

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 671**

51 Int. Cl.:

A61K 39/08 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 13183746 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2674169**

54 Título: **Inmunógenos polisacáridos de la Clostridium difficile**

30 Prioridad:

11.09.2007 US 971411 P

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

27.04.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GUELPH (100.0%)
50 Stone Road East
Guelph, ON N1G 2W1, CA**

72 Inventor/es:

**GANESHAPILLAI, JEYABARATHY y
MONTEIRO, MARIO ARTUR**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 534 671 T3

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

Inmunógenos polisacáridos de la *Clostridium difficile***Descripción**

- 5 **[0001]** La presente solicitud se refiere a nuevos polisacáridos inmunogénicos de superficie celular y a procedimientos y usos de los mismos.

ANTECEDENTES

- 10 **[0002]** *Clostridium difficile* es una bacteria Gram positiva conocida por ser la causa de enfermedades entéricas. Es la causa principal de la diarrea asociada a antibióticos y a la colitis pseudomembranosa (Knoop, F. C.; Owens, M.; Crocker, I. C.; Clin. Microbiol. Rev. 6, 1993, 251 – 265). La frecuencia y severidad de los brotes asociados a *C. difficile* ha incrementado en los últimos años (Pepin, J.; Valiquette, L.; Alary, M. E.; Villemure, P.; Pelletier, A.; Forget, K.; Pepin, K.; Chouinard, D.; JAMC. 171, 2004, 466 – 472). Las mayoría de las células vegetativas ingeridas de *C. difficile* se destruyen por el entorno ácido presente en el estómago. Las esporas, sin embargo, pueden sobrevivir a esto y tras la exposición a los ácidos biliares pueden germinar en el intestino delgado. Los niveles reducidos de células microbianas normales en los intestinos debidos a tratamientos médicos como el uso de antibióticos y la quimioterapia permiten la proliferación de *C. difficile*.

- 20 **[0003]** En humanos, la diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD) es la causa más comúnmente diagnosticada de diarrea asociada a hospitales y asociada a antimicrobianos. El riesgo de CDAD ha sido tradicionalmente más alto en pacientes de edad avanzada y en aquellos que se han sometido a hospitalización, cirugía gastrointestinal o han estado expuestos a antibióticos. En Estados Unidos, el número estimado de casos de enfermedades asociadas a *C. difficile* supera los 250.000 por año (Wikkins TD y Lyerly DM, 2003, J. Clin Hasp Infect 48: 81), con un coste adicional total de atención sanitaria de aproximadamente mil millones de dólares anuales (Kyne L, et al., 2002, Clin Infect Dis 34: 346 – 353).

- 30 **[0004]** En los últimos cinco años se ha observado un incremento inesperado en la incidencia de CDAD. Esto también se ha asociado con proporciones más elevadas de CDAD severa, fracaso en el tratamiento y muerte. Se están identificando con más frecuencia casos severos en pacientes más jóvenes y en aquellos sin factores de riesgo tradicionales. Gran parte de este cambio se ha asociado a la diseminación internacional de un agente causal, denominado ribotipo 027 (también conocido como pulstipo 1 norteamericano (NAP1) y BI. La prevención de *C. difficile* se basa en el aislamiento del paciente, una mejor higiene, un mejor control de la infección y restricción antimicrobiana, estando todo esto asociado a mayores costes de atención sanitaria. Además, se han utilizado antibióticos de manera profiláctica para prevenir la infección; sin embargo, permite un incremento en la incidencia de la enfermedad. El tratamiento de las infección por *C. difficile* también es problemático dado que la respuesta a metronidazol, el tratamiento de primera elección, se ha vuelto impredecible. La vancomicina, la elección alternativa, es cara y su abuso aumenta el preocupación sobre la emergencia de enterococos resistentes a la vancomicina y otros organismos resistentes a la vancomicina.

- 40 **[0005]** La CDAD también es un problema importante en muchas especies animales como caballos y cerdos. También puede ser una causa de enfermedad en otras especies. Existe la preocupación de que *C. difficile* pueda ser transmisible de animales a humanos ya que los tipos de *C. difficile* aislados de animales son, a menudo, los mismos que los encontrados en las personas, incluyendo la cepa causal ribotipo 027. Esta preocupación ha aumentado en base a los descubrimientos de *C. difficile* en muestras de carne de venta al por menor.

- 50 **[0006]** El incremento de la incidencia de CDAD, sus proporciones de recurrencia y su impacto en la morbilidad y la mortalidad, así como los costes asociados con el tratamiento y los procedimientos de aislamiento apropiados para limitar su propagación evidencian la necesidad de enfoques de prevención efectivos para CDAD.

- 55 **[0007]** Una cepa particular, denominada ribotipo 027 o NAP1 ha surgido como causa importante de enfermedad esporádica y epidémica internacionalmente. Se ha informado de serios brotes con alta morbilidad, alta mortalidad, respuesta pobre al tratamiento y elevadas proporciones de recaída. Esta cepa produce 3 toxinas principales: toxina A, toxina B y CDT (toxina binaria). También tiene una delección en una toxina que pretende regular el gen que arece aumentar la producción de toxina, al menos *in vitro* (Just, I.; Selzer, J.; Wilm, M.; von Eichel-Streiber, C; Mann, M.; Aktories, K.; Nature. 375, 1995, 500 – 5033). Se ha encontrado que esta bacteria formadora de esporas resiste la fagocitosis por los polisacáridos de la superficie celular. GANESHAPILLAI J ET AL, ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, THE SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 107, Enero del 2007, página 232, divulga polisacáridos de superficie celular de la *Clostridium difficile*.

- 60 **[0008]** Poxton y Cartmill (Poxton, I. R; Cartmill; T. D. J Gen Microbiol. 1982, 128, 1365 – 1370) describen la composición de azúcar de dos preparaciones extraídas de la cepa NCTC 11223 de *C. difficile*. Se observó que el material obtenido por el tratamiento de las células con NaOH contenía glucosa, manosa, galactosamina y fosfato, y el otro, extraído por el tratamiento de las células con fenol contenía glucosa, glucosamina, fosfato y ácidos grasos. En el mismo trabajo, también se observó que ambas preparaciones se retrocruzaron con antisuero *Clostridium sordellii*. Craneshapillai et al., 2007, describe el aislamiento y el uso de polisacáridos de *C. difficile* como vacuna.

5 [0021] Un aspecto adicional de la presente solicitud es un método para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto que la necesita de una cantidad efectiva de uno o más polisacáridos de superficie celular descritos en la presente o las composiciones inmunogénicas descritas en la presente o las composiciones de vacuna descritas en la presente.

10 [0022] La presente solicitud también describe usos de los polisacáridos de superficie celular descritos en la presente o la mezcla polisacárida de superficie celular descrita en la presente o las composiciones inmunogénicas descritas en la presente o las composiciones de vacuna descritas en la presente para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y / o para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

15 [0023] Un aspecto adicional de la presente solicitud incluye usos de los polisacáridos de superficie celular descritos en la presente o la mezcla polisacárida de superficie celular descrita en la presente o las composiciones inmunogénicas descritas en la presente o las composiciones de vacuna descritas en la presente para fabricar un medicamento que induzca una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y / o para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

20 [0024] Otras características y ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración, ya que para los expertos en la técnica serán aparentes varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y ámbito de la invención a partir de esta descripción detallada.

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0025] La invención se describirá a continuación respecto a los dibujos en los que:

30 La Figura 1 es un análisis del tipo enlace monosacárido (perfil GC – MS) del polisacárido PS – II de *C. difficile*, que muestra los tipos de enlaces de azúcar presentes en PS – II.

La Figura 2 es un espectro $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NMR de (A) PS – I y (B) PS – II.

35 La Figura 3 es un espectro (A) $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NOESY de PS – I de *C. difficile* que muestra conectividades inter - NOE que indican la secuencia de las unidades monosacáridas y (B) muestra la estructura química del bloque de repetición de sacárido de PS – I que ilustra los enlaces y la secuencia obtenida a partir de los datos del espectro $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NOESY mostrado en (A).

40 La Figura 4 muestra un espectro (A) $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ – HMBC que muestra la conexión del glicosil fosfato a la posición número 1 de la Glc unida en 2 y a la posición número 4 de Rha unida en 4 en el polisacárido PS – I; y (B) un espectro $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ – HMBC que muestra la conexión del glicosil fosfato a la posición número 1 de Man unida en 3 y a la posición número 6 de Glc unida en 6 en el polisacárido PS – II.

