralização ($p < 0,05$) comparado ao grupo 10A: 10B.

Tabela 49: títulos antitoxina de neutralização em NHPs seguido de imunização com 10µg de Substância de droga de toxina mutante A combinada com 10, 50, ou 100 µg de substância de droga de toxina mutante B usando ISCOMATRIX ou Alh/CpG como adjuvantes (50% título de Neutralização)							
Antitoxina A (média de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)							
ISCOMATRIX							
Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
10A:10B	25	1283	3835	19511	12904	6992	7971
Título:							
10A:50B	29	906	2917	16126	^7756	^4208	5965

Tabela 49: títulos antitoxina de neutralização em NHPs seguido de imunização com 10µg de Substância de droga de toxina mutante A combinada com 10, 50, ou 100 µg de substância de droga de toxina mutante B usando ISCOMATRIX ou Alh/CpG como adjuvantes (50% título de Neutralização)							
Antitoxina A (média de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)							
ISCOMATRIX							
Título:							
10A:100B	20	982	2310	^5034	^5469	^4007	3780
Título:							
Antitoxin A (média de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)							
Alh/CpG							
10A:10B	17	1004	2162	15989	7179	5049	7023
Título:							
10A:50B	20	460	1728	16600	6693	6173	8074
Título:							
10A:100B	27	^415	1595	13601	6465	5039	6153
Título:							
Tabela 50: os títulos antitoxina de neutralização em NHPs seguido de imunização com 10µg de substância de droga de toxina mutante A combinada com 10, 50, ou 100 µg de substância de droga de toxina mutante B usando ISCOMATRIX ou Alh/CpG como adjuvantes (50% título de Neutralização)							
Antitoxin B (média de proteção Merck/Medarex: 222- 2,222 para antitoxina B)							
Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
ISCOMATRIX	10	10	269	5325	9161	19479	25119
Título:							
Título:	13	*20	*604	4861	10801	20186	*57565
Título:	10	*23	*862	*10658	10639	*33725	*56073
Antitoxin B (média de proteção Merck/Medarex: 222- 2,222 para antitoxina B)							
Alh/CpG	10	13	136	2163	5076	9057	27971
Título:							

Tabela 49: títulos antitoxina de neutralização em NHPs seguido de imunização com 10µg de Substância de droga de toxina mutante A combinada com 10, 50, ou 100 µg de substância de droga de toxina mutante B usando ISCOMATRIX ou Alh/CpG como adjuvantes (50% título de Neutralização)

Antitoxina A (média de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)

ISCOMATRIX

Título:	10	15	*450	*5542	*9843	15112	50316
Título:	11	17	*775	*13533	*11708	*17487	26600

Exemplo 43: estudo de toxicidade de cinco semanas dose repetida IM com uma composição imunogênica em macacos cinomolgos, com um período de recuperação de 4 semanas

[0825] O estudo de toxicidade de 5 semanas IM de dose repetida com PF-06425095 (uma composição imunogênica incluindo uma substâncias de droga de toxina mutante tripla A e uma substância de droga de toxina mutante tripla B em uma combinação com adjuvantes de hidróxido de alumínio e CpG 24555) em macacos cinomolgos foi conduzido para avaliar a toxicidade potencial e a imunogenicidade da suabtância de droga de toxina mutante tripla A e a substância de droga de toxina mutante tripla B de *C. difficile* em combinação com os adjuvantes de hidróxido de alumínio e CpG 24555 (PF-06425095). O PF-06425095 a 0,2 ou 0,4 mg/dose de substância de droga de toxina mutante tripla A e de substância de droga de toxina mutante tripla B (grupos de composição imunogênica de dose alta e baixa, respectivamente), 0,5 mg de alumínio como hidróxido de alumínio, e 1 mg CpG 24555 e a combinação de adjuvante sozinho (hidróxido de alumínio + CpG 24555; PF-06376915) foram administrados IM aos macacos cinomolgos (6/sex/grupo) como uma primeira dose seguida por 3 doses de reforço (Dias 1, 8, 22, e 36). Um grupo separado de animais (6/sex) recebeu 0,9% de salina isotônica em um pH aproximado de 7,0. O veículo de composição imunogênica foi composto de 10 mM Tris tampão ao pH 7,4, 4,5% diidrato de trealose, e 0,1% polisorbato 80. O veículo de controle de adjuvante foi

composto de 10 mM tampão de histidina com 60 mM NaCl ao pH 6,5. O volume de dose total foi de 0,5 mL por injeção. Todas as doses foram administradas nos músculos dos quadríceps esquerdo e/ou direito. Os animais selecionados se submeteram a um período de observação de 4 semanas livre de dose para avaliar a reversibilidade de qualquer efeito observado durante a fase de dosagem do estudo.

[0826] Não houve descobertas adversas neste estudo. O PF-06425095 foi bem tolerado e produziu apenas uma reação inflamatória local sem evidência de toxicidade sistêmica. Durante a fase de dosagem, a dose dependente aumentou a partir do pre-teste em fibrinogênio (23,1% a 2,3x) nos Dias 4 e 38 e proteína reativa C nos Dias 4 (2,1x a 27,5x) e 38 (2,3x a 101,5x), e globulina (11,1% a 24,1%) no dia 36 e/ou 38, foram vistos nos grupos tratados pela composição imunogênica e foram consistentes com a resposta inflamatória esperada para a administração de uma composição imunogênica adjuvantada.

[0827] O aumento no fibrinogênio e na proteína reativa C notada no dia 4 tiveram recuperado parcialmente pelo dia 8 com o aumento no fibrinogênio (25,6% a 65,5%) e a proteína reativa C (4,5x e 5,6x) no grupo de composição imunogênica de dose alta apenas. O aumento na interleucina (IL)-6 foi observado nos grupos de composição imunogênica de dose alta e baixa no dia 1, Hora 3 (8,3x a 127,2x valores individuais dia 1, Hora 0, dose responsiva) e Dia 36, Hora 3 (9,4x a 39,5x valores individuais dia 36, Hora 0). Não houve mudança observada nas outras citocinas (IL-10, IL-12, Interferon-proteína induzível (IP-10), e fator de necrose de tumor α (TNF- α). O aumento nestas proteínas de fase aguda e na citocina foram parte da resposta fisiológica normal esperada para a administração de um antígeno estranho. Não houve alterações relacionadas ao adjuvante ou relacionadas ao PF 06425095 nestes parâmetros patológicos

clínicos na fase de recuperação (citocinas não foram avaliadas durante a fase de recuperação). Além disso, houveram mudanças localizadas nos locais de injeção, que foram de incidência similar e gravidade no grupo de controle de adjuvante e os grupos de composição imunogênica de alta e baixa; por isso, não foram relacionados diretamente ao PF-06425095. Durante a fase de dosagem, as mudanças incluíram uma inflamação ativa crônica mínima a moderada que foi caracterizada pela separação das fibras dos músculos por infiltração de macrófagos, que geralmente continham material granular basofílico (interpretado como adjuvante contendo alumínio), linfócitos, células de plasma, neutrófilos, eosinófilos, restos necróticos, e edema. O material granular basofílico também esteve presente extracelularmente dentro destes focos de inflamação atípicos crônicos. No final da fase de recuperação, havia uma inflamação crônica mínima a moderada e infiltrado celular mononuclear, e fibrose mínima. Estas descobertas de locais de injeção representam uma resposta inflamatória local para o adjuvante. Outras mudanças microscópicas incluem uma celularidade linfóide aumentada de mínimo a moderado no nó de linfa ilíaco (drenagem) e celularidade aumentada mínima nos centros germinais no baço que não foram durante a fase de dosagem no grupo de controle de adjuvante e nos grupos de composição imunogênica de alta e baixa dose. Ao final da fase de recuperação, estas descobertas microscópicas foram de menor gravidade. Estes efeitos representam uma resposta imunogênica a estimulação antigênica, e foi uma resposta farmacológica ao adjuvante ou PF-06425095. Não houve um aumento relacionado ao artigo teste nos anticorpos anti-DNA.

[0828] Com base na ausência de descobertas adversas, a não observação de um nível de efeitos adversos neste estudo é o grupo de composição imunogênica de alta dose (0,4 mg de substância de droga

de toxina mutante tripla A e a substância de droga de toxina mutante tripla B/dose como PF-06425095) administrada como duas injeções de 0,5 mL para quatro doses.

EXEMPLO 44: EFICÁCIA DO SORO NHP SOROPOSITIVO TRANSFERIDO PASSIVAMENTE PARA RAMISTERS

[0829] Foi administrado aos grupos de 5 ramisters dourados Syrian uma dose oral do antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para romper a flora intestinal normal. Após cinco dias, os ramisters foram desafiados com uma dose oral de esporos de *C. difficile* do tipo selvagem (630 cepas, 100 cfu por animal), e administrados intraperitonealmente (IP) com soro NHP de acordo com a Tabela 51. Sem estar limitado pela teoria ou mecanismo, os sintomas da doença seguindo o desafio com os esporos tipicamente se manifestaram começando cerca de 30-48 horas após o desafio.

[0830] O soro NHP que foi administrado aos ramisters foi agrupado a partir de amostras de soro NHP exibindo o maior título (soro antitoxina A e soro antitoxina B) seguido por três imunizações com uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B (proporções de 10:10, 10:50, e 10:100 A:B), formulada com ISCOMATRIX (veja o Exemplo 42, Tabela 49, e Tabela 50). O soro NHP foi coletado a partir dos pontos de tempo nas semanas 5, 6, e 8 (as imunizações ocorreram nas semanas 0, 2, e 4), como descrito em Examine 42. Os resultados são mostrados nas Tabelas 52-54 abaixo. O símbolo “+” indica um meio geométrico (GM) em () que não inclui o animal #3, não respondedor. “*TB” representa o sangramento terminal, o dia em que o animal foi sacrificado, que não é o mesmo para todos os animais.

Tabela 51: projeto experimental				
Grupo	Composição administrada	No. animais	Rota	Esquema
1 “1 dose”	Soro NHP soropositivo (não concentrado)	5	IP	Dia do desafio 0 Dose dia 0

Tabela 51: projeto experimental								
Grupo	Composição administrada			No. animais	Rota	Esquema		
						Dias de sangramento 0, 1, 2, TB no dia 11		
2 "2 dose"	Soro NHP soropositivo (não concentrado)			5	IP	Dia do Desafio 0 Dose dias 0, 1 Dias de sangramento 0, 1, 2, TB no dia 11		

Tabela 52: títulos de neutralização Antitoxina A no soro de ramisters seguindo 1 ou 2 IP doses de soro NHP (50% de título de neutralização em RLU)								
	Dia	Ramister 1	Ramister 2	Ramister 3	Ramister 4	Ramister 5	GM	SE
1 dose	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	2877	4008	2617	4917	1872	3081	538
	D2	1983	3009	2750	2902	1117	2214	357
	TB*	3239 (d4)	537 (d9)	155 (d11)	977 (d9)	972 (d2)	762	538
2 dose	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1154	2819	50	429	1174	606 (1131) ⁺	475
	D2	4119	4674	1899	545		2113	862
	TB*	1236 (d9)	1267 (d8)	1493 (d4)	50 (d11)	1877 (d9)	738	306

Entrada de soro NHP = 41976								

Tabela 53: títulos de neutralização Antitoxina B no soro de ramisters seguindo 1 ou 2 IP doses de soro NHP (50% de título de neutralização em RLU)								
	Dia	Ramister 1	Ramister 2	Ramister 3	Ramister 4	Ramister 5	GM	SE
1 dose	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1846	4254	1347	5178	406	1859	904
	D2	992	1795	2585	2459	1145	1669	327

Tabela 53: títulos de neutralização Antitoxina B no soro de ramisters seguindo 1 ou 2 IP doses de soro NHP (50% de título de neutralização em RLU)								
	Dia	Ramister 1	Ramister 2	Ramister 3	Ramister 4	Ramister 5	GM	SE
	TB*	1744 (d4)	50 (d9)	50 (d11)	265 (d9)	544 (d2)	229	317
2 dose	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
Input NHP sera = 23633								

Tabela 54: porcentagem de ramisters protegidos de um CDAD grave seguindo 1 ou 2 IP doses de soro NHP								
Dias pos- infecção	0	2	4	6	8	10	11	
1 dose de soro NHP	100%	80%	60%	60%	60%	20%	20%	
2 dose de soro NHP	100%	100%	80%	80%	60%	20%	20%	
Placebo	100%	75%	50%	25%	0%	n/a	n/a	

[0831] Em outro estudo, os ramisters dourados Syrian foram administrados com uma dose de antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para romper a flora intestinal normal. Após cinco dias, os ramisters foram desafiados com uma dose oral de esporos de *C. difficile* do tipo selvagem (630 cepas, 100 cfu por animal), e administrados intraperitonealmente (IP) o soro NHP de acordo com a Tabela 55. Sem estar limitado pela teoria ou mecanismo, os sintomas da doença seguindo o desafio dos esporos tipicamente se manifestaram

começando cerca de 30-48 horas pos-desafio.

[0832] O soro NHP que foi administrado aos ramisters foi agrupado a partir de amostras coletadas de NHP seguido por três imunizações com uma substância de droga de toxina mutante A e uma substância de droga de toxina mutante B (proporções de 10:10, 10:50, e 10:100 A:B), formulada com Alhidrogel e CpG 24555 (veja Exemplo 42, Tabela 49, e Tabela 50). O soro NHP foi coletado a partir dos pontos de tempo nas semanas 5, 6, 8 e 12 como descrito em Examine 42. Os resultados são mostrados nas Tabelas 56-59 abaixo. O soro dos ramisters foi ainda investigado para determinar o valor de concentração inibitório (IC₅₀), que foi determinado usando o ensaio de neutralização ode toxina descrito acima. O nível anticorpo de neutralização de toxina induzido em ramisters pela composição imunogênica de *C. difficile* inventiva é comparável aos níveis de anticorpo no soro no julgamento dos sujeitos pela Merck/Medarex que pareceram estar protegidos da recorrência de CDAD.

Tabela 55: projeto experimental				
Grupo	Composição administrada	No.	Rota	Esquema
1	Soro NHP soropositivo	5	IP	Desafio D0 Dose D0, 1, 3, 5, 7
2	Soro NHP soropositivo	5	IP	Sem desafio Dose D0, 1, 3, 5, 7,
3	Soro NHP soropositivo	10	IP	Desafio D0 Dose D0, 1, 3, 5, 7
4	Placebo	5	IM	Desafio D0

Tabela 56: Títulos ^a de neutralização antitoxina A no soro de ramisters seguindo 1 ou 2 IP doses de soro NHP (50% de título de neutralização em RLU)			
Dia	Desafiados (Grupos 1 e 3)	Não desafiados (Grupo 2)	Valor p
0	11	12	0,5933
1	380	720	0,034*
3	666	1220	0,0256*
5	864	1367	0,0391*

7	564	1688	0,0411*
11	263	1281	0,001*
Entrada de soro NHP agrupado = 9680 a, títulos expressos como meios geométricos para cada grupo (n=15 no dia 0 para o grupo de “desafio”, n=5 para o grupo “não desafiado”) média de proteção Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A O asterisco “*” indica uma diferença significativa.			

Tabela 57: Títulos ^a de neutralização antitoxina B no soro de ramisters seguindo 1 ou 2 IP doses de soro NHP (50% de título de neutralização em RLU)			
Dia	Desafiados (Grupos 1 e 3)	Não desafiados (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*
Entrada de soro NHP agrupado = 19631 a, títulos expressos como meios geométricos para cada grupo (n=15 no dia 0 para o grupo “desafiado”, n=5 para o grupo “não desafiado”) média de proteção Merck/Medarex: 222- 2,222 para a antitoxina B O asterisco “*” indica uma diferença significativa.			

Tabela 58: porcentagem de ramisters protegidos de um CDAD grave seguido de IP dose de soro NHP							
Dias pos-infecção	0	2	4	6	8	10	11
Grupos 1 e 3	100%	73%	53%	53%	47%	33%	33%
Placebo (Grupo 2)	100%	50%	0%				

Tabela 59: valores IC ₅₀ a partir dos títulos de neutralização 50% específicos de toxina														
		IC ₅₀ de AntiToxina A							IC ₅₀ de AntiToxina B					
		Dia de Pós Dose							Dia de Pós Dose					
Desafiado	Animal ID	0	1	3	5	7	11	Animal ID	0	1	3	5	7	11
	1-1	10	50	338	morreu D4			1-1	10	50	254	morreu D4		
	1-2	10	614	579	777	605	192	1-2	10	720	659	896	475	157
	1-3	10	710	1035	845	548	morreu D10	1-3	10	867	1017	988	694	

Tabela 59: valores IC ₅₀ a partir dos títulos de neutralização 50% específicos de toxina															
	1-4	10	850	588	942	1116	296	1-4	10	1158	555	1158	1806	250	
	1-5	10	780	895*				1-5	10	910	687*				
	3-1	10	647	morreu D2				3-1	10	598	morreu D2				
	3-2	10	331	morreu D2				3-2	10	290	morreu D2				
	3-3	10	660	1273	849	692	640	3-3	10	717	1623	870	791	574	
	3-4	10	536	493	1102	1314	morreu D9	3-4	10	618	598	977	1478	morreu D9	
	3-5	10	817	807	774	1077	187	3-5	10	772	1260	850	913	243	
	3-6	10	117	649	803	50	186	3-6	10	1038	773	883	50	50	
	3-7	10	50	morreu D2				3-7	10	50	morreu D2				
	3-8	10	149	659	650*			3-8	10	121	1010	517*			
	3-9	30	797	1170*				3-9	10	1008	1720*				
	3-10	10	792	morreu D2				3-10	10	835	morreu D2				
	GeoMean	11	380	666	864	564	263	GeoMean	10	465	765	941	611	194	
Não desafiado	Erro padrão	1	78	86	41	163	88	Erro padrão	0	94	125	38	224	88	
	2-1	10	697	1634	1597	2219	1709	2-1	10	890	1777	1910	3229	1355	
	2-2	10	779	1207	1322	1755	1327	2-2	10	939	1378	1564	1897	1379	
	2-3	10	581	669	722	1401	1118	2-3	10	828	837	865	1484	1404	
	2-4	26	856	1540	1875	1830	1826	2-4	10	748	1780	2939	1880	2650	
	2-5	10	715	1331	1668	1374	744	2-5	10	752	1475	2064	1364	880	
	GeoMean	12	720	1220	1367	1688	1281	GeoMean	10	828	1400	1734	1877	1436	
	Erro padrão	3	46	169	199	156	197	Erro padrão	0	38	173	338	332	296	

*= falecido naquele dia

*= falecido naquele dia

EXEMPLO 45: CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DE DROGA DE TOXINA MUTANTE

[0833] A estrutura primária da toxina mutante tripla A é mostrada na SEQ ID NO: 4. O resíduo NH₂-terminal Met na posição 1 da SEQ ID NO: 4 é originado do códon de iniciação da SEQ ID NO: 12 e é ausente na proteína isolada (por exemplo, veja SEQ ID NO: 84). Portanto, do Exemplo 12 ao Exemplo 45, “SEQ ID NO: 4” refere-se a SEQ ID NO: 4 onde a metionina inicial (na posição 1) é ausente. Ambas toxinas mutante tripla A purificadas (SEQ ID NO: 4) (substância de droga intermediária - Lot L44993-132) e toxina mutante tripla A tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) (“substância de droga de toxina mutante A” - Lot L44898-012) exibiu uma sequência única NH₂-

terminal iniciando em SLISKEELIKLAYS (posições 2-16 a SEQ ID NO: 4).