45 La Figura 5 es un espectro de masas MALDI – TOF de un sacárido defosforilado de repetición de polisacárido PS – II de *C. difficile*.

La Figura 6 muestra la estructura química covalente del polisacárido de superficie celular de repetición (A) PS – I y (B) PS – II.

50 La Figura 7 muestra el análisis de la composición monosacárida (perfil GC – MS) del polisacárido PS – III de *C. difficile*.

55 La Figura 8 muestra el análisis serológico *dot – blot* de cinco cerdos inoculados con una mezcla de polisacáridos de superficie celular PS – I y PS – II de *C. difficile*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. DEFINICIONES

60 [0026] El término “*Clostridium difficile*” tal y como se utiliza en la presente incluye todas las cepas de *Clostridium difficile*, incluyendo, por ejemplo, el ribotipo 027 (también conocido como NAP1 y Bi), el ribotipo W (también conocido como NAP2), MOH 900 y MOH 718.

- [0027]** El término “aislado” tal y como se utiliza en la presente se refiere a polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* sustancialmente libres de material celular bacteriano o el solvente de extracción cuando se producen a partir de cultivos de cepas bacterianas de *Clostridium difficile*.
- 5 **[0028]** Tal y como se utiliza en la presente, “polisacárido de superficie celular de *Clostridium difficile*” incluye aquellos aislados de cepas bacterianas de *Clostridium difficile*, y también incluye polisacáridos producidos sintéticamente para tener la misma estructura y / o composición que los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente. “Producidos sintéticamente” incluye, por ejemplo, polisacáridos de superficie celular producidos mediante técnicas como la tecnología de ADN recombinante, ratones *knockout* y / o síntesis química.
- 10 **[0029]** El término “estructura química covalente” tal y como se utiliza en la presente se refiere a la fórmula química de un compuesto en la que todos los grupos están unidos mediante enlaces covalentes.
- 15 **[0030]** Tal y como se utiliza en la presente, el término “fragmento de los mismos” se refiere a cualquier porción de los polisacáridos de superficie celular descritos en la presente que conservan actividad inmunogénica contra *Clostridium difficile*. El fragmento puede contener uno o más de los monosacáridos (azúcares) o fosfatos de azúcar que están en las estructuras químicas covalentes de los polisacáridos. Se puede determinar si los fragmentos conservan o no actividad inmunogénica utilizando técnicas conocidas en el arte.
- 20 **[0031]** Tal y como se utiliza en la presente, el término “inmunogénico” se refiere a la capacidad para obtener una respuesta inmune.
- 25 **[0032]** Tal y como se utiliza en la presente, el término “vacuna” se refiere a una composición que previene la infección por *Clostridium difficile*, trata la infección por *Clostridium difficile* y / o reduce la propagación de *Clostridium difficile*.
- 30 **[0033]** El término “cantidad terapéuticamente efectiva”, “cantidad efectiva” o “cantidad suficiente” se refiere a una cantidad suficiente para, cuando se administra a un sujeto, incluyen un mamífero, por ejemplo un humano, lograr un resultado deseado, por ejemplo una cantidad efectiva para obtener una respuesta inmune en un sujeto. Las cantidades efectivas de terapéutico pueden variar según diversos factores como el estado de la enfermedad, la edad, sexo y peso del animal. La dosis o el régimen de tratamiento puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.
- 35 **[0034]** Además, un régimen de “tratamiento” de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva puede consistir en una administración única, o, alternativamente, comprender una serie de aplicaciones. La extensión del período de tratamiento depende de varios factores, como la severidad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración y la actividad de los polisacáridos, o una combinación de los mismos. También cabe señalar que la dosis efectiva del compuesto empleado para el tratamiento o la prevención puede aumentarse o reducirse durante el curso de un régimen de tratamiento o prevención particular. Los cambios de dosis pueden ser resultado y hacerse evidentes a partir de ensayos de diagnósticos estándares conocidos en la disciplina. Los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse antes, durante o después de una exposición a la bacteria.
- 40 **[0035]** La expresión “biológicamente compatible a partir de *in vivo*” tal y como se utiliza en la presente se refiere a una manera de administrar la sustancia en la que cualquier efecto tóxico se contrarresta por los efectos terapéuticos.
- 45 **[0036]** El término “obtener una respuesta inmune” o “inducir una respuesta inmune” tal y como se utiliza en la presente se refiere a iniciar, desencadenar, causar, aumentar, mejorar o incrementar cualquier respuesta del sistema inmune, por ejemplo, de naturaleza humoral o mediada por células. El inicio o aumento de una respuesta inmune puede establecerse empleando ensayos conocidos por los expertos en la disciplina, incluyendo, de manera no limitante, ensayos de anticuerpos (por ejemplo ensayos ELISA), ensayos de citotoxicidad específica de antígenos y la producción de citoquinas (por ejemplo ensayos ELISPOT).
- 50 **[0037]** El término “sujeto” tal y como se utiliza en la presente se refiere a cualquier miembro del reino animal, preferiblemente un mamífero. En una realización, el mamífero es un perro, un gato, un hámster, un ratón, una rata, un cerdo, un caballo, reses o un ser humano. En otra realización, el mamífero es un cerdo, un caballo, una res o un ser humano.
- 55 **[0038]** Tal y como se utiliza en la presente y tal y como se entiende en la disciplina, el término “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados puede incluir, de manera no limitante, alivio o mejora de uno o más síntomas o condiciones, disminución del alcance de la enfermedad, estado estable (es decir, que no empeora) de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o retardo de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la enfermedad y remisión (parcial o total) ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede referirse a la prolongación de la supervivencia en comparación a la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.
- 60 **[0038]** Tal y como se utiliza en la presente y tal y como se entiende en la disciplina, el término “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados puede incluir, de manera no limitante, alivio o mejora de uno o más síntomas o condiciones, disminución del alcance de la enfermedad, estado estable (es decir, que no empeora) de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o retardo de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la enfermedad y remisión (parcial o total) ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede referirse a la prolongación de la supervivencia en comparación a la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.
- 65 **[0038]** Tal y como se utiliza en la presente y tal y como se entiende en la disciplina, el término “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados puede incluir, de manera no limitante, alivio o mejora de uno o más síntomas o condiciones, disminución del alcance de la enfermedad, estado estable (es decir, que no empeora) de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o retardo de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la enfermedad y remisión (parcial o total) ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede referirse a la prolongación de la supervivencia en comparación a la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.

[0039] “Paliar” una enfermedad o trastorno se refiere a que el alcance o las manifestaciones clínicas insedeables de un trastorno o enfermedad son menores y / o el curso de tiempo de la progresión se ha ralentizado o alargado, en comparación a cuando no se trata el trastorno.

[0040] Por ejemplo, la frase “tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile*” incluye inhibir la infección por *Clostridium difficile*, prevenir la infección por *Clostridium difficile*, disminuir la severidad de la infección por *Clostridium difficile*, inhibir la colonización de *Clostridium difficile*, reducir la propagación de *Clostridium difficile* o mejorar los signos y síntomas relacionados con la infección por *Clostridium difficile*, y la frase “tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile*” incuye inhibir la diarrea asociada a *Clostridium difficile*, prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile*, disminuir la severidad de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* o mejorar los signos y síntomas relacionados con la diarrea asociada a *Clostridium difficile*. Esto también incluye el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad asociada con una infección por *Clostridium difficile*.

[0041] Comprendiendo el alcance de la presente divulgación, el término “que comprende” y sus derivados, tal y como se utilizan en la presente, pretenden ser términos abiertos que especifican la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, integrantes y / o pasos descritos, pero no excluyen la presencia de otros características, elementos, componentes, grupos, integrantes y / o pasos no descritos. Lo anterior también se aplica a las palabras que tienen significados similares, como los términos “incluyendo”, “que tiene” y sus derivados. Finalmente, los términos de grado como “sustancialmente”, “unos” y “aproximadamente” tal y como se utilizan en la presente se refieren a una cantidad razonable de desviación del término modificado de manera que el resultado final no cambia significativamente. Estos términos de grado deberían interpretarse como la inclusión de una desviación de, al menos, $\pm 5\%$ del término modificado si esta desviación no invalidara el significado de la palabra a la que modifica.

II. COMPUESTOS Y COMPOSICIONES DE LA APLICACIÓN

[0042] Como se ha mencionado anteriormente, la presente solicitud describe el aislamiento y la identificación de la estructura química covalente de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile*. Estos nuevos polisacáridos se exponen en la superficie celular de *Clostridium difficile* y pueden utilizarse en composiciones inmunogénicas, preparaciones de vacunas basadas en carbohidratos y / o marcadores de diagnóstico.

[0043] En consecuencia, se describen en la presente polisacáridos aislados inmunogénicos de superficie celular de *Clostridium difficile*. La presente solicitud también incluye una mezcla polisacárida de superficie celular de *Clostridium difficile* que comprende uno o más polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile*.

[0044] La presente solicitud también incluye una composición inmunogénica que comprende uno o más polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile*.

[0045] La presente solicitud incluye además una composición de vacuna que comprende uno o más polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile*.

[0046] La presente solicitud describe el aislamiento y la caracterización de tres polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* diferentes. Estos se denominan PS – I, PS – II y PS – III en la presente solicitud.

[0047] Se ha descubierto, utilizando análisis químicos y técnicas analíticas, como cromatografía de gases (GC), resonancia nuclear magnética (NMR) y espectrometría de masas (MS), que PS – I es un polímero de unidades de repetición pentasacáridas unidas mediante enlaces fosfodiéster y que PS – II es un polímero de unidades de repetición hexasacáridas también unidas mediante enlaces fosfodiéster. En algunas preparaciones, el polisacárido PS – II puede contener una glucosa adicional. Específicamente, se ha descubierto que PS – I es una unidad de repetición de pentaglicosil fosfato ramificado compuesto de glicosil fosfato, ramnosa y glucosa; que PS – II es una unidad de repetición de hexaglicosil fosfato ramificado compuesto de glucosa, manosa, N – acetil – galactosamina y glicosil fosfato; y se ha determinado que PS – III se compone de glicerol, alditol fosfato, glucosa y N – acetil – glucosamina.

[0048] En una realización descrita en la presente, los polisacáridos de superficie celular se obtienen aislandolos de cepas de bacterias de *Clostridium difficile*, por ejemplo cultivando bacterias de *Clostridium difficile* en un medio adecuado, separando células bacterianas del medio, extrayendo polisacáridos de superficie celular mediante un tratamiento de ácido suave en condiciones para clivar los polisacáridos del material de la superficie celular, y purificando los polisacáridos de superficie celular extraídos. En otra realización descrita en la presente, el ácido suave es ácido acético al 0,1 % al 5 %, adecuadamente 2 %. En otra realización descrita en la presente los polisacáridos de superficie celular se purifican o separan mediante centrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño y / o cromatografía de intercambio aniónico.

[0049] En una realización descrita en la presente, los polisacáridos de superficie celular comprenden unidades pentasacáridas de la fórmula I:

CRM₁₉₇. CRM₁₉₇ es una versión no tóxica de una toxina diftérica que se ha usado con éxito en vacunas neumocócicas conjugadas (Anderson, P. W., 1983, infect. Immun. 39: 233 – 238). En otra realización, la molécula portadora es MIEP (promotor principal inmediato - precoz). MIEP puede derivarse del complejo de membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B y de otro grupo meningocócico B (Merck). En otra realización, la molécula portadora es un toxoide diftérico: En otra realización, la molécula portadora es toxoide tetánico. En otra realización, la molécula portadora es una proteína derivada de *Bordetella*.

[0086] La molécula portadora puede unirse al polisacárido de superficie celular utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, mediante un enlace éster o amida entre grupos hidroxilo o carboxilo disponibles en los grupos sacáridos y carboxilo o amino de la proteína.

[0087] Se ha informado anteriormente de otras moléculas portadoras y métodos para su unión (véase, por ejemplo, la patente US 4,673,574).

[0088] Se puede mejorar significativamente la inmunogenicidad si el agente inmunizador (es decir, el polisacárido de superficie celular de *Clostridium difficile* o las composiciones inmunogénicas que comprenden polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* o las composiciones de vacuna que comprenden polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente) es independiente del formato de administración y está coadministrado con un componente inmunoestimulador, como un adyuvante. Los adyuvantes mejoran la inmunogenicidad de un inmunógeno pero no son necesariamente inmunogénicos por sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar conservando el inmunógeno localmente próximo al sitio de administración para producir un efecto de depósito para facilitar la liberación lenta y sostenida de inmunógeno en las células del sistema inmune. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmune a un depósito de inmunógeno y estimular dichas células para obtener una respuesta inmune. De esta manera, las realizaciones de esta presente solicitud abarcan composiciones que incluyen, por ejemplo, composiciones inmunogénicas, de vacuna o farmacéuticas que comprenden, además, adyuvantes.

[0089] Otro aspecto de la presente solicitud es una composición inmunogénica que comprende uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente y un componente inmunoestimulador, como un adyuvante.

[0090] Otro aspecto de la presente solicitud es una composición de vacuna que comprende uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente y un componente inmunoestimulador, como un adyuvante.

[0091] Los adyuvantes se han utilizado durante muchos años para mejorar las respuestas inmunes del huésped para, por ejemplo, las vacunas. Los adyuvantes intrínsecos (como los lipopolisacáridos) son, normalmente, componentes de bacterias muertas o atenuadas utilizadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que, normalmente, se unen no covalentemente a antígenos y están formulados para mejorar las respuestas inmunes del huésped. De este modo, se ha identificado que los adyuvantes mejoran la respuesta inmune a antígeno distribuidos parenteralmente. Sin embargo, algunos de estos adyuvantes son tóxicos y pueden causar efectos secundarios indeseables que los hacen inapropiados para su uso en humanos y muchos animales. De hecho, tan solo el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (denominado comúnmente alúmina) se utilizan de manera rutinaria como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. Está bien establecida la eficacia de la alúmina para aumentar las respuestas de anticuerpos a toxoides de la difteria y del tétanos.

[0092] Existe una amplia gama de adyuvantes extrínsecos que pueden provocar potentes respuestas inmunes a inmunógenos. Estos incluyen saponinas complejadas a antígenos de proteína membranal (complejos inmunoestimuladores), polímeros pluriónicos con aceite mineral, micobacterias muertas y aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos como dipéptido muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípidos A y liposomas.

[0093] En un aspecto descrito en la presente, los adyuvantes útiles en cualquiera de las realizaciones descritas en la presente son los siguientes. Los adyuvantes para inmunización parenteral incluyen compuestos de aluminio (como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y hidroxifosfato de aluminio). El antígeno puede precipitarse con, o ser absorbido por, el compuesto de aluminio según protocolos estándares. También pueden emplearse otros adyuvantes como RIBI (ImmunoChem, Hamilton, MT) en la administración parenteral.

[0094] Los adyuvantes para la inmunización mucosal incluyen toxinas bacterianas (por ejemplo, la toxina del cólera (CT), la toxina termolábil de *E. coli* (LT), la toxina A de *Clostridium difficile* y la toxina pertussis (PT), o combinaciones, subunidades, toxoides o mutantes de los mismos). Por ejemplo, se puede utilizar una preparación purificada de subunidad B de toxina nativa del cólera (CTB). También son apropiados fragmentos, homólogos, derivados y fusiones de cualquiera de estas toxinas, siempre y cuando conserven actividad adyuvante. Preferiblemente se utiliza un mutante que tiene toxicidad reducida. Se han descrito mutantes apropiados (por ejemplo, en las patentes WO 95/ 17211 (mutante CT Arg – 7 – Lys), WO 96/ 6627 (mutante LT Arg – 192 – Gly), y WO 95 / 34323 (mutantes PT Arg – 9 – Lys y Glu – 129 – Gly)). Otros mutantes LT que pueden utilizarse en los

métodos y composiciones descritos en la presente incluyen, por ejemplo, los mutantes Ser – 63 – Lys, Ala – 69 – Gly, Glu – 110 – Asp y Glu – 112 – Asp. También pueden utilizarse otros adyuvantes (como lípido A monofosforil bacteriano (MPLA) de diversas fuentes (por ejemplo, de *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri*, saponinas o microesferas de poliláctico glicólico (PLGA)) en la administración mucosal.

5 [0095] Los adyuvantes útiles para la inmunización tanto mucosal como parenteral incluyen polifosfaceno (por ejemplo, la patente WO 95/ 2415), DC – chol (3 – b – (N – (N',N' - dimetil – aminometano) – carbamoil) – colesterol (por ejemplo, las patentes US 5.283.185 y WO 96/ 14831) y QS – 21 (por ejemplo la patente WO 88/ 9336).