[0834] A estrutura primária da toxina mutante tripla B é mostrada na SEQ ID NO: 6. O resíduo NH₂-terminal Met na posição 1 da SEQ ID NO: 6 é originado do códon de iniciação e é ausente na proteína isolada (por exemplo, veja SEQ ID NO: 86). Portanto, do Exemplo 12 ao Exemplo 45, "SEQ ID NO: 6" refere-se a SEQ ID NO: 6 onde a metionina inicial na posição 1) é ausente. Ambas toxinas mutante tripla B purificadas (SEQ ID NO: 6) (substância de droga intermediária - Lot 010) e toxina mutante tripla B tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 6) ("substância de droga de toxina mutante B" - Lot L44906-153) exibiu uma sequência única NH₂-terminal iniciando em SLVNRKQLEKMANVR (posições 2-16 da SEQ ID NO: 6).

[0835] A espectroscopia de dicroísmo circular (CD), foi usada para avaliar a estrutura secundária e terciária da substância de droga toxina mutante A e a mutante tripla A (SEQ ID NO: 4). A espectroscopia CD também foi usada para avaliar a estrutura secundária e terciária da toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6) e da substância de droga de toxina mutante B. a espectroscopia também foi usada para avaliar os efeitos potenciais do pH na estrutura. O efeito do tratamento EDC na toxina mutante tripla A foi analisado comparando os dados CD obtidos para a substância de droga de toxina mutante A com os dados obtidos para a toxina mutante tripla A. o efeito do tratamento EDC na toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6) foi analisado comparando os dados CD obtidos para a substância de droga de toxina mutante B com os dados obtidos para a toxina mutante tripla B.

[0836] Os dados de CD UV-longe substância de droga de toxina mutante A foram obtidos em vários pH. O espectro gravado no pH 5,0-7,0 é indicativo de alta proporção de α -hélices na segunda estrutura, sugerindo que a espinha do polipeptídeo da proteína adota uma

conformação bem definida dominada pelas α -hélices.

[0837] O espectro CD UV-perto da substância de droga de toxina mutante A também foram obtidos. Uma elipticidade negativa forte entre 260 e 300 nm é uma indicação de que as cadeias laterais aromáticas estão em um único ambiente rígido, isto é, a substância de droga de toxina mutante A possui uma estrutura terciária. Na verdade, os aspectos da característica aparecendo dos tipos individuais de cadeias laterais aromáticas podem ser distinguidos dentro do espectro: ombro a ~290 nm e o pico negativo maior a ~283 nm são devido a absorção da luz polarizada pelas cadeias laterais de triptofano ordenadas, o pico negativo a 276 nm é da cadeias laterais de tirosina, e os ombros menores a 262 e 268 nm são indicativos de resíduos de fenilalanina participantes dos contatos terciários. Os resultados de longe- e perto-UV proporcionam evidências de que a substância de droga de toxina mutante A retém compactamente uma estrutura dobrada no pH fisiológico. Quase idêntico o espectro CD longe- e perto-UV observado no pH 5,0 – 7,0 indicou que nenhuma mudança estrutural detectável aconteceu dentro desta faixa de pH. Os dados CD não puderam ser coletados no pH 3,0 e 4,0, uma vez que a proteína foi insolúvel nestes pontos de pH. Na comparação do espectro CD longe- e perto-UV da substância de droga de toxina mutante A com aqueles da toxina mutante tripla A, o espectro de ambas as proteínas são essencialmente idênticos sob todas as condições experimentais estudadas, indicando que o tratamento EDC não tinha efeitos detectáveis na estrutura secundária e terciária da toxina mutante tripla A. esta descoberta está de acordo com a filtragem de gel e os resultados analíticos de ultracentrifugação, que mostram nenhuma mudança no raio Stokes e coeficientes de sedimentação/fricção, respectivamente.

[0838] A substância de droga de toxina mutante A (assim como a toxina mutante tripla A) contém 25 resíduos de triptofano que estão

separados por toda a sequência primária e podem servir como sondas fluorescentes intrínsecas convenientes. O espectro de emissão fluorescente de uma substância de droga de toxina mutante A entre 300 e 400 nm como uma função de temperatura foram obtidos. A 6,8°C a substância de droga de toxina mutante A mostra características de espectro de emissão fluorescente de triptofano após excitação a 280 nm. A emissão fluorescente máxima é observada a ~335 nm, indicando que os resíduos de triptofano estão em um ambiente não polar, típico dos interiores de proteína em vez de ambientes aquosos polares. Os resultados de espectro de emissão fluorescente, junto com os resultados dos experimentos CD apresentados neste relatório, confirmam que a substância de droga de toxina mutante A retém uma estrutura dobrada compacta.

[0839] A fluorescência da sonda extrínseca de ácido sulfônico 8-anilino-1-naftaleno (ANS) foi usada para caracterizar uma possível mudança conformacional na substância de droga de toxina mutante A e na toxina mutante tripla A após as mudanças no pH. Como pode ser visto a partir dos resultados, não há essencialmente um aumento na intensidade de fluorescência ANS tanto quando a substância de droga de toxina mutante A quanto toxina mutante tripla A são tituladas com a sonda no pH 7,0, sugerindo que nenhuma superfície hidrofóbica está exposta nas proteínas sob estas condições. A mudança do pH para 2,6 leva a um aumento dramático no rendimento da quantidade fluorescente de ANS após o aumento da concentração na sonda, até que o rendimento da quantidade fluorescente alcance uma saturação aparente. Este aumento no rendimento da quantidade de fluorescência ANS indica que no pH baixo (2,6), ambas a substância de droga de toxina mutante A e a toxina mutante tripla A se submetem a mudança conformacional induzida por pH que expõe as superfícies hidrofóbicas. Tais mudanças conformacionais indicam que a modificação induzida

por EDC e a inativação da toxina mutante tripla A não restringe a plasticidade conformacional da substância de droga de toxina mutante A (DS).

[0840] O efeito do tratamento por EDC nas propriedades hidrodinâmicas da toxina mutante tripla A foi avaliado usando uma cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna G4000 SWXL. A substância de droga de toxina mutante A e a toxina mutante tripla A foram injetadas na coluna G4000 SWXL equilibrada ao pH 7,0, 6,0, e 5,0. Os dados indicam que nenhuma diferença no raio de Stoke de uma substância de droga de toxina mutante A e de uma toxina mutante tripla A pode ser detectado usando uma cromatografia de exclusão de tamanho. Portanto, o tratamento com EDC não afetou dramaticamente as propriedades hidrodinâmicas e, correspondentemente, o formato da molécula toda da toxina mutante tripla A.

[0841] Outra análise da toxina mutante tripla A e da substância de droga de toxina mutante A foi realizada usando uma técnica de espalhamento de luz a laser multi-ângulo (MALLS). O tratamento da toxina mutante tripla A com EDC resultou na geração de uma mistura heterogênea composta de várias espécies monoméricas e multiméricas. Tal heterogeneidade reflete na introdução de um grande número de ligações covalentes inter e intramoleculares induzidas por EDC entre carboxis e aminas primárias da proteína.

[0842] Os dados obtidos proporcionam características física e química da toxina mutante tripla A e da substância de droga de toxina mutante A (toxina mutante tripla A tratada com EDC) e descreve os aspectos chave de sua estrutura primária, secundária e terciária. Os dados gerados demonstram que o tratamento da toxina mutante tripla A com EDC resultou em uma modificação covalente de sua cadeia de polipeptídeo, mas não afetou as estruturas secundária e a terciária da

proteína. O tratamento com EDC leva a ligação em cruz intra e intermolecular. Os parâmetros bioquímicos e biofísicos obtidos para a substância de droga de toxina mutante A (assim como para a toxina mutante tripla A) são apresentados na Tabela 60.

Tabela 60: parâmetros bioquímico e biofísico maiores obtidos para a toxina mutante tripla A (SEQ ID NO: 4) e a substância de droga de Toxina mutante A		
Parâmetro	Toxina mutante tripla A (SEQ ID NO: 4)	Substância de droga de Toxina mutante A
Número de resíduos de aminoácidos	2709	2709
Sequência N-terminal	SLISKEELIKLAYSI (posições 2-16 da SEQ ID NO: 4)	SLISKEELIKLAYSI (posições 2-16 da SEQ ID NO: 4)
Massa de mol (da sequência AA)	308 kDa	308 kDa
Masa de mol (da SEC-MALLS)	299 kDa	300 kDa e 718 -1139 kDa
Extinção do coeficiente a 280 nm	1,292 ou 1,275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,292 ou 1,275 275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
pl teórico	5,57	ND
Volume de mol específico parcial a 20 °C	0,735 cm ³ /g	0,735 cm ³ /g
Volume/monômero anidro	3,8x10 ⁻¹⁹ cm ³	3,8x10 ⁻¹⁹ cm ³
Coeficiente/monômero de sedimentação	9,2S	9,2S
Proporção de coeficiente friccional (f/f ₀)	1,69	1,69
Raio de Stokes /monômero	78,4±1,1	77,9
Fluorescência max (λ _{ex} = 280 nm)	334-335 nm	334-335 nm
Espectro mínimo CD perto-UV CD	284 nm e 278 nm	284 nm e 278 nm
Principal res elipticidade a 284 & 278 nm	-138±7 & -130±7	-138±8 & 131±10

Tabela 60: parâmetros bioquímico e biofísico maiores obtidos para a toxina mutante tripla A (SEQ ID NO: 4) e a substância de droga de Toxina mutante A		
Principal res elipticidade a 222 nm	-8989±277	-7950±230
Máxima transição não dobrada DSC (PBS, pH 7,4)	47,3 °C e 53,6 °C	47,9±0,2 °C e 54,1±0,2 °C

[0843] Os dados CD longe-UV da substância de droga de toxina mutante B foram obtidos em vários pH. O espectro gravado no pH 5,0-7,0 é indicativo da alta proporção de α -hélices na segunda estrutura, sugerindo que a espinha do polipeptídeo da proteína adota uma conformação bem definida dominada pelos α -hélices.

[0844] O espectro CD UV-perto da substância de droga de toxina mutante B também foram obtidos. Uma elipticidade negativa forte entre 260 e 300 nm é uma indicação de que as cadeias laterais aromáticas estão em um único ambiente rígido, isto é, a substância de droga de toxina mutante B possui uma estrutura terciária. Na verdade, os aspectos da característica aparecendo dos tipos individuais de cadeias laterais aromáticas podem ser distinguidos dentro do espectro: ombro a ~290 nm e o pico negativo maior a ~283 nm são devido a absorção da luz polarizada pelas cadeias laterais de triptofano ordenadas, o pico negativo a 276 nm é da cadeias laterais de tirosina, e os ombros menores a 262 e 268 nm são indicativos de resíduos de fenilalanina participantes dos contatos terciários. O espectro CD longe- e perto-UV proporciona evidências de que a substância de droga de toxina mutante B retém compactamente uma estrutura dobrada no pH fisiológico. Muito similar ao espectro CD longe- e perto-UV observado no pH 5,0 – 7,0 indicou que nenhuma mudança estrutural secundária ou terciária detectável aconteceu dentro desta faixa de pH. Os dados CD não puderam ser coletados no pH 3,0 e 4,0, uma vez que a proteína foi insolúvel nestes pontos de pH.

[0845] Comparando o espectro CD longe e perto-UV de uma

substância de droga de toxina mutante B com aquelas da toxina mutante tripla B, o espectro de ambas as proteínas é muito similar entre o pH 5,0 e 7,0, indicando que o tratamento com EDC não teve efeitos detectáveis na estrutura secundária e terciária da proteína.

[0846] A toxina mutante tripla B contém 16 resíduos de triptofano que são espalhadas em toda a sequência primária e pode servir como sondas fluorescentes intrínsecas convenientes. O espectro de emissão de fluorescência de uma substância de droga de toxina mutante B entre 300 e 400 nm como uma função de temperatura foram obtidos. A 7°C a substância de droga de toxina mutante B mostra características de espectro de emissão fluorescente de triptofano após a excitação a 280 nm. O máximo de emissão fluorescente é observado a ~335 nm, indicando que os resíduos de triptofano estão em um ambiente não polar, típico de interiores de proteína em vez de ambientes aquosos polares. Este resultado, junto com os resultados de experimentos CD (veja acima), confirmam que a substância de droga de toxina mutante B retém a estrutura dobrada compacta.

[0847] A fluorescência da sonda extrínseca de ácido sulfônico 8-anilino-1-naftaleno (ANS) foi usada para caracterizar uma possível mudança conformacional na substância de droga de toxina mutante B e na toxina mutante tripla B após as mudanças no pH. Como pode ser visto a partir dos resultados, não há essencialmente um aumento na intensidade de fluorescência ANS tanto quando a substância de droga de toxina mutante B quanto a toxina mutante tripla B são tituladas com a sonda no pH 7,0, sugerindo que nenhuma superfície hidrofóbica está exposta nas proteínas sob estas condições. A mudança do pH para 2,6 leva a um aumento dramático no rendimento da quantidade fluorescente de ANS após o aumento da concentração na sonda na presença de uma substância de droga de toxina mutante B, até que o rendimento da quantidade fluorescente alcance uma saturação

aparente. Este aumento no rendimento da quantidade de fluorescência ANS indica que em um pH baixo (2,6), a substância de droga de toxina mutante B se submete a mudança conformacional induzida por pH que expõe as superfícies hidrofóbicas. Tais mudanças conformacionais indicam que a modificação induzida por EDC e a inativação da toxina mutante tripla B não restringe a plasticidade conformacional da substância de droga de toxina mutante B (DS).

[0848] O efeito do tratamento por EDC nas propriedades hidrodinâmicas da toxina mutante tripla B foi avaliado usando uma cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna G4000 SWXL. A substância de droga de toxina mutante B e a toxina mutante tripla B foram injetadas na coluna G4000 SWXL equilibrada ao pH 7,0, 6,0, e 5,0. Os dados indicam que nenhuma diferença no raio de Stoke de uma substância de droga de toxina mutante B e de uma toxina mutante tripla B pode ser detectado usando uma cromatografia de exclusão de tamanho, portanto, o tratamento com EDC não afetou dramaticamente as propriedades hidrodinâmicas e, correspondentemente, o formato da molécula toda da proteína.

[0849] Outra análise da toxina mutante tripla B e da substância de droga de toxina mutante B foi realizada usando uma técnica de espalhamento de luz a laser multi-ângulo (MALLS). O tratamento da toxina mutante tripla B com EDC resultou na geração de uma mistura heterogênea composta de várias espécies monoméricas e multiméricas. Tal heterogeneidade reflete na introdução de um grande número de ligações covalentes inter e intramoleculares induzidas por EDC entre carboxis e aminas primárias da proteína.

[0850] Os dados obtidos proporcionam características física e química da toxina mutante tripla B e da substância de droga de toxina mutante B (toxina mutante tripla B tratada com EDC) e descreve os aspectos chave de sua estrutura primária, secundária e terciária. Os

dados gerados demonstram que o tratamento da toxina mutante tripla B com EDC resultou em uma modificação covalente de sua cadeia de polipeptídeo, mas não afetou as estruturas secundária e a terciária da proteína. O tratamento com EDC leva a ligação em cruz intra e intermolecular. Os parâmetros bioquímicos e biofísicos obtidos para a substância de droga de toxina mutante B (assim como para a toxina mutante tripla B) são apresentados na Tabela 61.

Tabela 61: Tabela 60: parâmetros bioquímico e biofísico maiores obtidos para a toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6) e a substância de droga de Toxina mutante B		
Parâmetro	Toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6)	Substância de droga de Toxina mutante B
Número de resíduos de aminoácidos	2365	2365
Sequência N-terminal	SLVNRKQLEKMANVR (posições 2-16 da SEQ ID NO: 6)	SLVNRKQLEKMANVR (posições 2-16 da SEQ ID NO: 6)
Masa de mol (da sequência AA)	269,5 kDa	269,5 kDa
Masa de mol (da SEC-MALLS)	255 kDa e ~1,754 kDa	264, 268, 706, e 2,211 kDa
Extinção do coeficiente a 280 nm	1,067 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,067 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
pI teórico	4,29	ND
Volume de mol específico parcial a 20 °C	0,734 cm ³ /g	0,734 cm ³ /g
Volume/monômero anidro	3,3x10 ⁻¹⁹ cm ³	3,3x10 ⁻¹⁹ cm ³
Coeficiente/monômero de sedimentação	9,1±0,2S	9,4S
Proporção de coeficiente friccional (f/f ₀)	1,58±0,03	1,53
Raio de Stokes /monômero	76,2	76,2
Fluorescência max (λ _{ex} = 280 nm)	335 nm	335 nm
Espectro mínimo CD perto-UV CD	290, 283, 276, 268, 262 nm	290, 283, 276, 268, 262 nm
Espectro mínimo CD longe-UV CD	208 e 222 nm	208 e 222 nm

Tabela 61: Tabela 60: parâmetros bioquímico e biofísico maiores obtidos para a toxina mutante tripla B (SEQ ID NO: 6) e a substância de droga de Toxina mutante B		
Ponto médio de transição de desdobramento DSC T _{m1} e T _{m2} (PBS, pH 7,0)	48,8±0,0 °C e 52,0±0,1 °C	48,2±0,3 °C e 54,3±0,2 °C

EXEMPLO 46: PERFUSÃO DE FERMENTAÇÃO PARA O TOXÓIDE B (MUTANTE TRIPLO)

[0851] As culturas de semente Toxóide B (mutante triplo): inocularam cada garrafa de 1L contendo 400 mL de meio com 1 mL semente, incubada a 37°C, imóvel durante a noite (~15 hrs). O OD₆₀₀ final deve ser 3,0 – 4,0. Volume de funcionamento: 3L (2,7L meio+ 300 mL inóculo). Cada fermentador tinha 1 impulsor Rushton e um tubo de asperção. As condições iniciais: Temperatura: 37 °C, N₂ fluxo: ~0,5 vvm, asperção. Controladores: pH controlado a 7,0 com 5N NaOH. Espuma controlada pela adição automática de PPG-2000, com 0,25 mL/L adicionado ao meio fermentador antes da esterilização.

[0852] A cultura de perfusão do *C. difficile* foi realizada usando uma pilha de 2 SARTOCON Slice Cassetes, 0,2 µm tamanho do poro do material filtrante HYDROSART, 0,1 metro quadrado da área de superfície por cassete. 3L foram adicionados aos fermentadores em um vidro do fermentador de 10 L. a perfusão iniciou quando o OD alcançou o alvo de ~4 por 2 horas de intervalos de velocidade aumentada como 0,75 L/hr, 1,5 L/hr, 2,25 L/hr, 3 L/hr por exemplo 1, Figura 28. A perfusão iniciou-se com o meio de fermentação quando o OD alcançar o alvo de ~4 por 2 horas de intervalos de velocidade aumentada como 0,75 L/hr, 1,5 L/hr, 3 L/hr, e 6 L/hr por exemplo 2, Figura 29. No sinal inicial para a perfusão, a bomba de recirculação foi iniciada na velocidade desejada a 1,3 L/min fluxo cruzado.

[0853] Exemplo 1, Figura 28: OD 50 final e título de toxóide B 243 mg/L foram obtidos.

[0854] Exemplo 2, Figura 29: OD 59 final e título de toxóide B 306

mg/L foram obtidos.

[0855] A invenção também proporciona as seguintes modalidades como definido nas cláusulas abaixo: Cláusula 1. Um polipeptídeo isolado compreendendo a SEQ ID NO: 183.

[0856] Cláusula 2. Um polipeptídeo compreendendo a SEQ ID NO: 184.

[0857] Cláusula 3. uma composição imunogênica compreendendo um polipeptídeo isolado compreendendo a SEQ ID NO: 183.