10 [0096] Un sujeto puede inmunizarse con una composición que incluya, por ejemplo, una composición inmunogénica, de vacuna o farmacéutica que comprenda los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente mediante cualquier vía de administración convencional conocida por los expertos en la disciplina. Esto puede incluir, por ejemplo, inmunización mediante la vía de una superficie mucosal (por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, pulmonar, intestinal, rectal, vaginal, o trato urinario), mediante la vía parenteral (por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal) o intranodalmente. Las vías preferidas dependen de la elección del inmunógeno, tal y como resultará evidente para los expertos en la disciplina. vacuna. El tratamiento se puede efectuar en una sola dosis o repetida a intervalos. La dosificación apropiada depende de diversos parámetros entendidos por los expertos en la técnica, así como de la propia formulación del inmunógeno, es decir, péptido vs. ácido nucleico (y tipos más específicos de los mismos), la vía de administración y la condición del animal que se va a vacunar (peso, edad y similares).

20 [0097] Los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* o composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna descritos en la presente se pueden preparar mediante métodos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, de manera que una cantidad efectiva de la sustancia activa se combine en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen vehículos aceptables en, por ejemplo, *Reminton's Pharmaceutical Sciences* (Reminton's Pharmaceutical Sciences, 20ª de., Mack Publishing Company, Easton, Pa., EEUU, 2000). En base a esto, las composiciones incluyen, de manera no exclusiva, soluciones de las sustancias junto a uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y conservadas en soluciones tamponadas con un pH apropiado e isosmótico con los fluidos fisiológicos.

25 [0098] Las composiciones farmacéuticas incluyen, de manera no limitante, polvos liofilizados o soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas estériles inyectables, que pueden contener, además, antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que vuelven las composiciones sustancialmente compatibles con los tejidos y la sangre de un recipiente previsto. Otros componentes que pueden estar presentes en tales composiciones incluyen, por ejemplo, agua, tensioactivo (como Tween), alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales. Las soluciones y suspensiones de extemporáneas para inyección pueden prepararse a partir de polvos, gránulos, tabletas estériles o soluciones o suspensiones concentradas. La composición farmacéutica puede suministrarse, por ejemplo, aunque de manera no limitante, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua o solución salina estéril antes de la administración al paciente.

35 [0099] Las composiciones que incluyen, por ejemplo, composiciones inmunogénicas, de vacuna o farmacéuticas de la presente solicitud pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, esencialmente, composiciones inertes químicamente y no tóxicas que no interfieren con la efectividad de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, de manera no limitante, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de N – [1 – (2, 3 – dioleiloxi)propil] – N, N – trimetilamonio (DOTMA), dioleil – fosfatidiletanolamina (DOPE) y liposomas. Dichas composiciones deberían contener una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto junto a una cantidad apropiada de portador, de manera que se obtenga la forma para la administración directa al paciente.

40 [0100] La composición puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, que incluye, de manera no limitante, aquellas formadas con grupos amino libres como los derivados de los ácidos hidroclicóric, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres como los derivados de los hidróxidos potásico, amónico, cálcico y férrico, isopropilamina, trietilamina, etanol 2 – etilamino, histidina, procaína, etc.

45 [0101] Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar, por ejemplo, mediante administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, oral o por aerosol.

50 [0102] En consecuencia, otra realización descrita en la presente es una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del polisacárido de superficie celular de *Clostridium difficile* descrito en la presente en una mezcla con un excipiente, diluyente, portador, tampón o estabilizante apropiado.

55 [0103] En una realización adecuada, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración a sujetos en una forma *in vivo* biológicamente compatible.

5 [0104] Otro aspecto descrito en la presente es un kit que comprende los polisacáridos de superficie celular descritos en la presente o la mezcla de polisacáridos de superficie celular descrita en la presente o las composiciones inmunogénicas descritas en la presente o las composiciones de vacuna descritas en la presente o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, así como instrucciones para el uso de las mismas.

10 [0105] El kit también incluye agentes secundarios. Por ejemplo, el kit puede incluir un instrumento para inyectar la composición inmunogénica descrita en la presente a un sujeto, como una jeringa, un vaso para conservar o transportar la composición inmunogénica y / o excipientes, portadores, tampones o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

III. MÉTODOS Y USOS DE LA SOLICITUD

15 [0106] Otro aspecto de la presente solicitud es un método para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

20 [0107] Un aspecto adicional de la presente solicitud es un método para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

25 [0108] Un aspecto adicional de la presente solicitud es un método para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

30 [0109] La presente solicitud también describe usos de uno o más polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto, para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

35 [0110] Otros aspectos de la presente solicitud incluyen usos de uno o más polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto, para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

40 [0111] Otro aspecto de la presente solicitud es un método para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente donde las composiciones inmunogénicas comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

45 [0112] Un aspecto adicional de la presente solicitud es un método para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente donde las composiciones inmunogénicas comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

50 [0113] Un aspecto adicional de la presente solicitud es un método para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente donde las composiciones inmunogénicas comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

55 [0114] La presente solicitud también describe usos de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente donde las composiciones inmunogénicas comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto, para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

60 [0115] Otros aspectos de la presente solicitud incluyen usos de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente donde las composiciones inmunogénicas comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto, para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

65 [0116] Otro aspecto de la presente solicitud es un método para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de las composiciones de vacuna descritas en la presente donde las composiciones de vacuna comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

5 [0117] Un aspecto adicional de la presente solicitud es un método para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de las composiciones de vacuna descritas en la presente donde las composiciones de vacuna comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

10 [0118] Un aspecto adicional de la presente solicitud es un método para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto mediante la administración al sujeto de las composiciones de vacuna descritas en la presente donde las composiciones de vacuna comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente.

15 [0119] La presente solicitud también describe usos de las composiciones de vacuna descritas en la presente donde las composiciones de vacuna comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto, para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

20 [0120] Otros aspectos de la presente solicitud incluyen usos de las composiciones de vacuna descritas en la presente donde las composiciones de vacuna comprenden uno o más de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* descritos en la presente para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune contra *Clostridium difficile* en un sujeto, para tratar o prevenir la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto y para tratar o prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

25 [0121] Los métodos y usos descritos en la presente solicitud son aplicables a sujetos entre los que se incluyen, por ejemplos, cerdos, caballos, reses y seres humanos.

30 [0122] La presente solicitud también describe métodos y usos de los polisacáridos de superficie celular de *Clostridium difficile* como macadores de diagnóstico para una infección por *Clostridium difficile*. Por ejemplo, dado que el ribotipo 027 de *Clostridium difficile* posee únicamente PS – I, la presencia de este polisacárido en su material celular puede indicar la presencia de este ribotipo en una muestra. La muestra puede ser de un sujeto humano o animal, de alimentos o agua, o de otras sustancias que sospechan infectadas con *Clostridium difficile*.

35 [0123] En consecuencia, la presente solicitud incluye un método para detectar *Clostridium difficile* en una muestra de ensayo que comprende analizar la muestra para la presencia de uno o más de los polisacáridos de superficie celular aislados descritos en la presente. Esto también incluye el uso de uno o más de los polisacáridos de superficie celular aislados descritos en la presente para detectar *Clostridium difficile* en una muestra de ensayo.

40 [0124] La presencia de uno o más de los polisacáridos de superficie celular aislados descritos en la presente pueden analizarse, por ejemplo, aislando los polisacáridos de la muestra y llevando a cabo análisis químicos para determinar la identidad de los sacáridos presentes en el polisacáridos. Dichos análisis químicos pueden incluir uno o más de (i) GLC – MS de los correspondientes acetatos de alditol, espectroscopias MS y NMR.

45 [0125] La divulgación anterior describe, en general, la presente invención. Se obtendrá una mejor y más completa comprensión de la misma en referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con el propósito de ilustrar y no pretender limitar el alcance de la invención.

[0126] Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención.

50 **IV. EJEMPLOS**

55 [0127] Se eligieron tres cepas de *C. difficile* para la investigación. Una cepa particular, denominada ribotipo 027 o pulso tipo 1 norteamericano (NAP1) surgió como causa importante de enfermedad esporádica y epidémica internacionalmente. Se informó de serios brotes con alta morbilidad, alta mortalidad, respuesta pobre al tratamiento y elevadas proporciones de recaída. Esta cepa produce tres toxinas principales: toxina A, toxina B y CDT (toxina binaria). Las otras cepas investigadas son MOH 900 de *C. difficile*, que expresa solo dos de las tres toxinas (toxinas A y B) y que se ha descubierto que es más predominante en Canadá, y MOH 718 de *C. difficile*, una variante de la toxina no común que posee genes que codifican la toxina B pero no las toxinas A ni CDT.