[0858] Cláusula 4. uma composição imunogênica compreendendo um polipeptídeo isolado compreendendo a SEQ ID NO: 184.

[0859] Cláusula 5. um meio de cultura compreendendo um hidrolisado de soja, extrato de levedura, e glicose, e sendo que o meio compreende uma bactéria *Clostridium difficile* derivada de VPI 11186, sendo que a bactéria carece de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina, onde a bactéria compreende um polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante, onde a bactéria ainda compreende um promotor ferredoxina de *Clostridium sporogenes* (*fdx*).

[0860] Cláusula 6. Um método de cultivar o *Clostridium difficile* compreendendo cultivar o *C. difficile* em um meio, onde o meio compreende um hidrolisado de soja, extrato de levedura, e glicose, e sendo que o meio compreende uma bactéria *Clostridium difficile* derivada de VPI 11186, sendo que a bactéria carece de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina, onde a bactéria compreende um polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante, onde a bactéria ainda compreende um promotor ferredoxina de *Clostridium sporogenes* (*fdx*).

[0861] Cláusula 7. Um método para produzir uma toxina de *Clostridium difficile* compreendendo cultivar o *C. difficile* em um meio sob condições compatíveis para produzir a toxina, e isolar a toxina do

meio; onde o meio cmpreende um hidrolisado de soja, extrato de levedura, e glicose, e sendo que o meio compreende uma bactéria *Clostridium difficile* derivada de VPI 11186, sendo que a bactéria carece de um polinucleotídeo endógeno codificando uma toxina, onde a bactéria compreende um polinucleotídeo codificando uma toxina de *C. difficile* mutante, onde a bactéria ainda compreende um promotor feredoxina de *Clostridium sporogenes* (*fdx*).

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo imunogênico, caracterizado pelo fato de que consiste em qualquer uma das sequências de aminoácido reveladas em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 761, onde um resíduo de lisina do polipeptídeo é ligado a uma fração beta-alanina.

2. Polipeptídeo imunogênico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é modificado quimicamente por um 1-etil-3-(3-dimetiaminopropil) carbodiimida (EDC).

3. Polipeptídeo imunogênico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é modificado quimicamente por N- Hidroxisuccinimida (NHS).

4. Polipeptídeo imunogênico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma cadeia lateral de resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo ou uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do peptídeo é ligada a uma fração glicina.

5. Polipeptídeo imunogênico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende uma ligação cruzada entre a cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo.

6. Polipeptídeo imunogênico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende uma ligação cruzada entre a cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo.

7. Polipeptídeo imunogênico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo tem um EC50 de pelo menos 100 g/ml.

8. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que

compreende um polipeptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um segundo polipeptídeo isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

10. Célula recombinante derivada de uma célula de *Clostridium difficile* selecionada do grupo consistindo de *Clostridium difficile* 1351, *Clostridium difficile* 3232, *Clostridium difficile* 7322, *Clostridium difficile* 5036, *Clostridium difficile* 4811, e *Clostridium difficile* VP I 11186 ou progênie da mesma, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo isolado, que compreende a sequência de aminoácido revelada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 761.

11. Célula de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula de *Clostridium difficile* VP I 11186.

12. Célula de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que um gene de esporulação da célula de *Clostridium difficile* é inativado.

FIG. 1A

```

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
*****

LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
*****

WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
*****

EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
*****

IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
*****

LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFEGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFEGGVYLAVAMLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFEGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFEGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFEGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
*****

SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
*****

```

FIG. 1B

SKSEKSEIFSKLENLNVDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400

QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450

PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
 PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
 PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
 PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
 PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500

KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550

NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600

SKNPKNSIIIQRMNNESEKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNNESEKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNNESEKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNNESEKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNNESEKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650

TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGA 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700

FIG. 1C

NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSTITIGANQYEVRRINS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSTITIGANQYEVRRINS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSTITIGANQYEVRRINS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSTITIGANQYEVRRINS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSTITIGANQYEVRRINS 750
 *****;

EGRKELLAHSGKWINKKEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKKEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKKEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKKEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKKEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800

SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850

HNSIDDLIDEFNLENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900

RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950

QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000

NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITTEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITTEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITTEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITTEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITTEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050

FIG. 1D

```

LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGA EVTIFLLPIAG 1100
*****

ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLS ESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLS ESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLS ESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLS ESKEYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLS ESKEYGPLKTEDDKILVPID 1150
*****

DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
*****

SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNNGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNNGT 1250
***:*****:*****

RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDK DTRNFI 1300
RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDK DTRNFI 1300
RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDK DTRNFI 1300
KL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNTKIKLDK DTRNFI 1300
KL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNTKIKLDK DTRNFI 1300
:*****

MPTITTTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISMNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISMNINLSKDDLWIFNID 1350
*****

NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGNLIEDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGNLIEDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
*****:***:*****

```


FIG. 1E

```

RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
*****

LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHKKDSKNILEFYNGST 1500
LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHKKDSKNILEFYNGST 1500
*****

LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
*****

KVNGLYLINESVYSSYLDVFNKSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDVFNKSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDVFNKSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDVFNKSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDVFNKSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
*****

NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
*****

RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYPEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYPEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYPEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYPEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYPEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 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

VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900

GFEYFAPANTQNNNIEGQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950

NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000

DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050

GQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGLQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100

FIG. 1G

```

WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
*****;*****;

FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
*****;*****;

KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAAAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAAAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAAAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNIAAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNIAAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
*****;***; *; *****;*****;

LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
*****;*****;

AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKKKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKKKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
*****;*****; *****; *****

TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGYTSINGKHFY 2400
TIDGEKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASGYTIINGKHFY 2400
TIDGEKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASGYTIINGKHFY 2400
****;*****;*****;*****;*****

FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
*****;*****;*****;*****

```

FIG. 1H

```

YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
***** **

STGYTIIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
STGYTIIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 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
GKIYYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
GKIYYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 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

```

MSLVNRKQLEKMANVRFRTOEDEYVAILDALEEYHNMSSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRTOEDEYVAILDALEEYHNMSSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRTOEDEYVAILDALEEYHNMSSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDALEEYHNMSSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDALEEYHNMSSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
*****

DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
*****

VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKTIVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKTIVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKTIVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKTIVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKTIVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
*****;*****

DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKIDELNSYIEESLNKVTENSNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKIDELNSYIEESLNKVTENSNDV 240
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

RNFEFPKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGMYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
RNFEFPKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGMYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
RNFEFPKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGMYLAVAMLEPGIQPDLFES 300
RNFEFPKNGESFKNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGVYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
RNFEFPKNGESFKNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGVYLDVDMLEPGIQPDLFES 300
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

SSLDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
*****

DNDENTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDENTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDENTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480

```

FIG. 2B

```

DNDNFNTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDNFNTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
*****;*****
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFE 540
*****;*****
GSLGEDDNLDFSQNIIVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNIIVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNIIVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEACNLFAK 600
*****
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFFIGHGKDEFNT 660
*****
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFYSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFYSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFYSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFYSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFYSYSINVEETYPGKLLLVK 720
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKVSELMPSISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKVSELMPSISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
NPKENKITVKSKNLPSTLLQEIIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPSTLLQEIIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPSTLLQEIIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKIIVKSKNLPSTLLQEIIRNNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
NPKENKIIVKSKNLPSTLLQEIIRNNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIIESISDALCDLKQONELED SHFISFEDTSETDEGFSIRF 900
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIIESISDALCDLKQONELED SHFISFEDTSETDEGFSIRF 900
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIIESISDALCDLKQONELED SHFISFEDTSETDEGFSIRF 900
IEEAKSLTSDSINYIKNEFKLIIESISDALYDLKQONELEESHFISFEDILETDEGFSIRF 900
IEEAKSLTSDSINYIKNEFKLIIESISDALYDLKQONELEESHFISFEDILETDEGFSIRF 900
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

```

FIG. 2C

```
INCKETGESIFVETEKTI FSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
INCKETGESIFVETEKTI FSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
INCKETGESIFVETEKTI FSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
IDKETGESIFVETEKAIFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDATHEVNTLN 960
IDKETGESIFVETEKAIFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDATHEVNTLN 960
*:*****:*****:*****
AAFFIIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
*****
LLPTLSEGLPIIATI IDGVSLGAAIKE LSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPIIATI IDGVSLGAAIKE LSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPIIATI IDGVSLGAAIKE LSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPVIATI IDGVSLGAAIKE LSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPVIATI IDGVSLGAAIKE LSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
*****:*****:*****
SSLGIASGSFILLVPLAGISAGIPSLVNNELVL RD KATKVVDYFKHVSIVTEGEVFTLLD 1140
SSLGIASGSFILLVPLAGISAGIPSLVNNELVL RD KATKVVDYFKHVSIVTEGEVFTLLD 1140
SSLGIASGSFILLVPLAGISAGIPSLVNNELVL RD KATKVVDYFKHVSIVTEGEVFTLLD 1140
SSLGIASGSFILLVPLAGISAGIPSLVNNELVL RD KATKVVDYFKHVSIVTEGEVFTLLD 1140
SSLGIASGSFILLVPLAGISAGIPSLVNNELVL RD KATKVVDYFKHVSIVTEGEVFTLLD 1140
*****:*****:*,*,*:*,* **
DKIMMPQDDL VISEIDFNNS IVLGKEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDL VISEIDFNNS IVLGKEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDL VISEIDFNNS IVLGKEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDL VISEIDFNNS ITLGKEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDL VISEIDFNNS ITLGKEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
*****:*****:*****
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLP NAPNRVFAWETGWTPGLRSLNDGT KL LDRI RDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLP NAPNRVFAWETGWTPGLRSLNDGT KL LDRI RDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLP NAPNRVFAWETGWTPGLRSLNDGT KL LDRI RDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLP NAPNRVFAWETGWTPGLRSLNDGT KL LDRI RDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLP NAPNRVFAWETGWTPGLRSLNDGT KL LDRI RDNYEG 1260
*****:*****:*****
EFYWRYFAFIADALITTLKP RYEDTNIRINLDSNTRS FIVPIITTEYIREKL SYSFYCGS 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKP RYEDTNIRINLDSNTRS FIVPIITTEYIREKL SYSFYCGS 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKP RYEDTNIRINLDSNTRS FIVPIITTEYIREKL SYSFYCGS 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKP RYEDTNIRINLDSNTRS FIVPVITTEYIREKL SYSFYCGS 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKP RYEDTNIRINLDSNTRS FIVPVITTEYIREKL SYSFYCGS 1320
*****:*****:*****
TYALSLSQYNMGINI ELS ESDVWI IDV DNVVRDVTIESDKIKKGDL IE GIL STL SIEEN 1380
TYALSLSQYNMGINI ELS ESDVWI IDV DNVVRDVTIESDKIKKGDL IE GIL STL SIEEN 1380
TYALSLSQYNMGINI ELS ESDVWI IDV DNVVRDVTIESDKIKKGDL IE GIL STL SIEEN 1380
```

FIG. 2D

```

GTYALSLSQYNMNIENLNENDTWVIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLIENILSKLSIEDN 1380
GTYALSLSQYNMNIENLNENDTWVIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLIENILSKLSIEDN 1380
*****.*.***.*:*****.***.***.*

KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTFSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKILMLNS 1440
KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTFSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKILMLNS 1440
****.*.*****.*:*****.*:*****.*

NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMD 1500
NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMD 1500
NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMD 1500
NSVQQKIDYIGLNSELQKNIPYSFMDDKKGKENGFIINGSTKEGLFVSELSDVVLISKVYMD 1500
NSVQQKIDYIGLNSELQKNIPYSFMDDKKGKENGFIINGSTKEGLFVSELSDVVLISKVYMD 1500
*.*:*****.*:*****.*:*****.*

DSKPSEFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLDQDETIKLSNVHLD 1560
DSKPSEFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLDQDETIKLSNVHLD 1560
DSKPSEFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLDQDETIKLSNVHLD 1560
NSKPLFGYCSNDLKDVKVITKDDVILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLD 1560
NSKPLFGYCSNDLKDVKVITKDDVILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLD 1560
:***.*.*.*:*****.*:*****.*:***.*:***.*:***.*

GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
*****.*.*.*****.*:*****.*:***.*:*****.*

FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDKDNNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
FEFICDKDNNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
*****.*:*****.*:*****.*:*****.*

LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPIYEANNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
LYGIDSCVNKVVISPNYITDEINITPIYEANNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
*****.*:*****.*:***.*:*****.*:***.*:*****.*

VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVEFKDKTLANKLSFNFSQKQDVPVSEIILSET 1800
VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVEFKDKTLANKLSFNFSQKQDVPVSEIILSET 1800
VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVEFKDKTLANKLSFNFSQKQDVPVSEIILSET 1800
VWSNDGSDFILMSTDEENKVSQVKIRFTNVEFKGNTISDKISFNFSQKQDVSINKVISTFT 1800
VWSNDGSDFILMSTDEENKVSQVKIRFTNVEFKGNTISDKISFNFSQKQDVSINKVISTFT 1800
*****.*.*****.*.*****.*:***.*:***.*:*****.*:***.*:***.*

```


FIG. 2E

```

PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
**** : ** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ** : *

DDKYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYFNPINGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTVGFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
DDKYFNPINGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTVGFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
***** ***** : ***** : ***** : * : ***** : ***** : *****

EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLTIDENVYYPGDNYRAAIEWQTLDDDEVYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKFYFN 1980
EAIDFTGKLTIDENVYYPGDNYRAAIEWQTLDDDEVYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKFYFN 1980
***** ***** : ***** : ***** : * : ***** : ***** : *****

SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
*** : ***** : ** : * : ***** : ***** : ***** : *****

HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEALSYSYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEALSYSYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIIDNNFYIDNGIVQIG 2160
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIIDNNFYIDNGIVQIG 2160
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIIDNNFYIDNGIVQIG 2160
ISIINDGKYYFNDDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIIDNNFYIDENGLVQIG 2160
ISIINDGKYYFNDDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIIDNNFYIDENGLVQIG 2160
: * : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
*****

```

Fig 2F

```

KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
****:***** ****:*****:*****:*.*.*****:* **:**:****

KMEYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYEFTDEYI 2340
KMEYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYEFTDEYI 2340
KMEYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYEFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYEFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYEFTDEYI 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

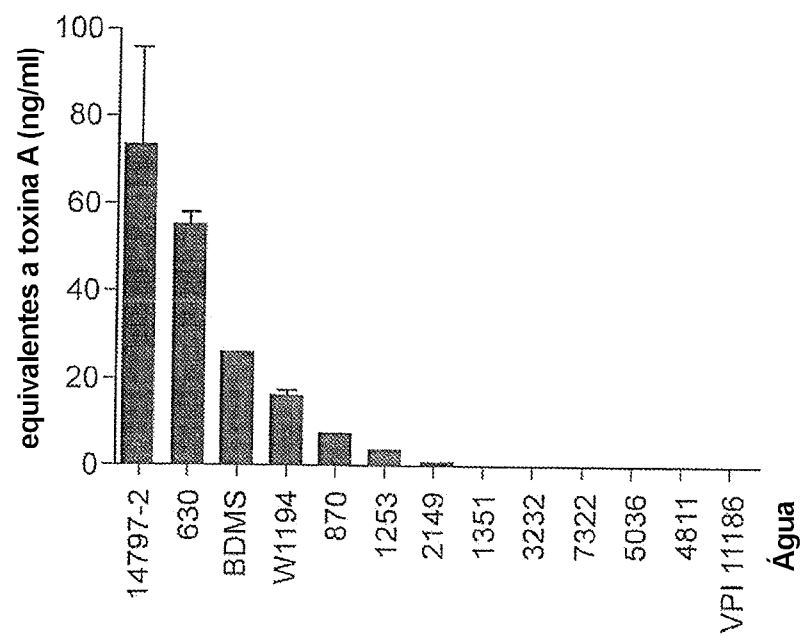


FIG. 4A

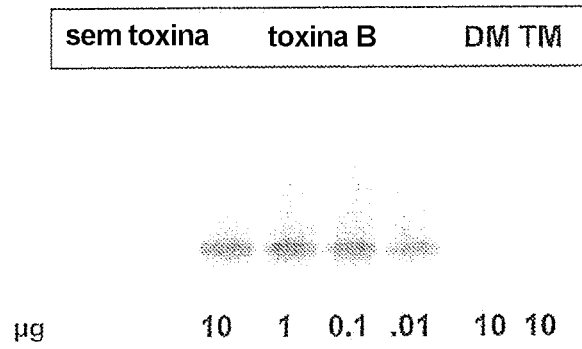


FIG. 4B

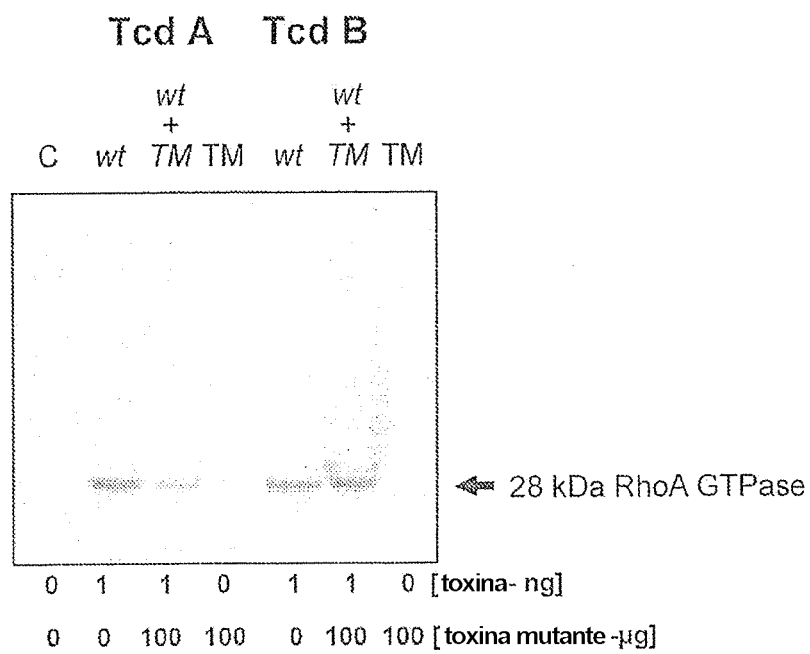


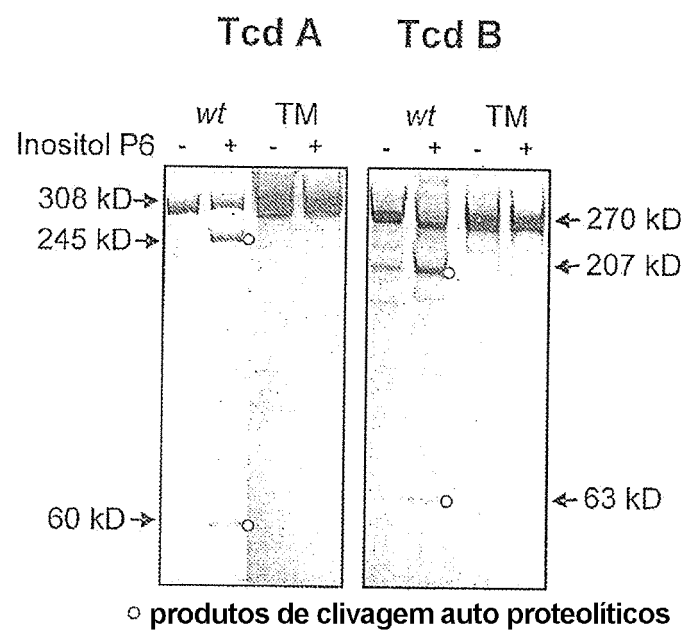
FIG. 5

FIG. 6

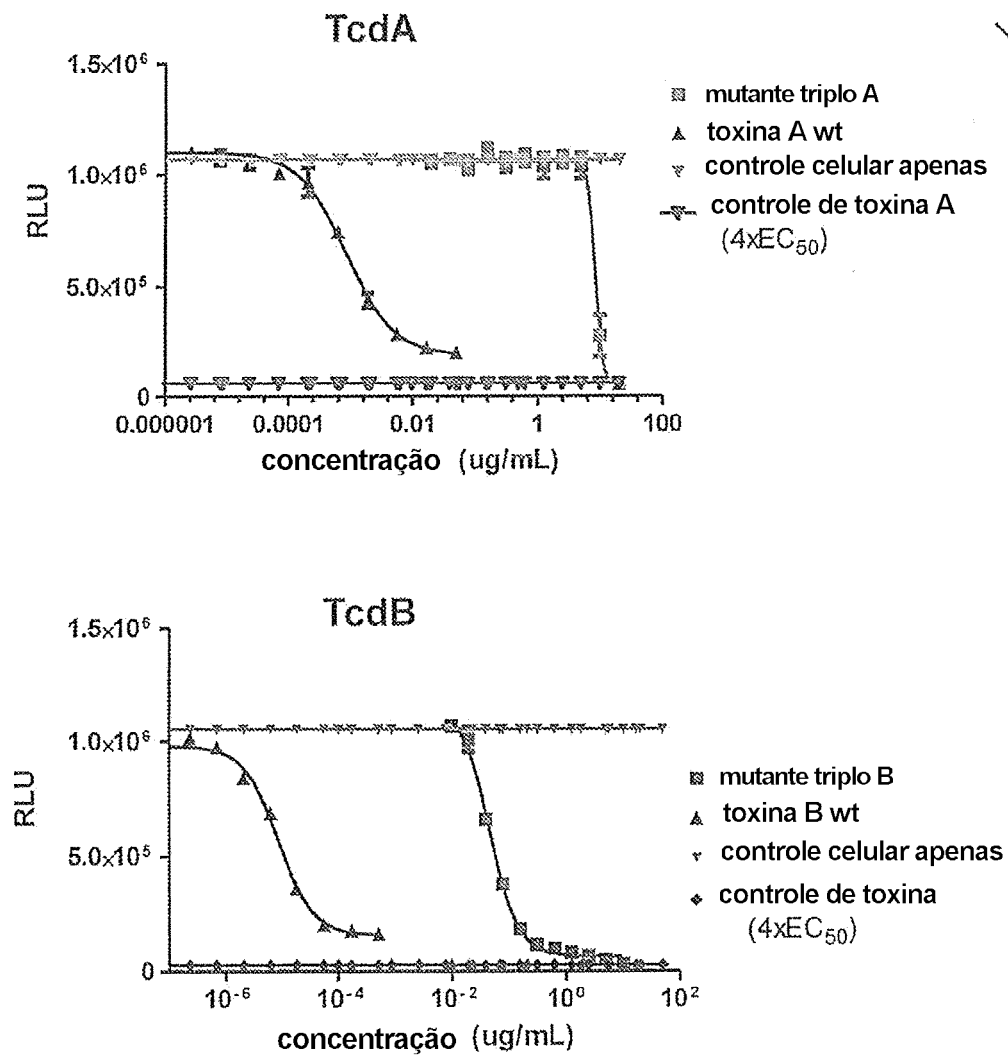