60 [0128] *C. difficile* es una bacteria formadora de esporas que resiste a la fagocitosis de los polisacáridos de la superficie celular. En vista al desarrollo de la vacuna, puede demostrar ser beneficioso dirigir esta cadena de hidratos de carbono en la superficie celular. Por lo tanto, en un intento de desarrollar una vacuna glicoconjugada, se describe en la presente el aislamiento y la caracterización de polisacáridos de superficie celular de *C. difficile* para su posterior uso en, por ejemplo, la preparación de vacuna a base de carbohidratos escrita en la presente.

65 **Materiales y métodos:**

[0129] Cultivo bacteriano y aislamiento de polisacáridos: Se utilizó para el estudio un ribotipo 027 aislado que se obtuvo de una persona con una enfermedad asociada a *C. difficile*. En todos los casos, las células se cultivaron en caldo de CDMN (*Clostridium difficile Moxalactam Norfloxacin*) a 37 °C durante 24 h en cámara anaeróbica, luego se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, se separaron por centrifugación y se liofilizaron. Los polisacáridos de superficie celular se aislaron de la superficie celular bacteriana mediante un tratamiento con ácido acético al 2 % para escindir selectivamente polisacáridos del peptidoglicano. Los polisacáridos PS – I y PS – II se obtuvieron de la capa acuosa y el polisacárido PS – III se obtuvo a partir del material de pellet. También se realizaron etapas de purificación posteriores mediante cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio aniónico.

[0130] Procedimientos analíticos: La determinación de componentes de azúcar en forma de acetatos de alditol se llevó a cabo usando GLC – MS (Sawardeker, JS; Sloneker, JH; Jeanes, A. Anal Chem 1965, 37 (12), 1602 – 1604). Las muestras se hidrolizaron con ácido trifluoroacético y, a continuación, se redujo el hidrolizado con borodeuterido sódico y se acetiló con anhídrido acético. Los derivados de los monosacáridos acetilados se analizaron entonces mediante GLC – MS. El análisis de ligamiento se llevó a cabo mediante el procedimiento de yoduro de NaOH – DMSO - metilo (Hakomori, S.; J. Biochem (Tokio) 1964, 55, 205 - 208;. Lindberg, B. ; Methods Enzymol. 1972, 28, 178 - 195.) y se analizaron mediante GLC – MS como anteriormente. La defosforilación de los polisacáridos se logró a través del tratamiento de la IC al 48 % (Kenne, L.; Lindberg, S.; Rahman, M.; Mosihuzzaman, M. Carb Res. 1993, 247, 181 – 189).

[0131] Espectrometría de masas: Se realizó una espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI – TOF - MS) usando ácido sinapínico como matriz.

[0132] Espectroscopía de NMR: Las muestras se intercambiaron con óxido de deuterio, se liofilizaron, y se disolvieron en 600 µL de D₂O. Los espectros se registraron a 298 K usando secuencias de pulso estándar para experimentos 2D.

[0133] Inmunogenicidad de las inoculaciones de CSP de *Clostridium difficile* en cerdos: Se utilizaron diez cerdas de un negocio porcino local. Todas las cerdas incluidas en el estudio estaban sanas, sin signos de enfermedad sistémica, sin antecedentes de reacciones adversas a las vacunas anteriores u otras inyecciones intramusculares, y sin antecedentes de diarrea en los 30 días anteriores. Las cerdas se dividieron aleatoriamente en 2 grupos (n = 5, cada uno). Las cerdas fueron inscritas cuando estaban a unos 30 días de la fecha de parto prevista. Se administró por vía intramuscular una mezcla de polisacáridos de superficie celular PS – I y PS – II (400 ug / inoculación) de *C. difficile*, disueltos en solución salina sin adyuvante, a todas las cerdas del Grupo 1. Las cerdas del grupo 2 se les inyectó una solución salina solamente, como controles. Se inoculó a todas las cerdas una vez en el día 1 (primera inoculación) y de nuevo en el día 8 (segunda inoculación). Se registró el sitio de la inoculación. En el día 1, se recogió la sangre entera (10 ml) del seno infraorbital. Se controlaron las cerdas una vez por hora durante las primeras 4 horas, a continuación, dos veces al día y se registraron el aspecto general, la actitud, el apetito, la orina, la defecación, la temperatura, el pulso y la frecuencia respiratoria. Se evaluó el sitio de la inyección en busca de signos de inflamación (hinchazón, dolor a la palpación). La recogida de sangre se repitió los días 8 y 15. Los sueros de los días 1, 8 y 15 se analizaron mediante un análisis *dot – blot* para la inmunoglobulina M (IgM) específica de PS – I y PS – II. Se utilizó una preparación de células enteras de *Campylobacter coli* como control positivo en el ensayo de *dot – blot* y se utilizó BSA como control negativo. El análisis *dot – blot* se realizó en una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con IgM conjugada con HRP en dilución de 1: 5000 para PS – II y en dilución de 1: 100 para la mezcla de PS – I / PS – II.

Resultados:

[0134] La preparación acuosa de polisacáridos aislados del ribotipo 027 de *C. difficile* se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño. El perfil de elución mostró que las fracciones de elución anteriores eran claramente diferentes de las que se eluyeron en un momento posterior. Un análisis de composición de monosacáridos realizado en una de las fracciones anteriores (PS – I) reveló la presencia de residuos de ramnosa y glucosa, mientras que el mismo análisis realizado en fracciones posteriores (PS – II) mostraron principalmente residuos de manosa y N – acetil – galactosamina. Se descubrió que la preparación acuosa de polisacáridos aislados de *C. difficile* MOH 900 y MOH 718 sólo contienen polisacáridos PS – II.

[0135] Los principales tipos de enlaces determinados presentes en PS – I eran Rha terminales [Rha – (1 →), 2 – monosustituido Glc [→ 2) – Glc - (1 →), y 3 – monosustituido Glc [→ 3) – Glc - (1 →), y 3, 4 - disustituido Glc [→ 3,4) – Glc - (1 →)]. También se observó la presencia de Rha 4 - monosustituido [→ 4) – Rha - (1→)]. El análisis de los glucósidos quirales 2 - S) - y 2 - (R) - butilo reveló que Glc poseía la configuración D y Rha la configuración L enantiomérica.

[0136] Los análisis de la composición de monosacáridos efectuados en PS - II mostraron la presencia de Glc, manosa (Man) y N-acetil-galactosamina (GalNAc), pero también también se detectaron pequeñas cantidades de Rha en PS - II. Se ha observado que todas las unidades tienen la configuración enantiomérica D. El análisis del tipo de enlace del azúcar realizado en PS - II mostró numerosas unidades monosacáridas variablemente unidas. Se

determinó que los principales tipos de enlaces estaban presentes en Glc terminal de PS - II, Glc 4 - monosustituido, Man 3 - monosustituidos, GalNAc 3 - sustituido y GalNAc 3, 4 - disustituido como unidades principales. Coeluyendo con el residuo Glc 4 - monosustituido, también se detectaron cantidades de trazas de iones m/z característicos de Glc 6 - monosustituido (189 m/z) en PS - II. Además, las pequeñas cantidades de los tipos de enlaces observadas en PS - I también se detectaron en el análisis del tipo de enlace de PS - II. FIG. La figura 1 muestra los tipos de enlace azúcar del polisacárido PS - II que se obtuvieron de MOH 900 de *C. difficile*.

[0137] La purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico de la preparación acuosa del ribotipo 027 de *C. difficile* también dio lugar a dos polisacáridos distintos (PS - I y PS - II). El espectro ^1H - NMR de PS - I y PS - II (Figs. 2A y 2B) mostró cinco señales anoméricas para PS - I (designadas de A a E) y seis señales para PS - II (designadas de A a F). El polisacárido PS - II aislado de las células MOH 900 y MOH 718 de *C. difficile* dio un espectro idéntico ^1H - NMR al PS - II del ribotipo 027.