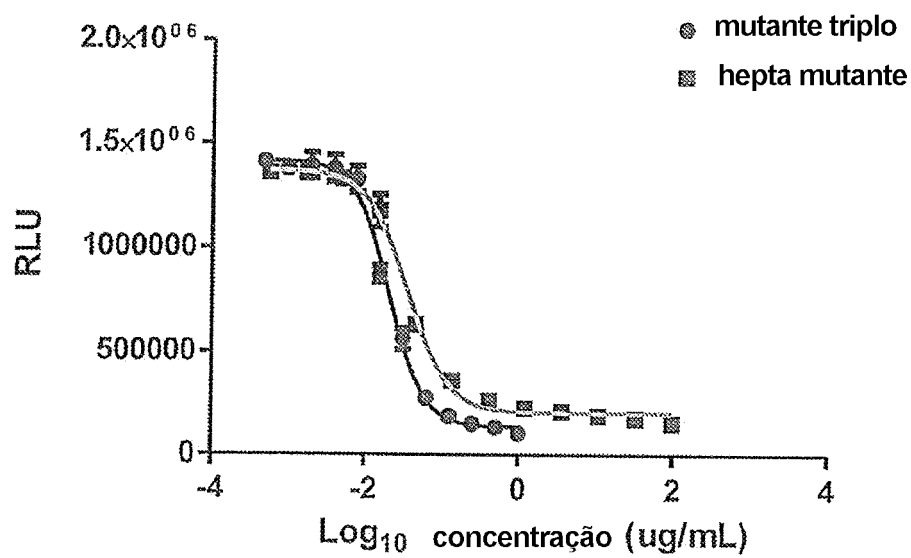


FIG. 7



	mutante triplo	hepta mutante
EC ₅₀	0.02078	0.03590

FIG. 8

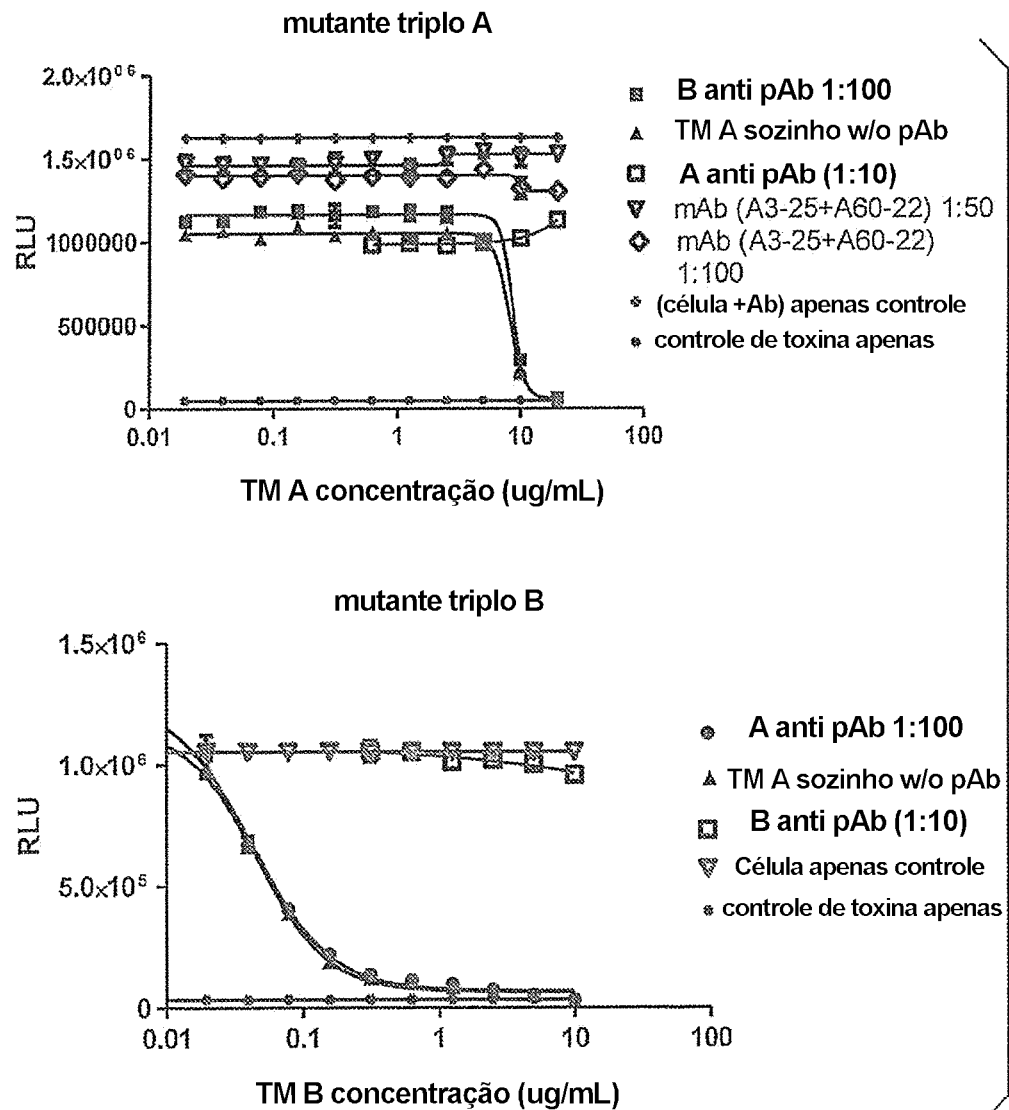


FIG. 9

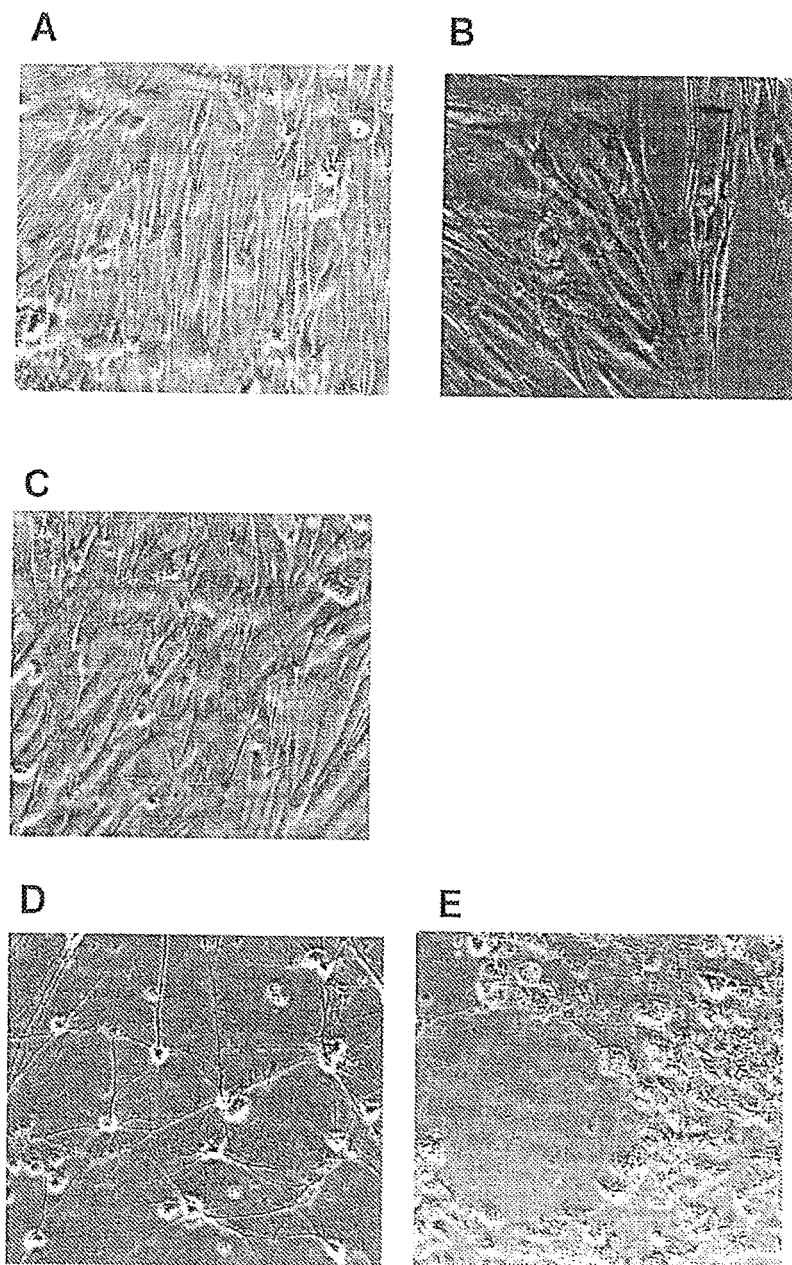


FIG. 10

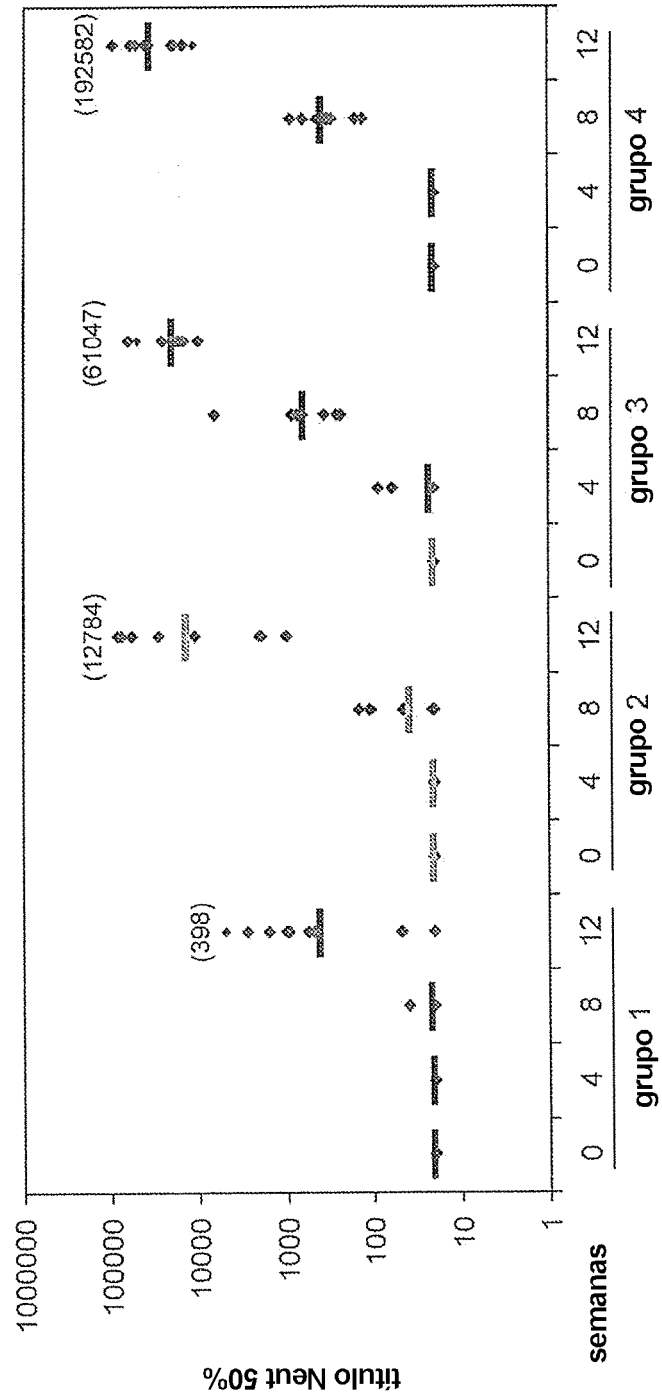


FIG. 11A

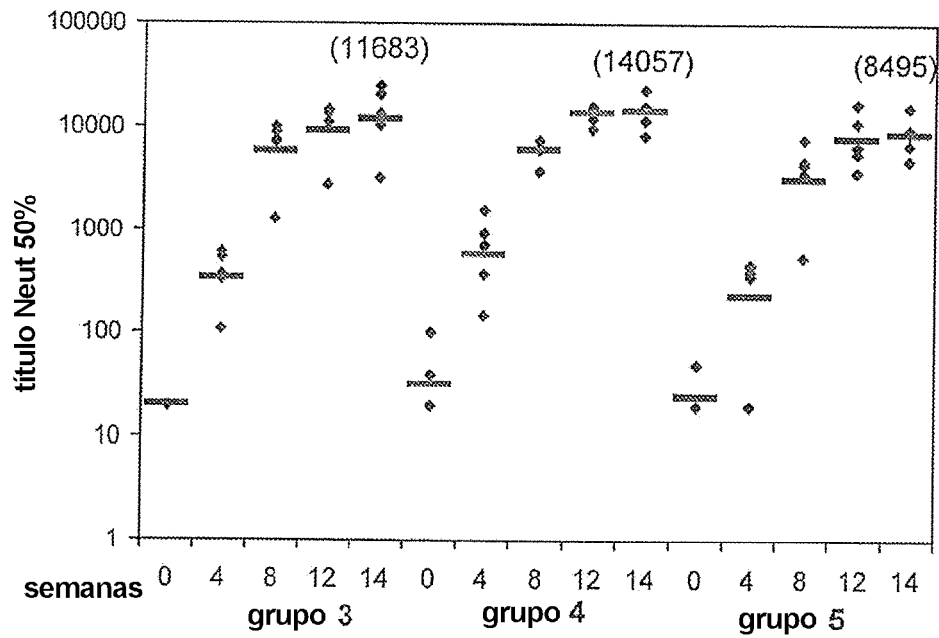


FIG. 11B

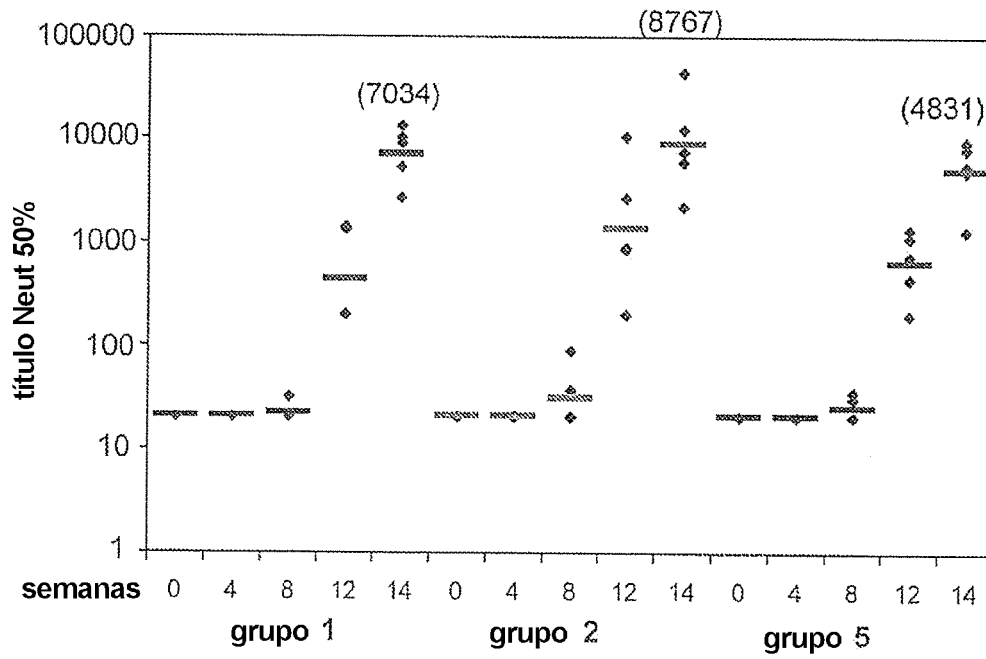


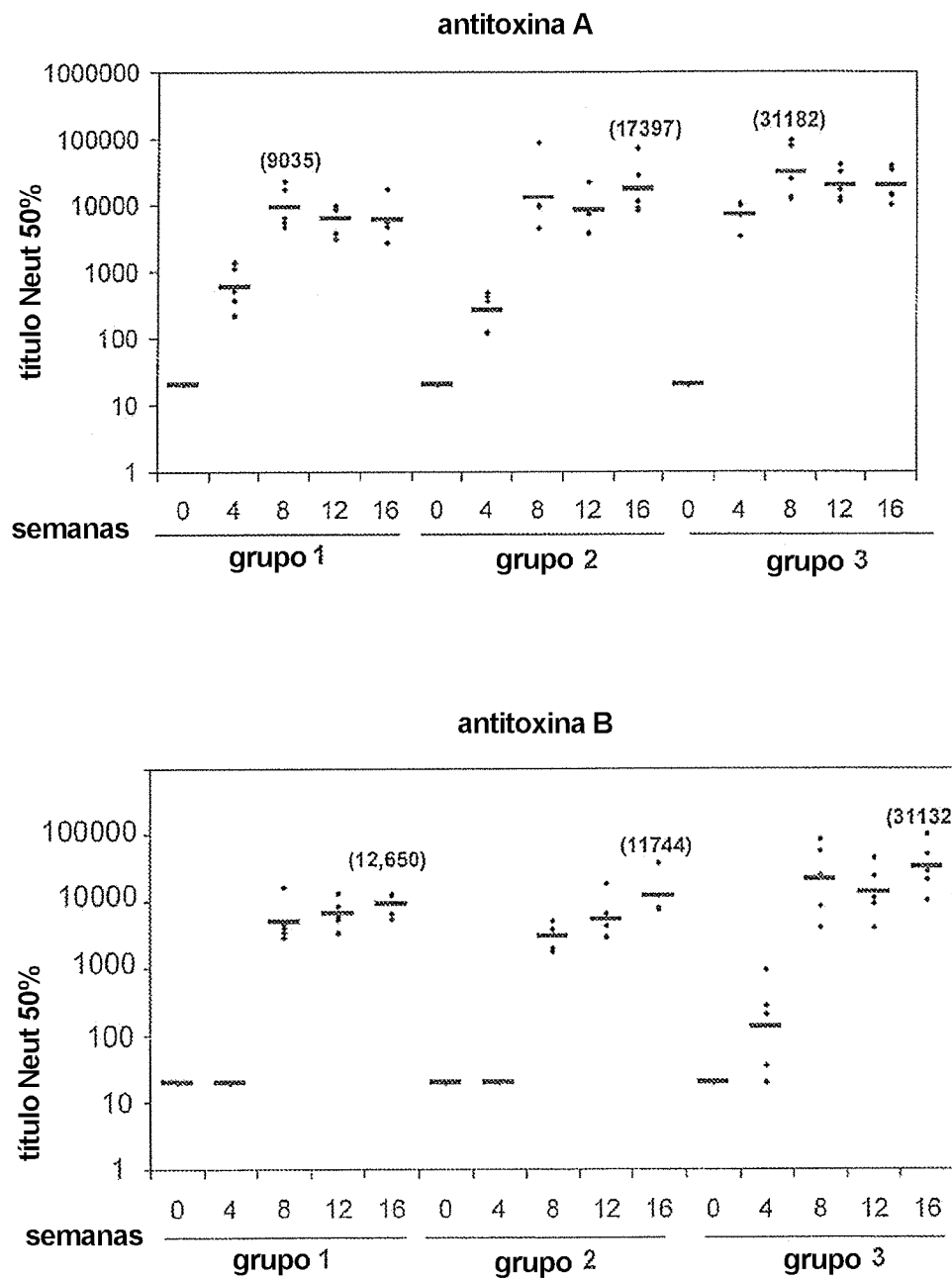
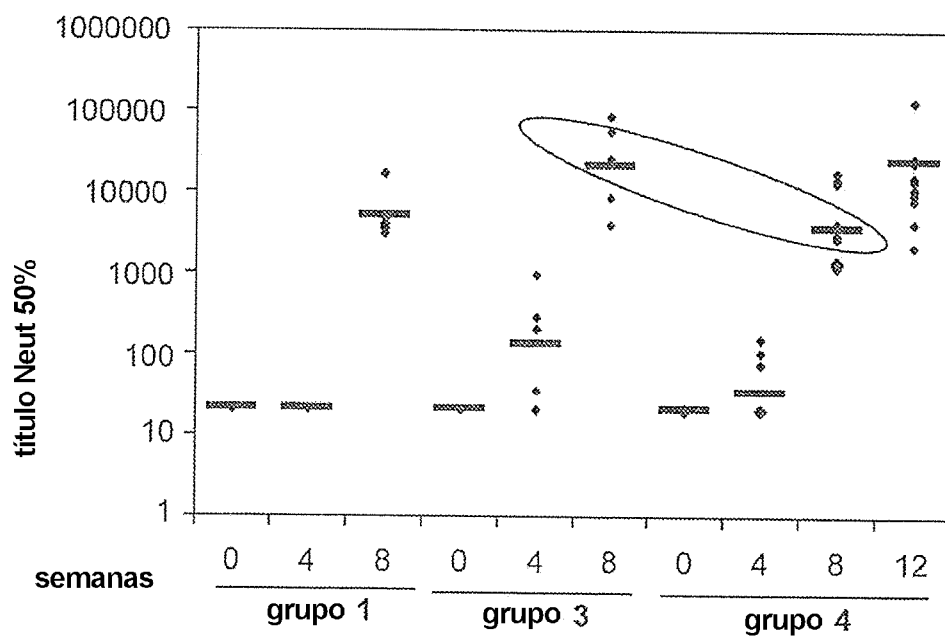
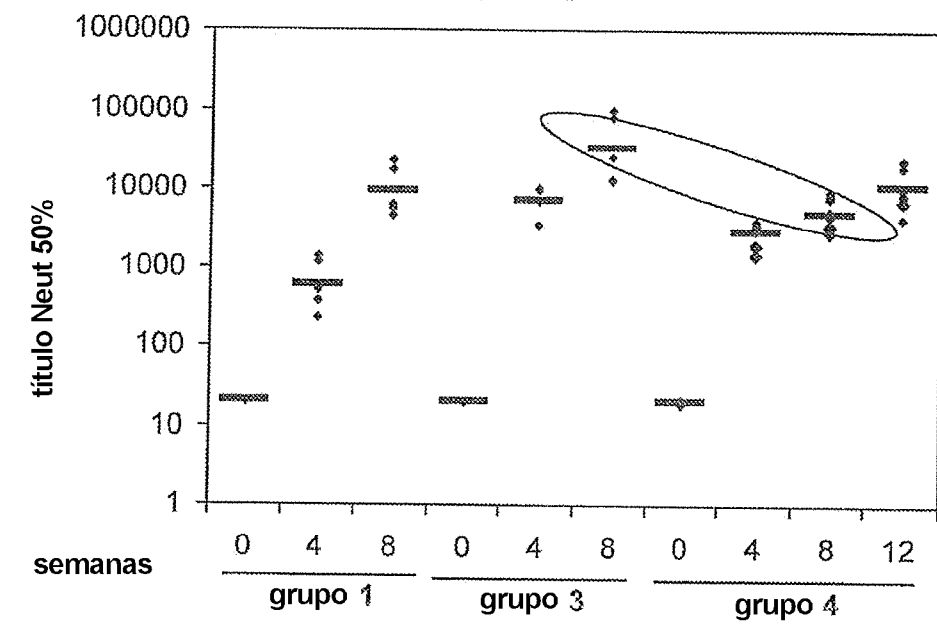
FIG. 12

FIG. 13



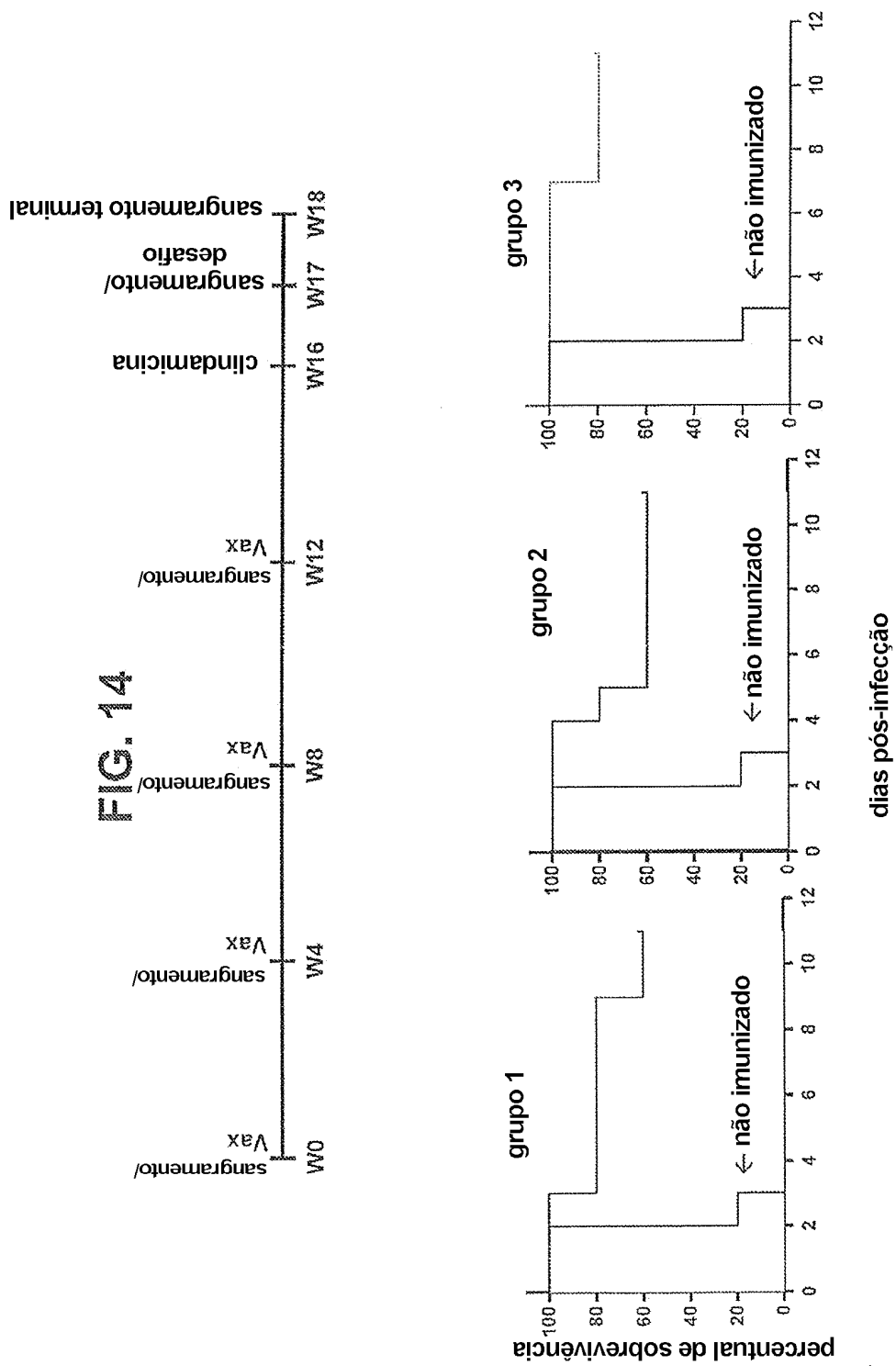


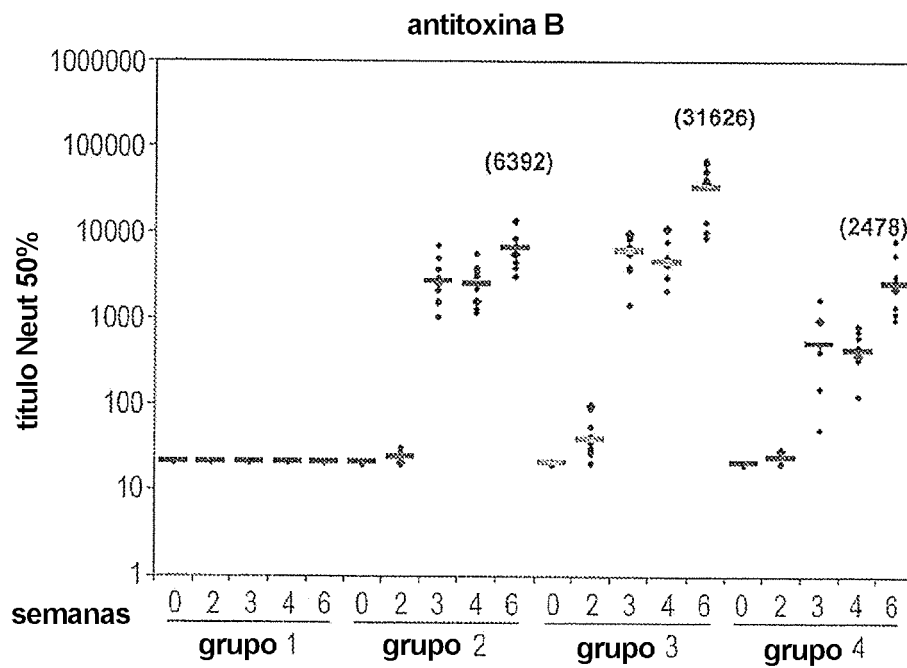
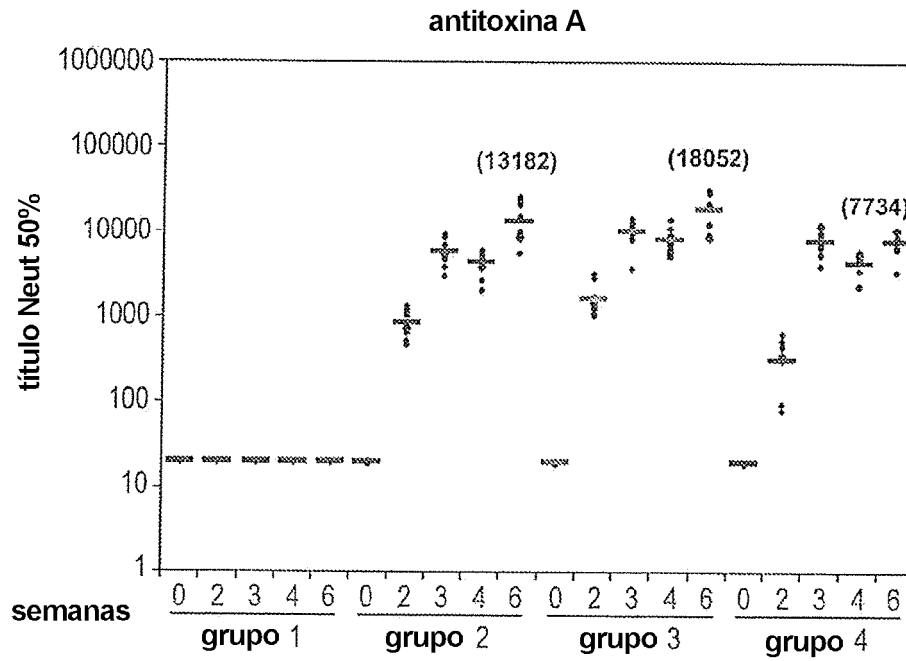
FIG. 15

FIG. 16A

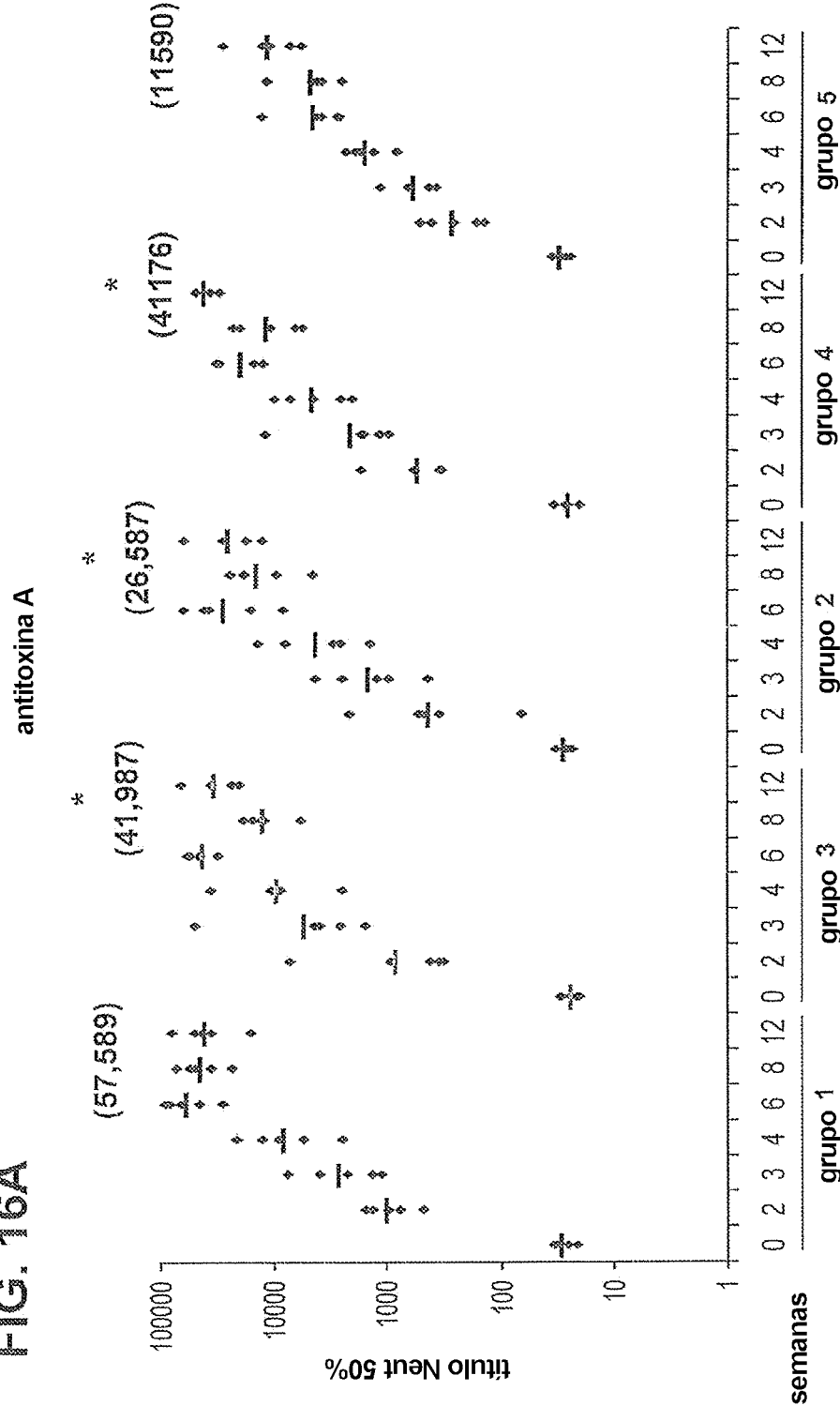


FIG. 16B

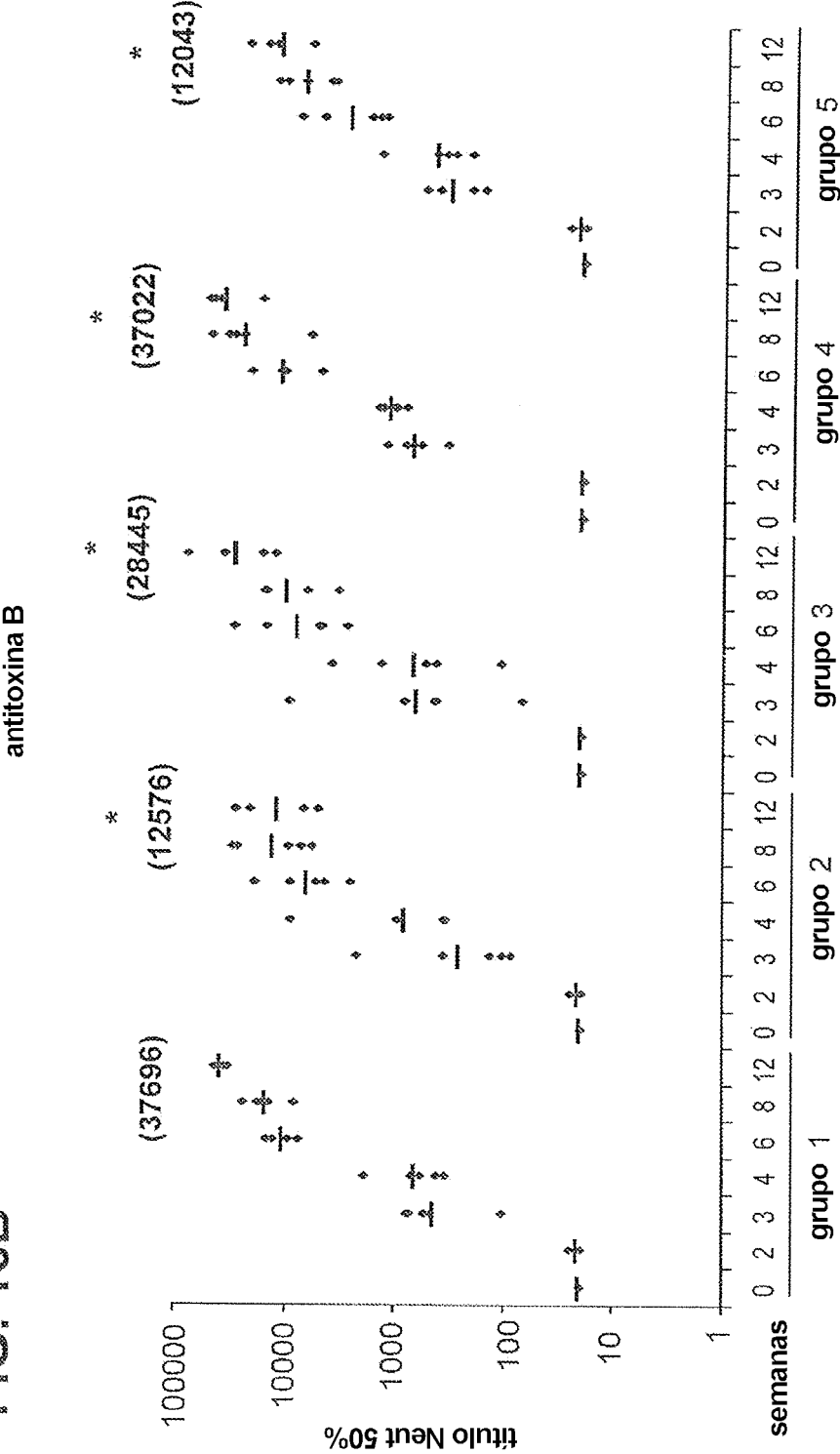


FIG. 17

cadeia leve variável (muK)

MKLPVRLLVLMFWIPGSSSDVVMTHHTPLSLPVSLGDQASMSCRS
SQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLISKVSNRFSGVPDRFSG
 SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTYFPYTFGGGTREIKRAD
AAPTVSIFPPSS (SEQ ID NO: 36)

cadeia pesada variável (mlgE)

MYLGLNCFIVFLLKGVQSEVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS
GFTFTNYWMNWVRQSPKGLEWIAEIRLKSHNYATHFAESVKG
 RFTISRDDSKSAVSLQMTNLTPEDTGIFYCTWDYYGNPAFVYWG
QGTLLTVSAASIRNPQLYPLKPCKGTASMTLGCLVKDYFPGPVT
VTWYSDSLNMSTVN (SEQ ID NO: 37)

FIG. 18

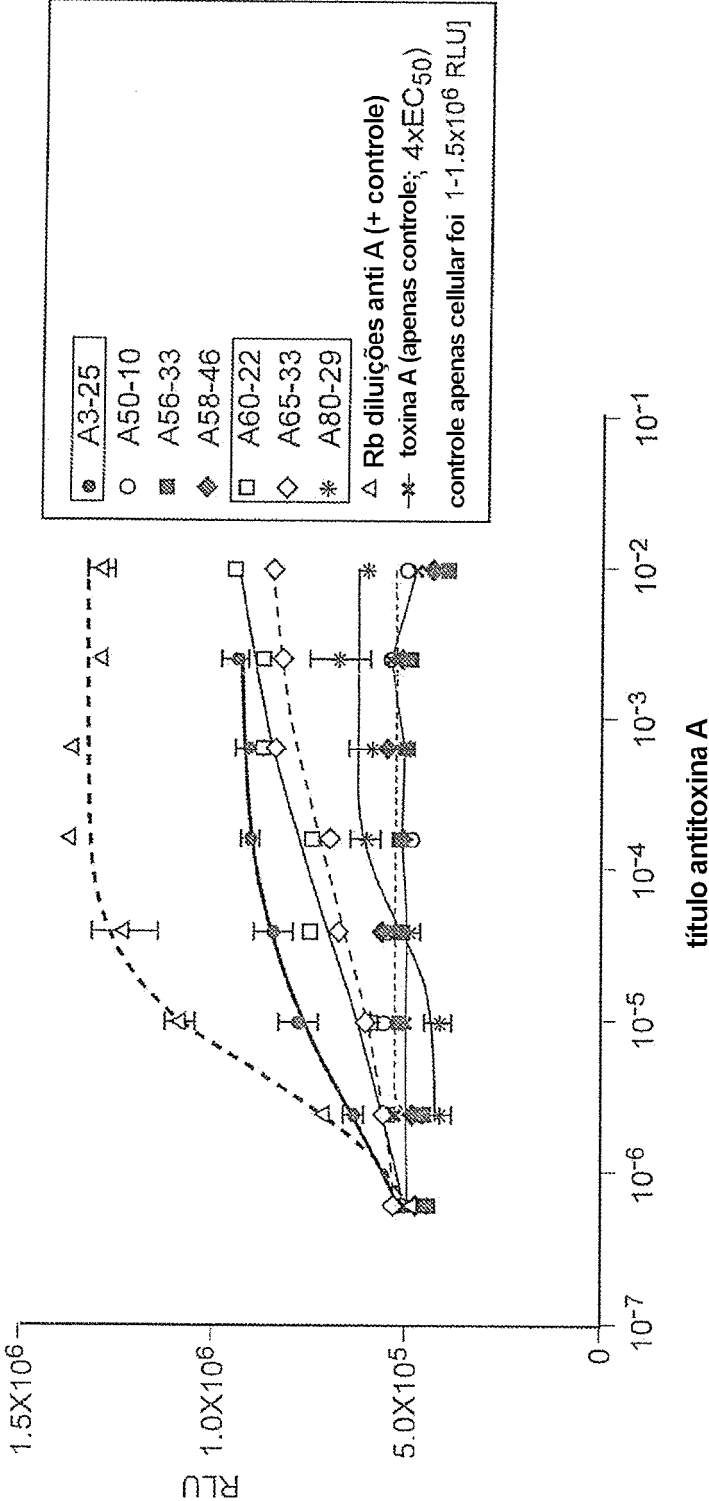


FIG. 19

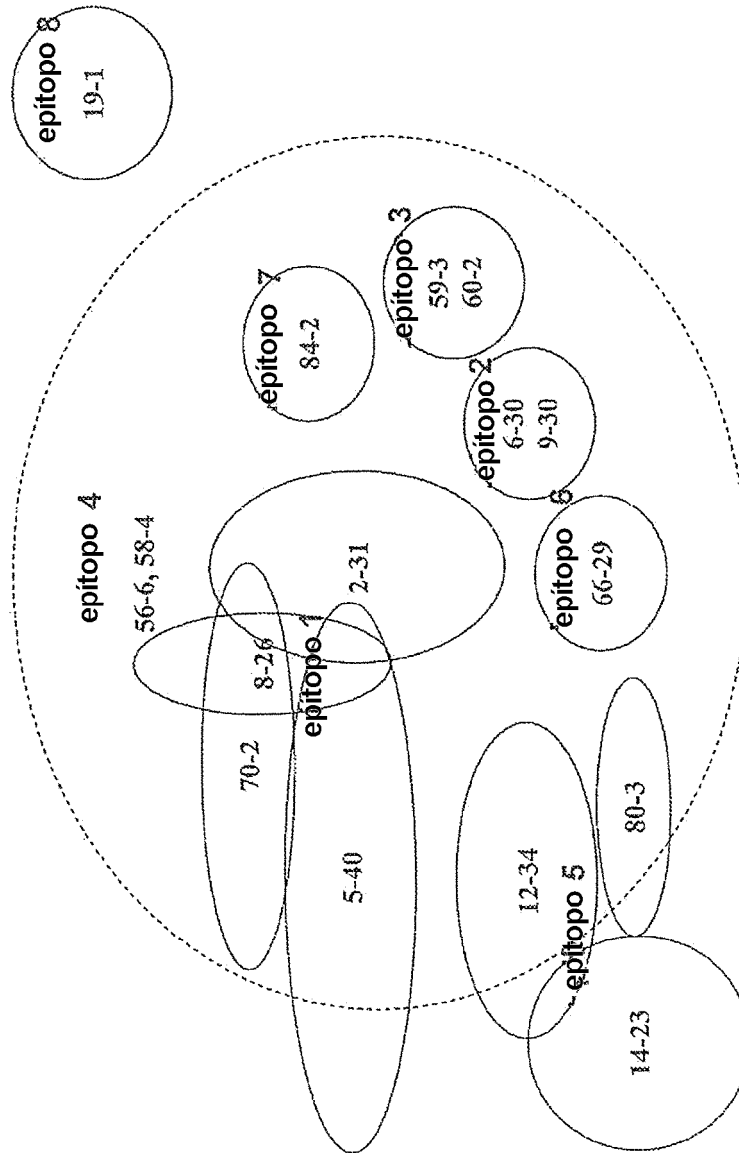


FIG. 20A

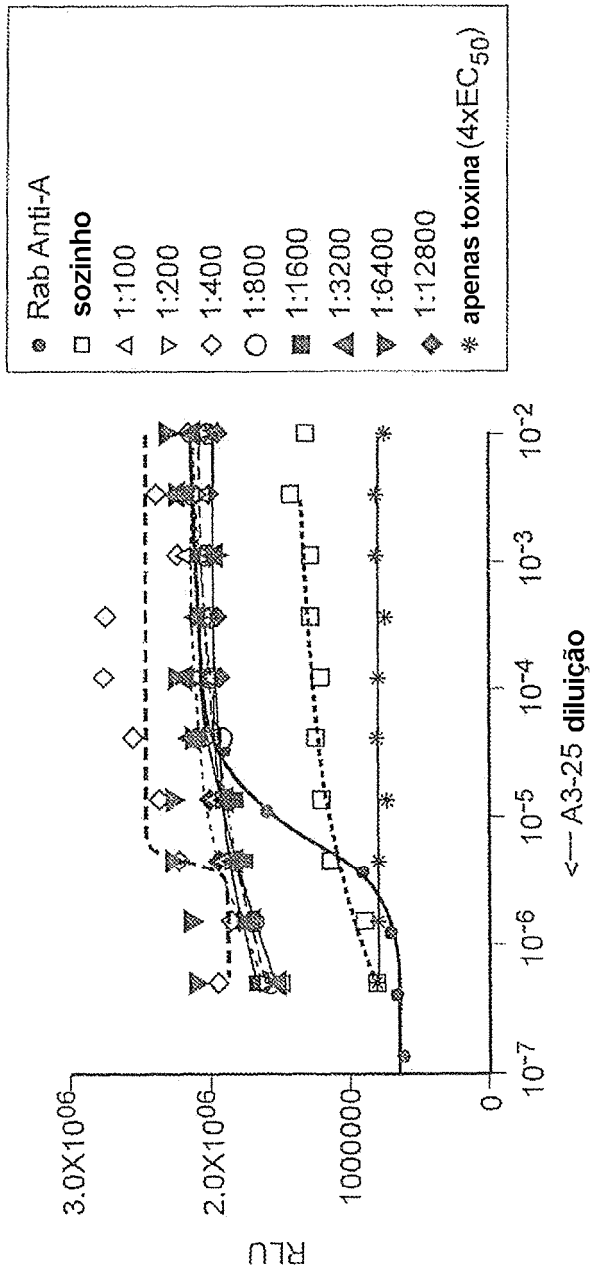


FIG. 20B