[0138] Se utilizaron otros experimentos de NRM bidimensional, tanto homonuclear (^1H) como heteronuclear (^1H , ^{13}C y ^{31}P), para establecer la secuencia de PS - I (Figura 3) y PS - II. Los experimentos 2D ^1H - ^1H COSY, TOCSY y ^1H - ^{13}C HSQC permitieron asignar la mayoría de los protones del anillo y carbonos de cada unidad presente en PS - I y PS - II. La determinación de la secuencia de los residuos de los monosacáridos fue posible por experimentos HMBC ^1H - ^{13}C y NOESY ^1H - ^1H (Figura 3), que permitieron asignar los enlaces glicosilo en PS - I. El NOESY ^1H - ^1H 2D (Figura 3) llevado a cabo en PS - I reveló conectividades inter - NOE (mostradas esquemáticamente a continuación en la Figura 3) entre H - 1 (δH 5,23) del αRha terminal (B) y H - 3 (δH 4,01) de la αGlc ramificada sustituida en 3, 4 (D) para $[\alpha - \text{Rha} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - \text{Glc} - (1 \rightarrow)]$, entre H - 1 (δH 5,17) de la αRha sustituida en 4 (C) y H - 3 (δH 3,62) de la βGlc sustituida en 3 (e) para $[\rightarrow 4) - \alpha\text{Rha} - (1 \rightarrow 3) - \beta\text{Glc} - (1 \rightarrow)]$, entre H - 1 (δH 5,13) de la αGlc ramificada sustituida en 3, 4 (D) y H - 2 (δH 3,68) de la βGlc sustituida en 2 (a) para $[\rightarrow 3/4) - \alpha\text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \alpha\text{Glc} - (1 \rightarrow)]$, y entre H - 1 (δH 4,53) de la αGlc sustituida en - (e) y H - 4 (δH 3,86) de la αGlc ramificada sustituida en 3, 4 (D) para $[\rightarrow 3) - \beta\text{Glc} - (1 \rightarrow 4) - \alpha\text{Glc} - (1 \rightarrow)]$. También se detectaron otras interacciones a través del espacio, muchas de ellas surgidas de las conectividades inter - NOE mediante el experimento NOESY ^1H - ^1H 2D, pero la interacción inter - NOE entre los protones anoméricos de la αGlc ramificada sustituida en 3, 4 (D; δH 5,13) y de la αGlc sustituida en 2 (A; δH 5,75) reveló la proximidad de estos dos protones en el enlace glicosídico $(1 \rightarrow 2)$ entre estas dos unidades $\alpha\text{Glc} [\rightarrow 3/4) - \alpha\text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \alpha\text{Glc} - (1 \rightarrow)]$. Las correlaciones detectadas en PS - I fueron:

H - 1 (D) / C - 2 (A) para $[\alpha - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \alpha - \text{Glc}]$

H - 1 (E) / C - 4 (D) para $[\beta - \text{Glc} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - \text{Glc}]$

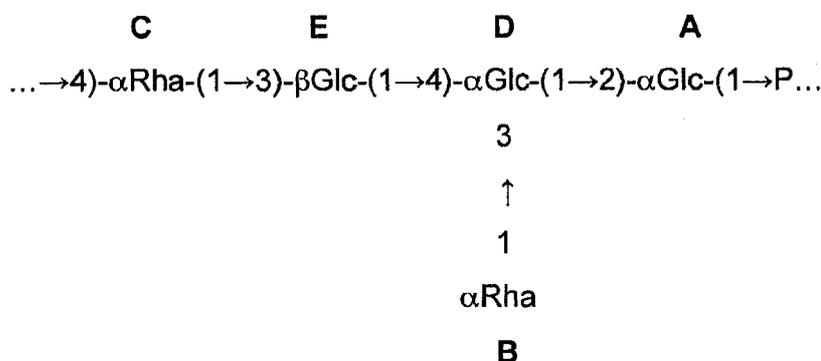
H - 1 (C) / C - 3 (E) para $[\alpha - \text{Rha} - (1 \rightarrow 3) - \beta - \text{Glc}]$

H - 1 (B) / C - 3 (D) para $[\alpha - \text{Rha} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - \text{Glc}]$

[0139] Un experimento HMBC ^1H - ^{31}P (Figura 4) proporcionó correlaciones ^1H - ^{31}P entre la señal ^{31}P a - 0,78 ppm y H - 1 de A ($\alpha - \text{Glc}$ sustituida en 2 de PS - I) y H - 4 de C ($\alpha - \text{Rha}$ sustituida en 4) de PS - I para una secuencia de:

... $\rightarrow 2) - \alpha - \text{Glc} - (1 \rightarrow \text{P} \rightarrow 4) - \alpha - \text{Rha} - (1 \rightarrow$...

[0140] Los resultados obtenidos del análisis de GC - MS y los experimentos de espectroscopia de NMR revelaron que el PS - I del ribotipo 027 de *C. difficile* se compone de bloques de repetición de pentaglicosil fosfato:



[0141] Los experimentos de ^{31}P - NMR realizados en PS - II revelaron que también llevaba un componente de fosfato monoéster (sin cambio en el desplazamiento químico a un pH más alto). El espectro 1D ^{31}P - NMR de PS - II mostró una resonancia a δP - 1,67 ppm. La NMR ^1H de PS - II (Figura 2B) produjo seis resonancias anoméricas, que también fue consistente con el número de tipos de enlaces presentes en PS - I. Al igual que con PS - I, fue posible la

secuencia de los residuos monosacáridos mediante experimentos de NMR 2D que revelaron las siguientes secuencias:

5 H - 1 (C) / C - 3 (A) para $[\beta - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - \text{Man}]$

H - 1 (B) / C - 4 (C) para $[\alpha - \text{Glc} - (1 \rightarrow 4) - \beta - \text{GalNAc}]$

H - 1 (D) / C - 4 (B) para $[\beta - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - \text{Glc}]$

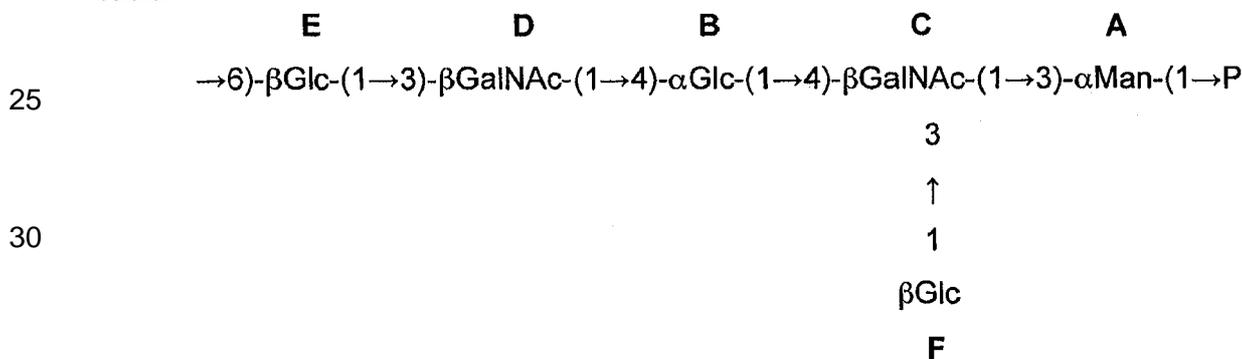
10 H - 1 (E) / C - 3 (D) para $[\beta - \text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - \beta - \text{GalNAc}]$

H - 1 (F) / C - 3 (C) para $[\beta - \text{Glc} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - \text{GalNAc}]$

15 **[0142]** El experimento $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HMBC (Figura 4) mostró que la señal ^{31}P a -1,67 ppm mostró correlaciones a H - 1 de A ($\alpha - \text{Man}$ sustituida en 3) de PS - II y H - 6 y 6' de E ($\beta - \text{Glc}$ sustituida en 6) de PS - II para una secuencia de:

... 3) - $\alpha - \text{Man} - (1 \rightarrow \text{P} \rightarrow 6) - \beta - \text{Glc} - (1 \rightarrow \dots$

20 **[0143]** En conjunto, los resultados obtenidos del análisis de GC - MS y de los experimentos de espectroscopía de NMR revelaron que el PS - II del ribotipo 027 de *C. difficile* se compone de un bloque de repetición de hexaglicosilo fosfato:



35 **[0144]** Se utilizó un espectrometría de masas con desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI - MS) para identificar el peso molecular de los polisacáridos. Los fragmentos m / z obtenidos de una muestra de polisacárido desfosforilado identificaron que el peso molecular de la unidad de oligosacárido de PS - II era de 1054 Da (Figura 5). Esto es consistente con los datos obtenidos de los experimentos de NMR y GC - MS. Los datos de MALDI - MS (Figura 5) también señalaron el hecho de que, en algunos casos, el bloque de repetición de oligosacárido de PS - II puede contener una unidad de hexosa adicional.