neutralização da toxina A por diluição de mAb A3-25 mais A65-33

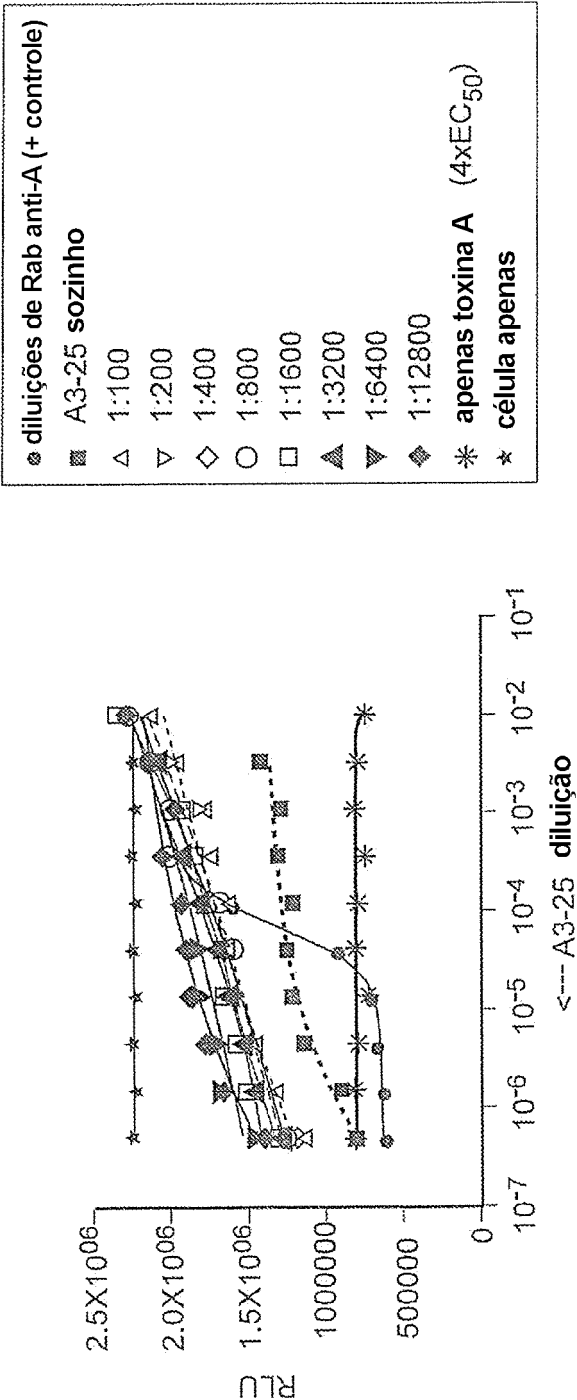


FIG. 20C

neutralização da toxina A por diluição de mAb A3-25 mais A80-29

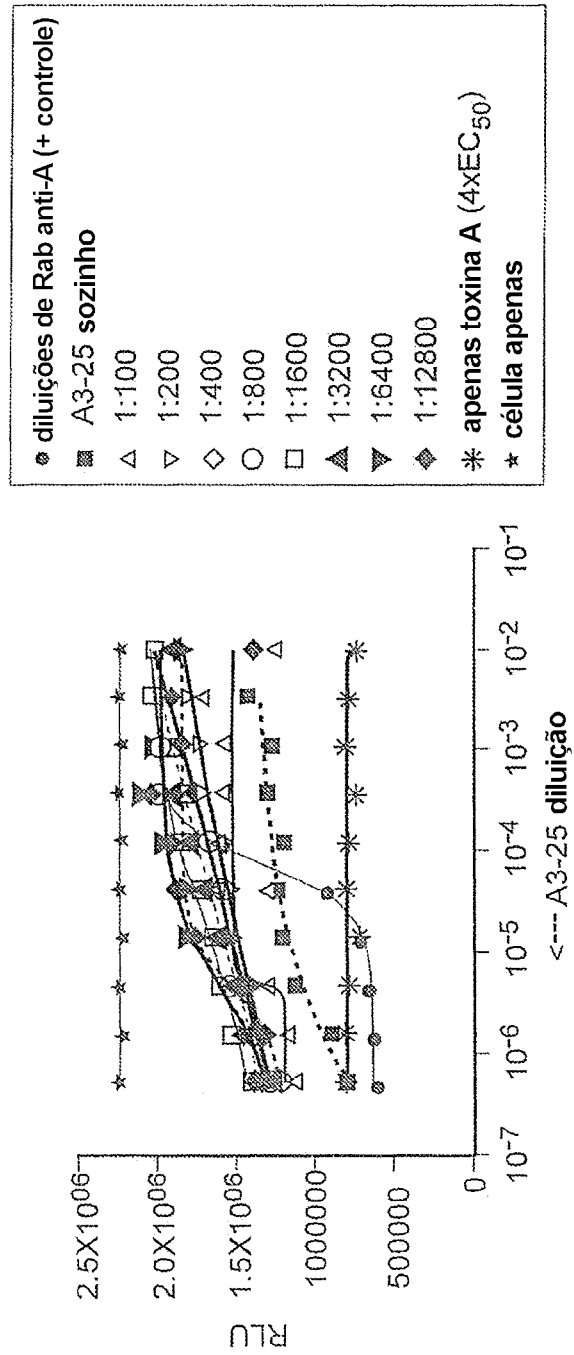


FIG. 21A

neutralização de toxina B por soro de referência e mAbs diferentes

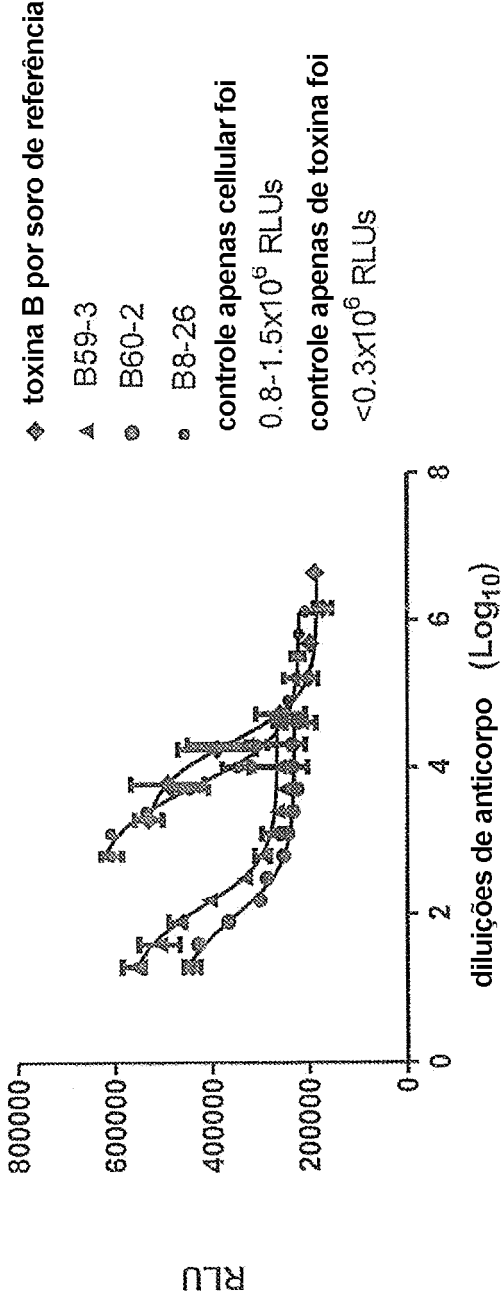


FIG. 21B

neutralização de toxina B por diluições de B8-26 mAbs mais B59-3

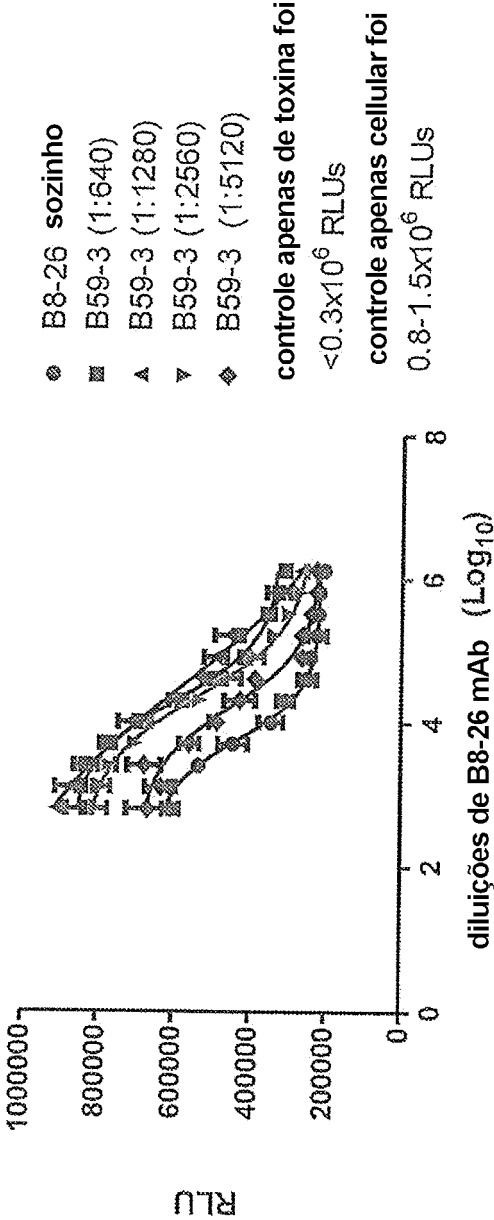


FIG. 22

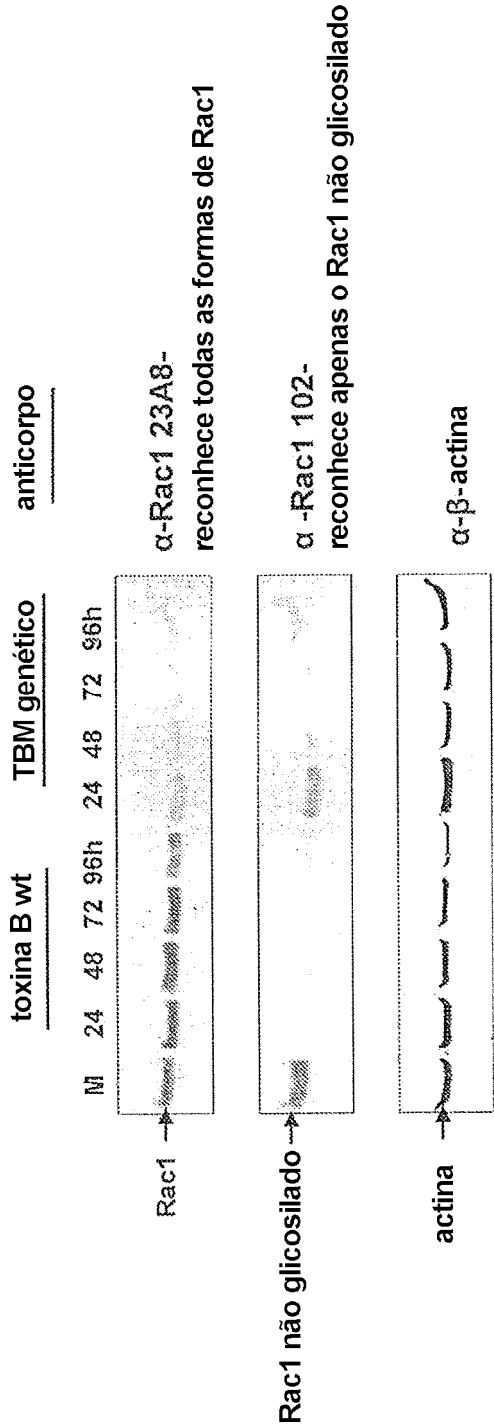


FIG. 23A

2007886

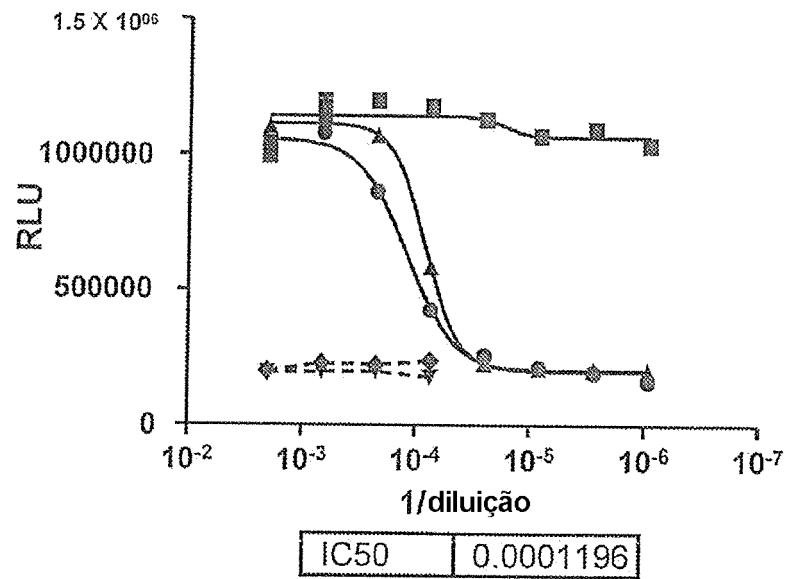


FIG. 23B

2006017/NAP12/15

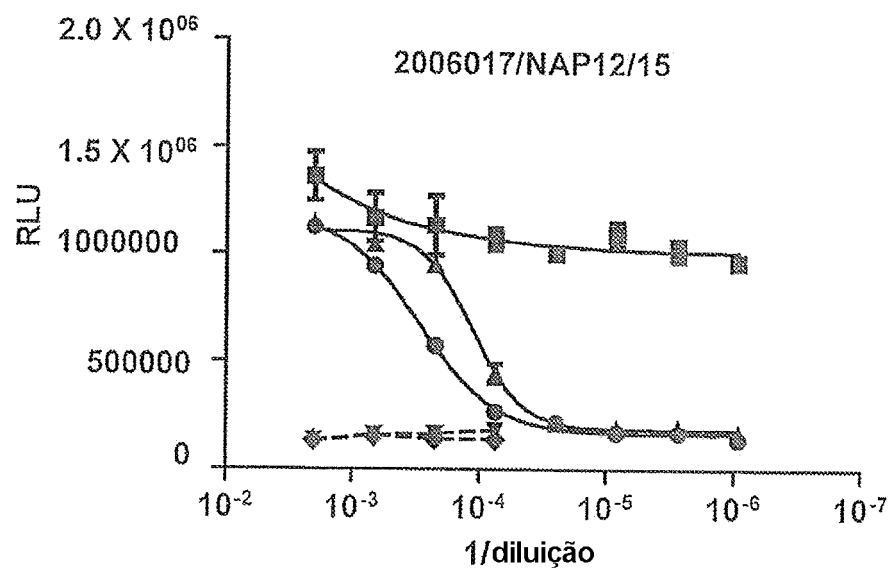


FIG. 23C

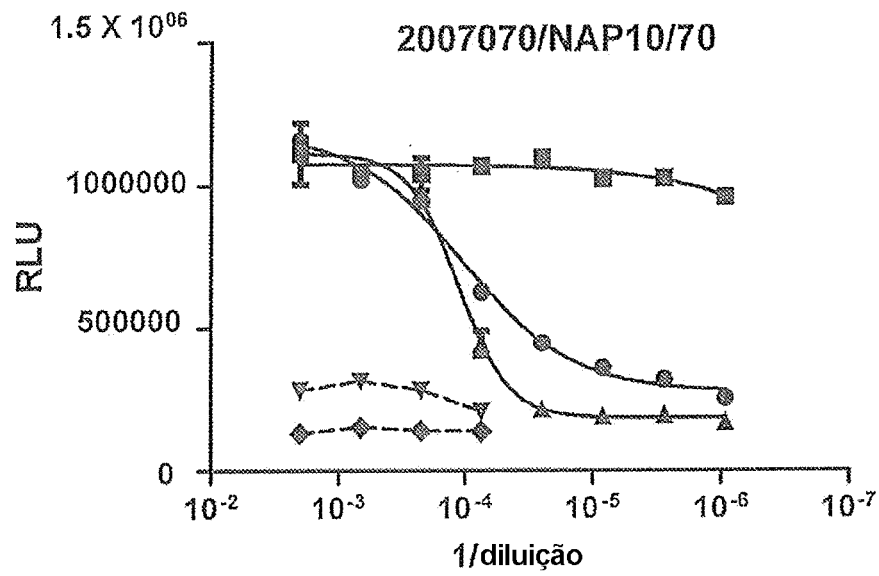


FIG. 23D

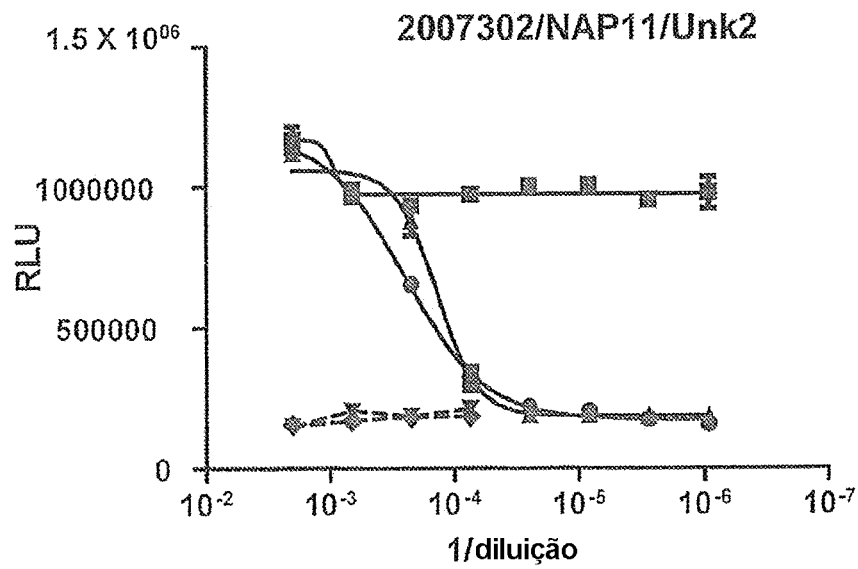


FIG. 23E

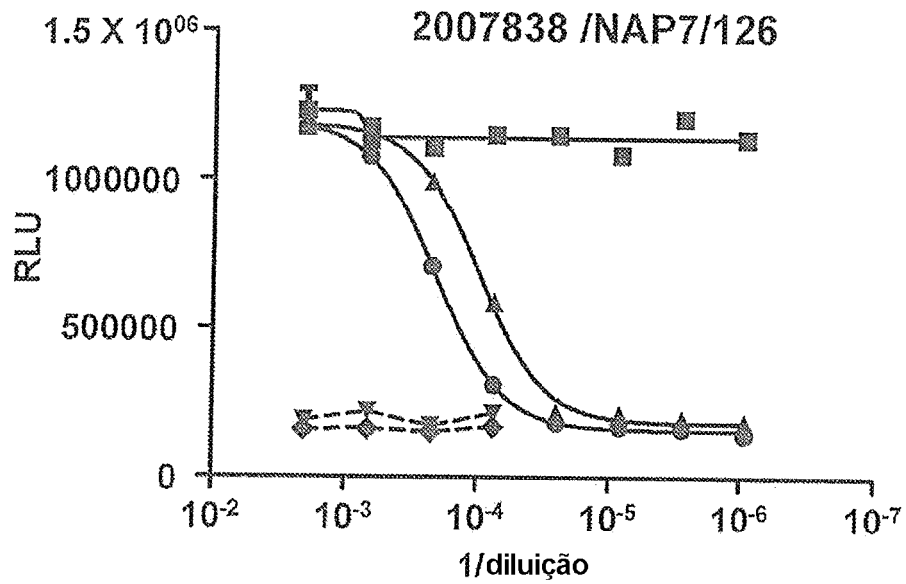


FIG. 23F

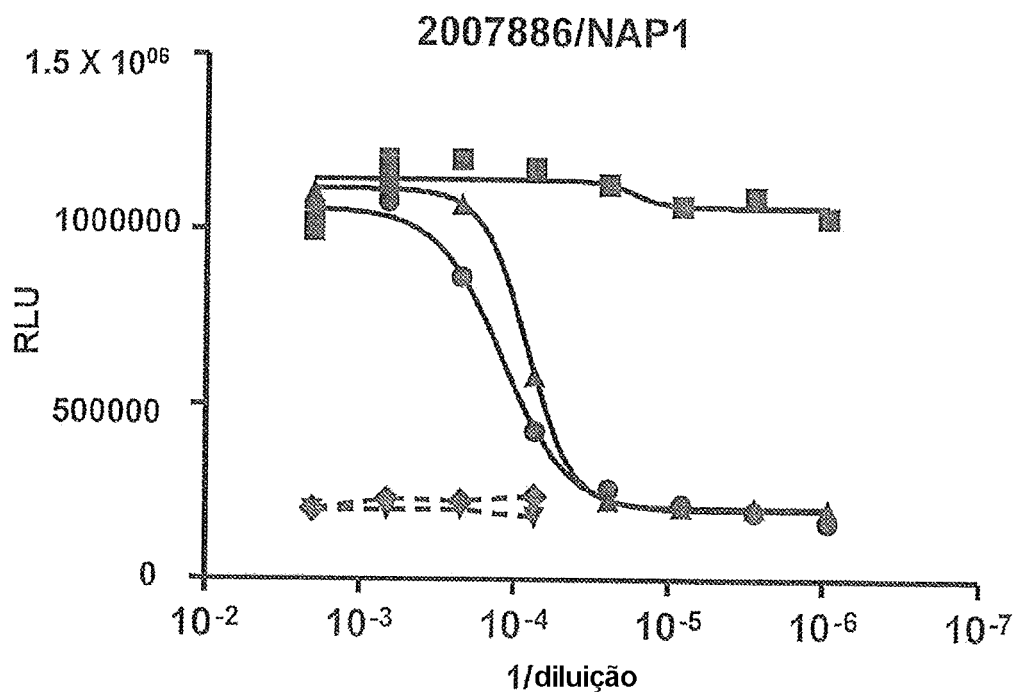


FIG. 23G

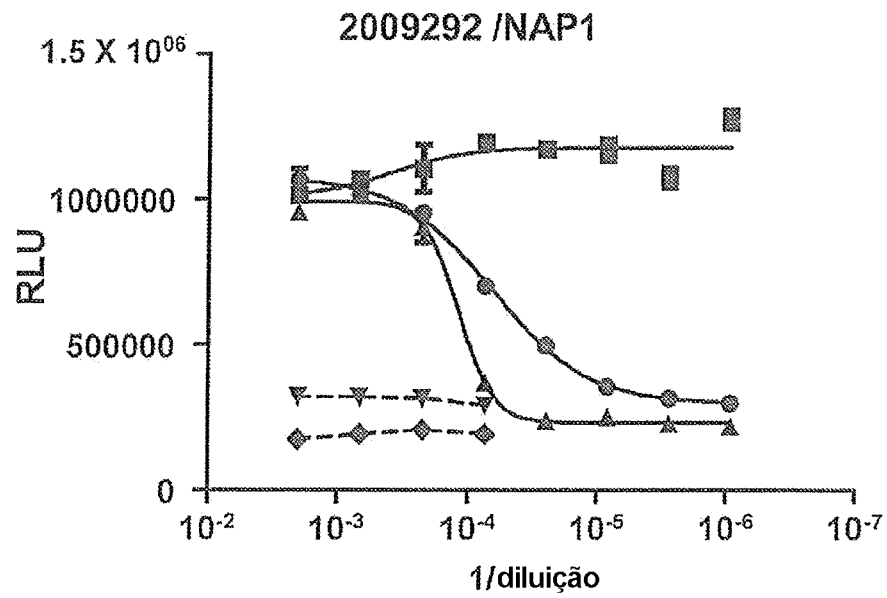


FIG. 23H

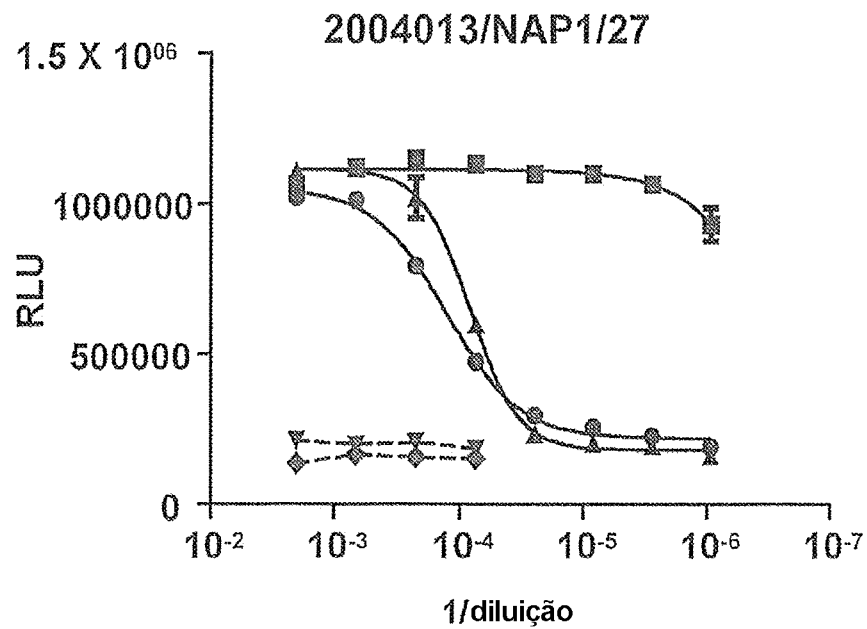


FIG. 23 I

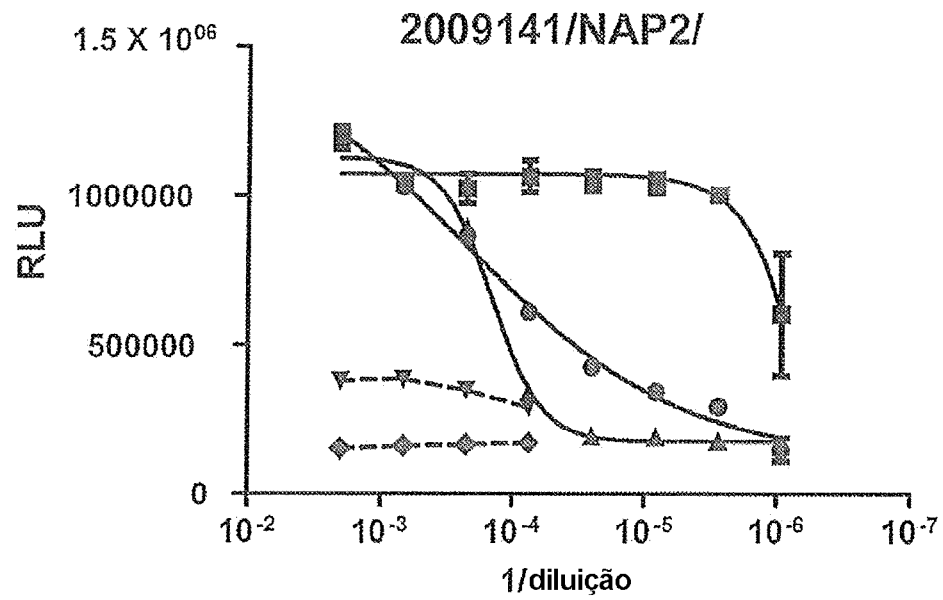


FIG. 23J

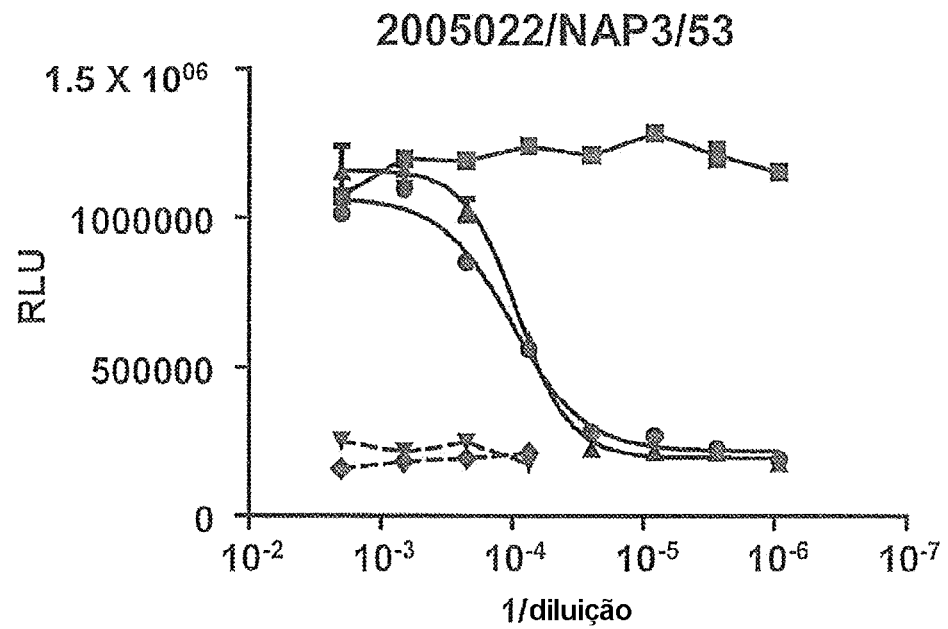
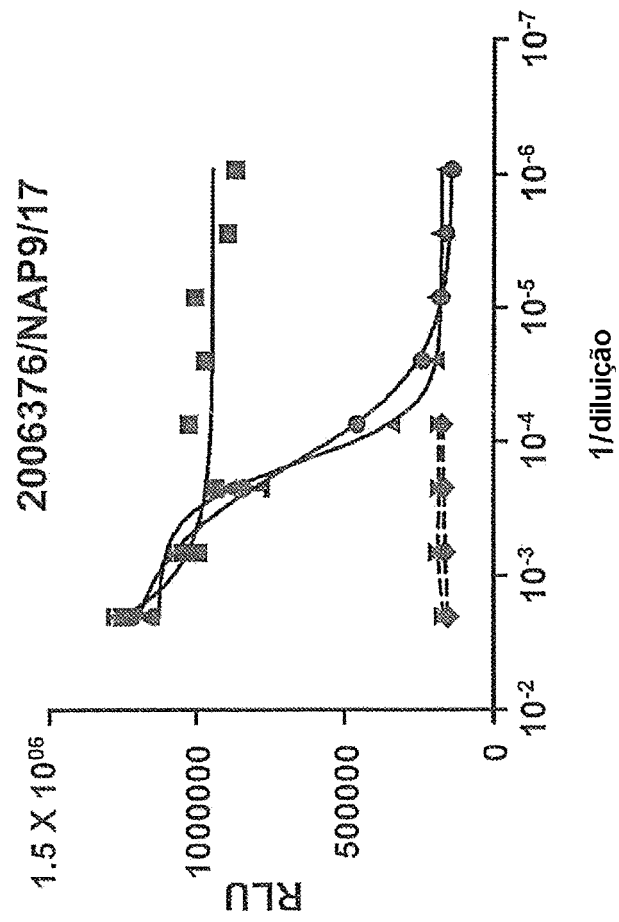
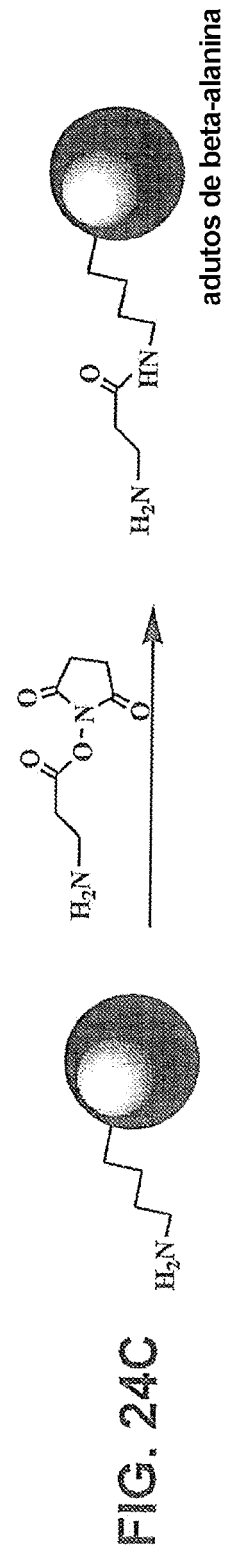
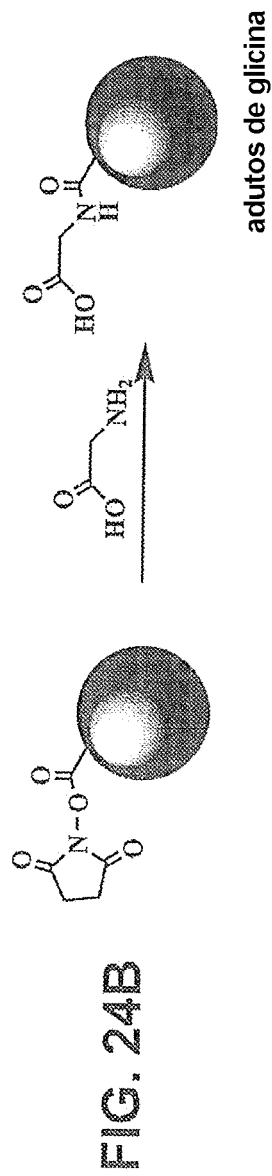
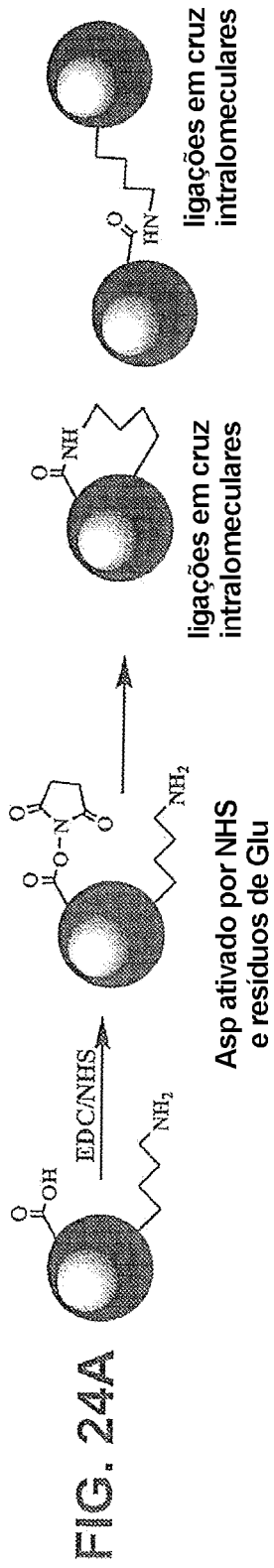


FIG. 23K





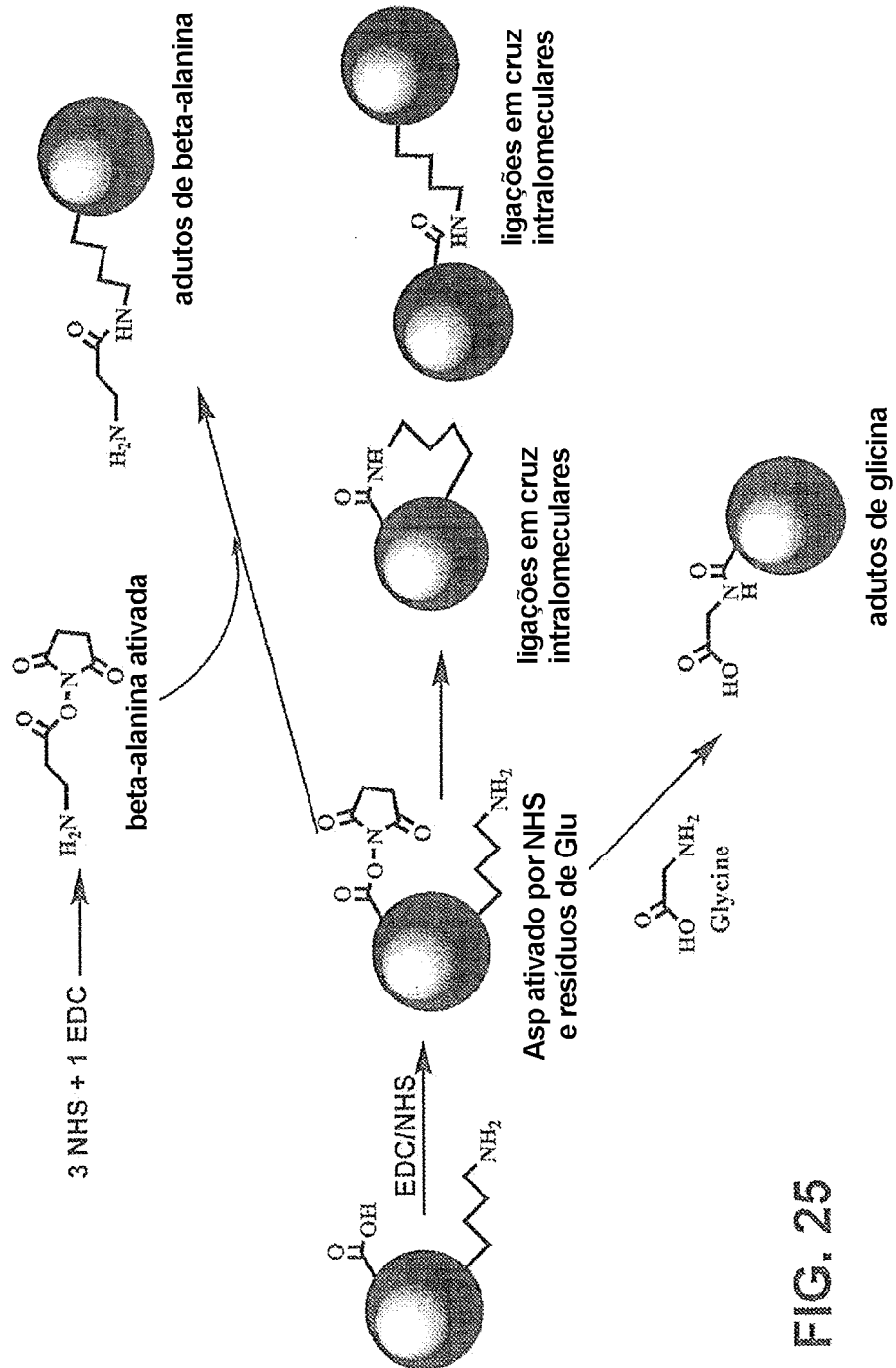


FIG. 25

FIG. 26

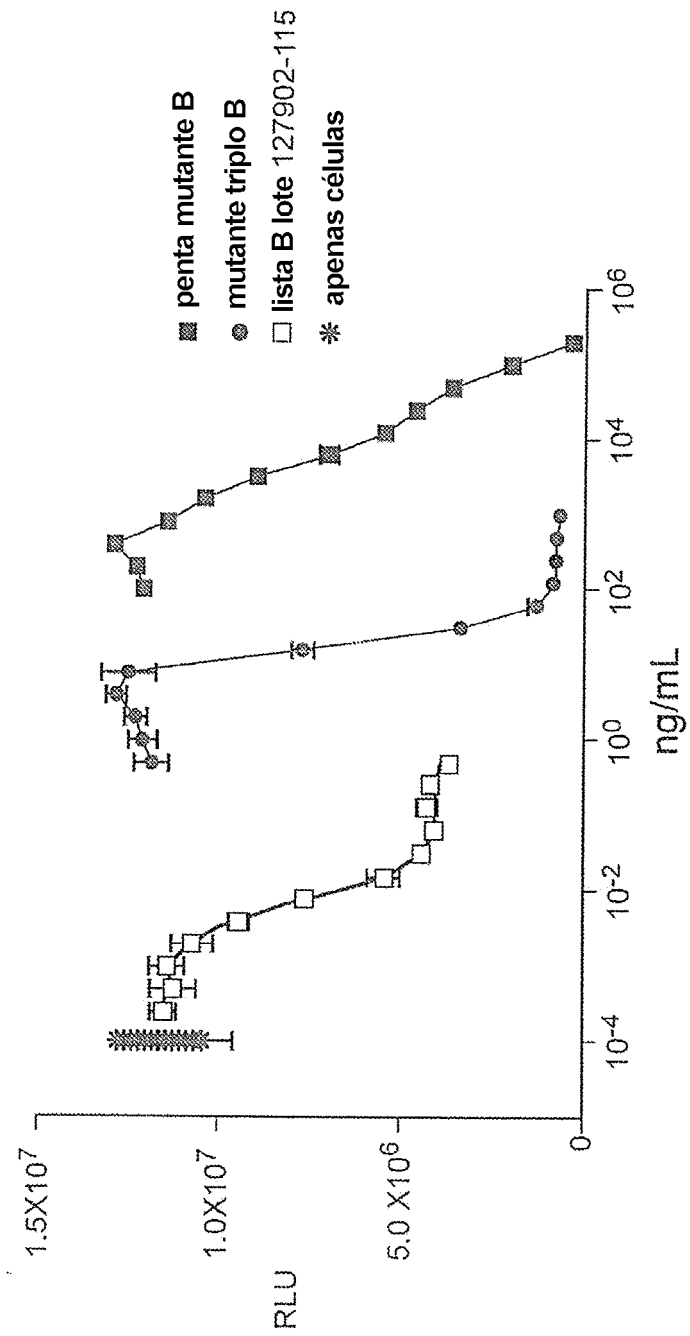


FIG. 27

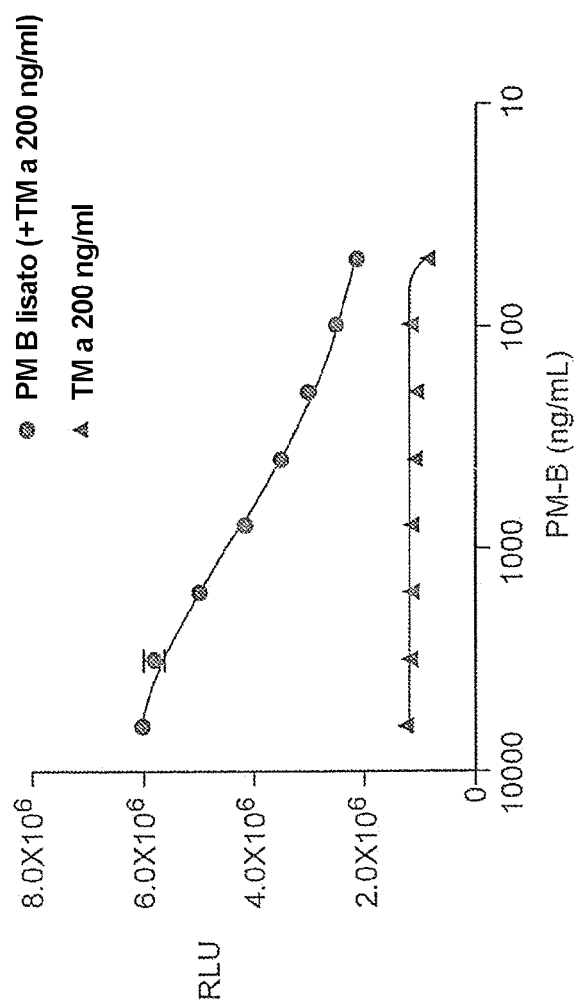


FIG. 28

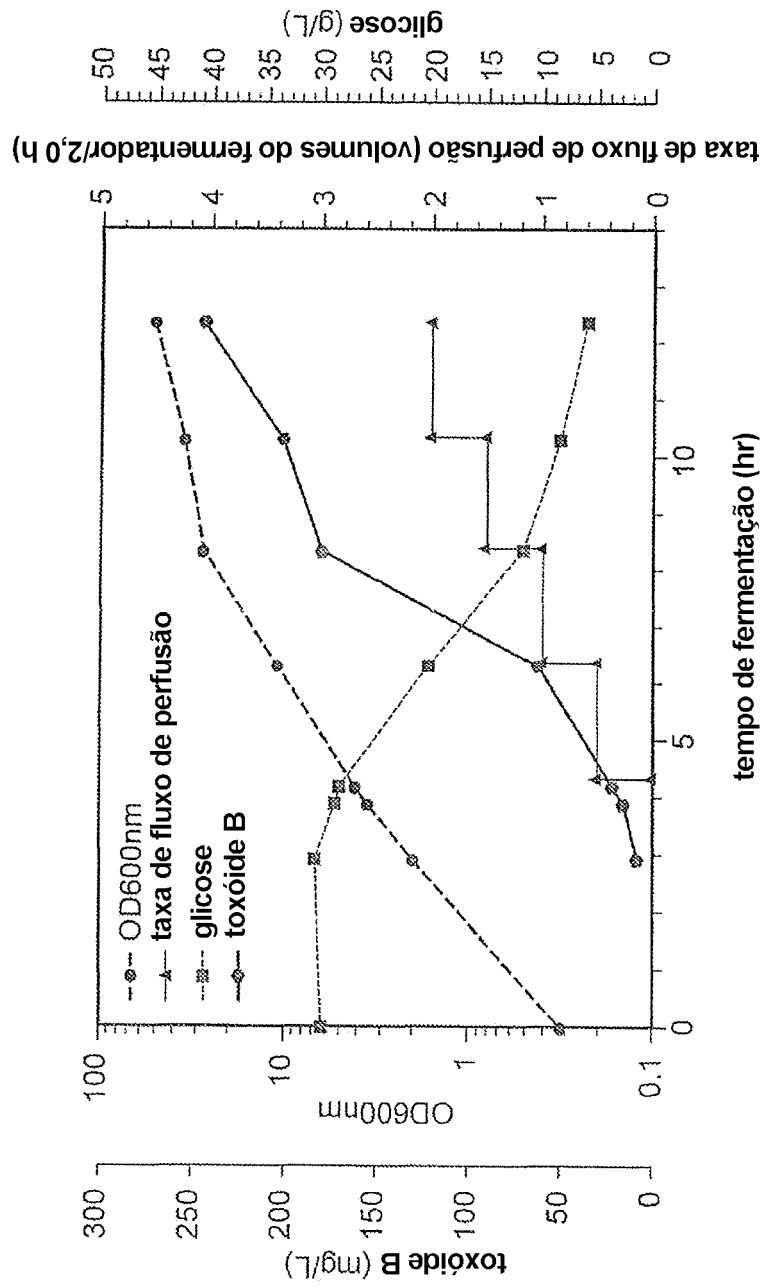


FIG. 29