40 **[0145]** El análisis de PS - II de MOH 900 y MOH 718 de *C. difficile* muestran que son estructuralmente idénticos al PS - II del ribotipo 027 de *C. difficile*.

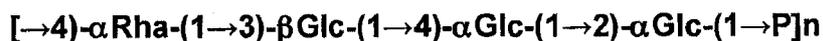
45 **[0146]** Mediante el análisis químico, de GC - MS y de NMR del polisacárido PS - III que se obtuvo a partir del material de pellet, se observó que se compone (Figura 7) de glicerol, glucosa, N - acetil - glucosamina y alditol fosfato.

50 **[0147]** El análisis serológico *dot - blot* reveló que los 5 cerdos inoculados generaron anticuerpos de IgM específicos para PS - II solo de *C. difficile*, y también para la mezcla de PS - I / PS - II (Figura 8). Los datos mostraron que la IgM específica para PS - I y PS - I / PS - II aumentó con una inoculación repetida, y en los días 8 y 15 se observó una fuerte inmunogenicidad, especialmente para PS - II. No se observaron reacciones adversas, confirmando la seguridad de la inoculación con estos polisacáridos de superficie celular PS - I / PS - II de *C. difficile*.

55 **Discusión y conclusión:**

60 **[0148]** Las manipulaciones químicas junto a experimentos analíticos, de MS y de NMR establecieron la estructura química covalente de PS - I y PS - II y la composición de PS - III. Se descubrió que PS - I (Fig. 6A) consiste en una unidad de repetición de pentaglicosil fosfato ramificado compuesto de glicosil fosfato (P), ramnosa (Rha) y glucosa (Glc):

65



3

↑



5

10 **[0149]** Se observó que la estructura química de PS - II (figura 6B) se compone de una unidad de repetición de hexaglicosil fosfato ramificada compuesta de glucosa, manosa (Man) y N - acetil - galactosamina (GalNAc) y un glicosil fosfato:



15

3

↑



20 **[0150]** Estos resultados revelaron que el polisacárido PS - II de *C. difficile* fue expresado por todas las cepas de *C. difficile* aquí investigadas.

25 **[0151]** Los resultados estructurales presentados aquí representan el primer informe que describe las estructuras químicas covalentes de polisacáridos de superficie celular de *C. difficile* y pueden ser la base para una preparación de vacuna.

30 **[0152]** Estos nuevos resultados representan el primer informe que describe la composición química detallada de los polisacáridos de *C. difficile*. Aquí, se ha mostrado que el ribotipo 027 de *C. difficile* expresa, al menos, dos polisacáridos estructuralmente variables de superficie celular (PS - I y PS - II), cada uno compuesto de una variedad de monosacáridos con varios tipos de enlaces. Se ha encontrado que MOH 900 y MOH 718 de *C. difficile* expresan sólo un tipo de polisacárido que se ha demostrado que es estructuralmente similar al PS - II del ribotipo 027.

35 **[0153]** Se ha mostrado que los polisacáridos de superficie celular PS - I y PS - II de *C. difficile* son inmunogénicos (IgM) en cerdos (Fig. 8). PS - II era altamente inmunogénico y la mezcla de PS - I / PS - II también era inmunogénica pero en un grado menor.

40 **[0154]** Los polisacáridos de superficie celular purificados de *Clostridium difficile* se utilizan como vacunas y / o las cadenas glicosilo se acoplan a una molécula portadora para formar una vacuna glicoconjugada inmunológicamente activa. La vacuna sintetizada se utilizará entonces para estudios inmunológicos que implican modelos animales.

IV. EJEMPLO(S) PROFÉTICO(S) DE PREPARACIÓN DE CONJUGADOS

45 **[0155]** Los polisacáridos de superficie celular de *C. difficile*, incluyendo PS - I, II y III descritos en la presente se pueden acoplar a una proteína portadora estable, tal como por ejemplo CRM₁₉₇ y / o a un toxoide tetánico, usando técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica para producir una vacuna glicoconjugada para tratar o prevenir las infecciones por *C. difficile*, o para inducir una respuesta inmune contra *C. difficile*.

50 **[0156]** Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a lo que se considera actualmente que son los ejemplos preferidos, ha de entenderse que la invención no se limita a los ejemplos descritos.

55

60

65

- a) Tratar la infección por *Clostridium difficile* en un sujeto; o
- b) Tratar la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un sujeto.

5 14. El polisacárido de superficie celular o composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 12 ó 13, en en la que el sujeto es un cerdo, caballo, reses o un ser humano.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

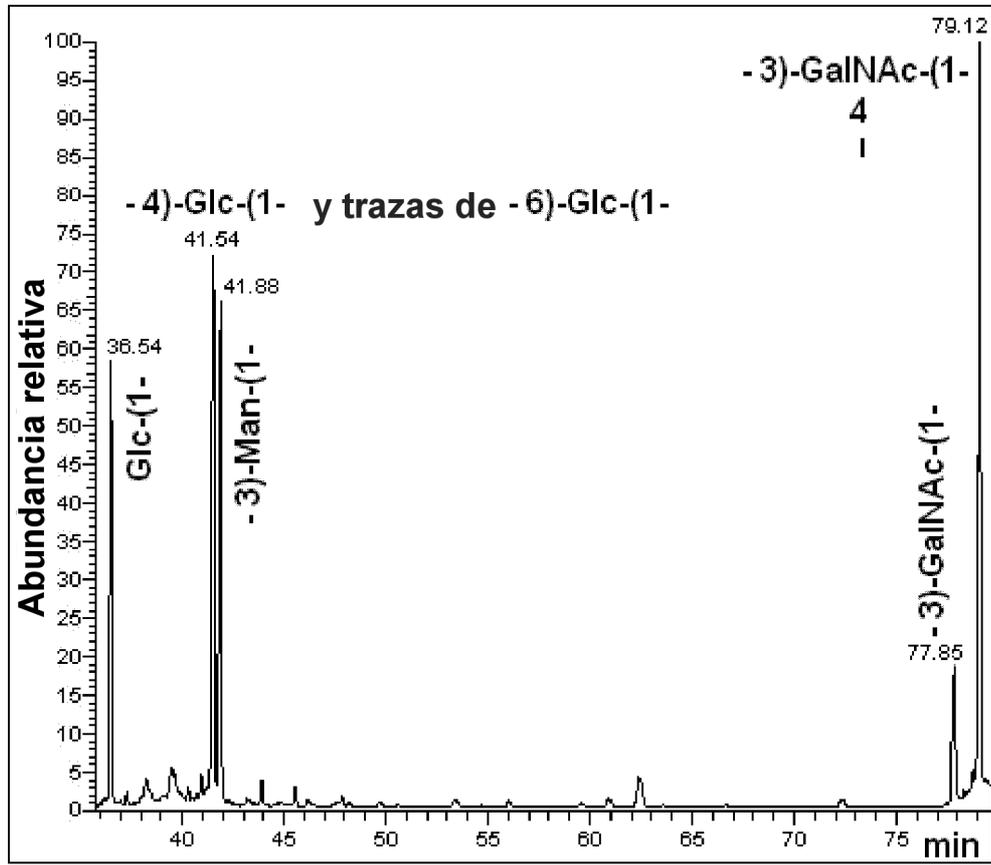
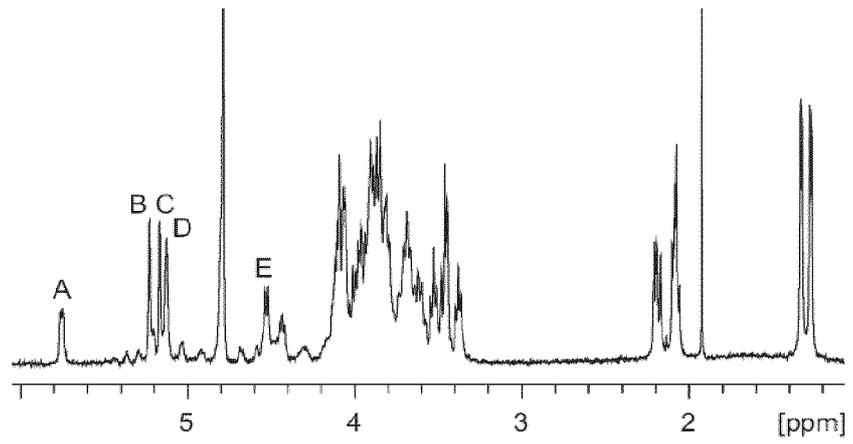


Figura 2

A)



B)

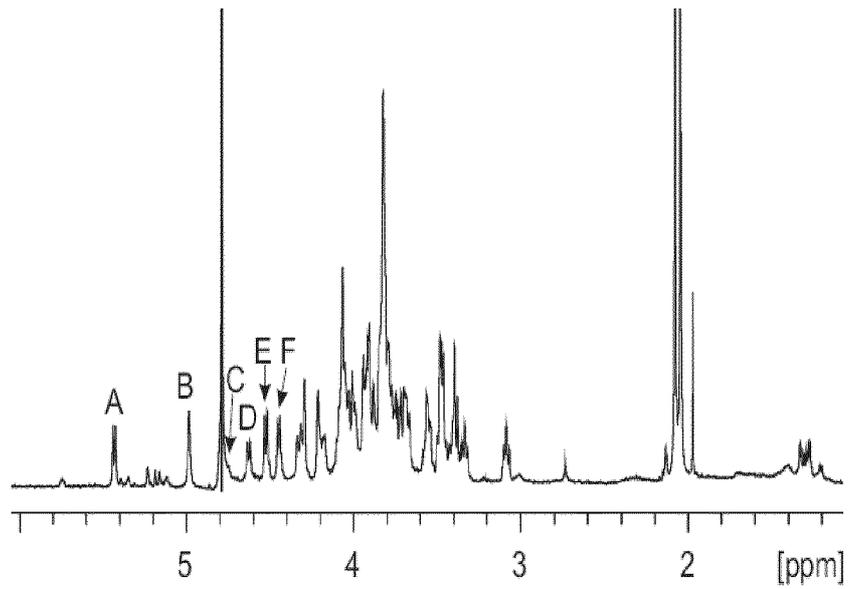
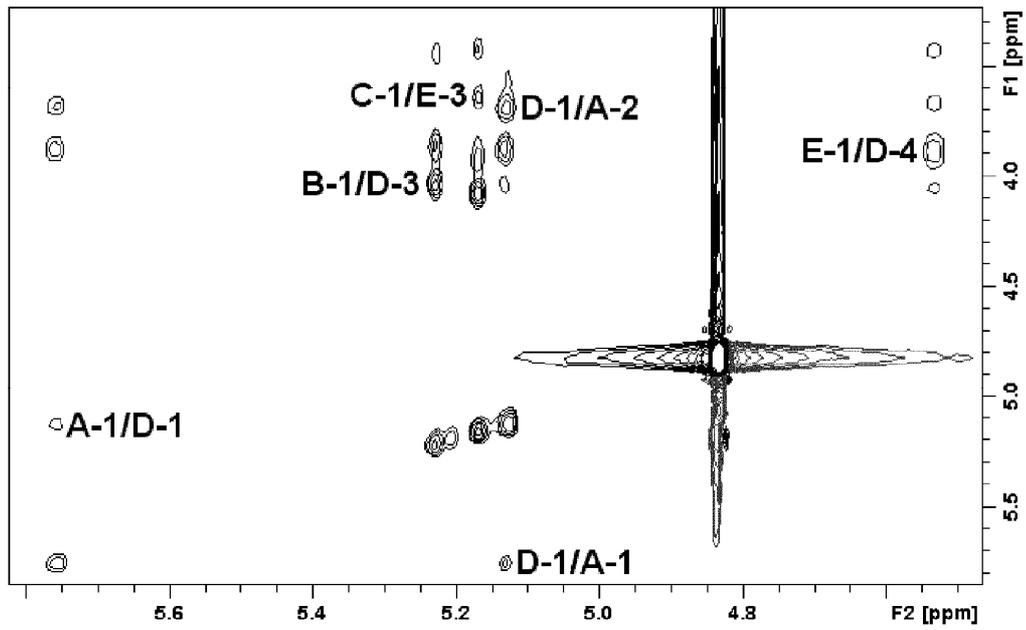


Figura 3

A)



B)

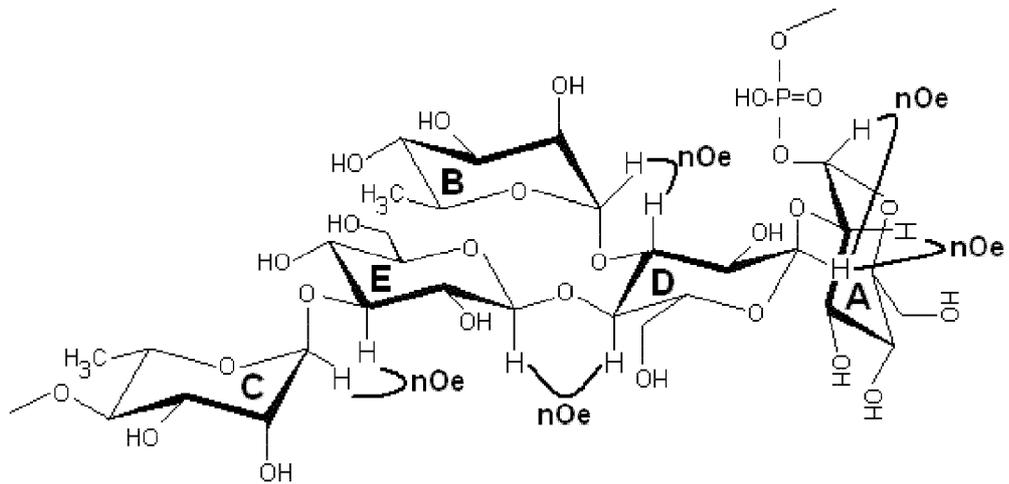
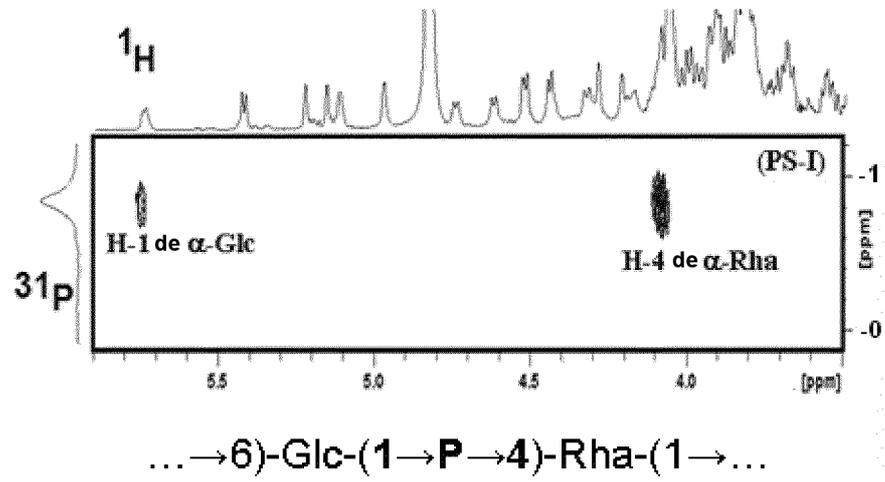


Figura 4

A)



B)

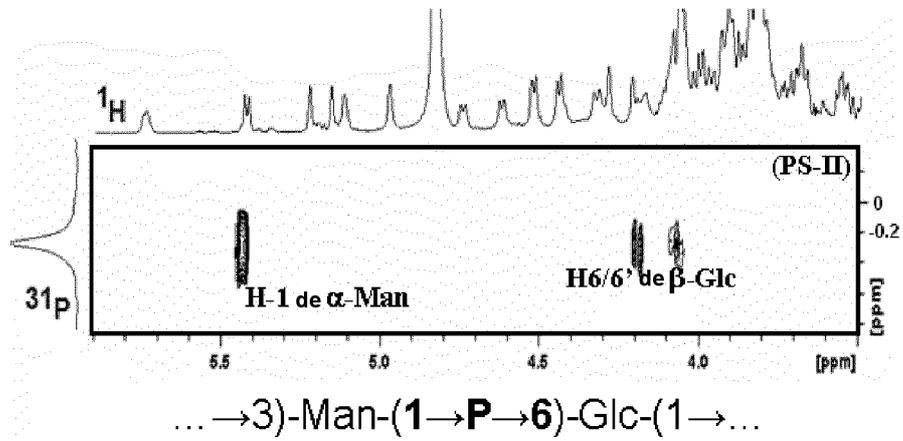


Figura 5

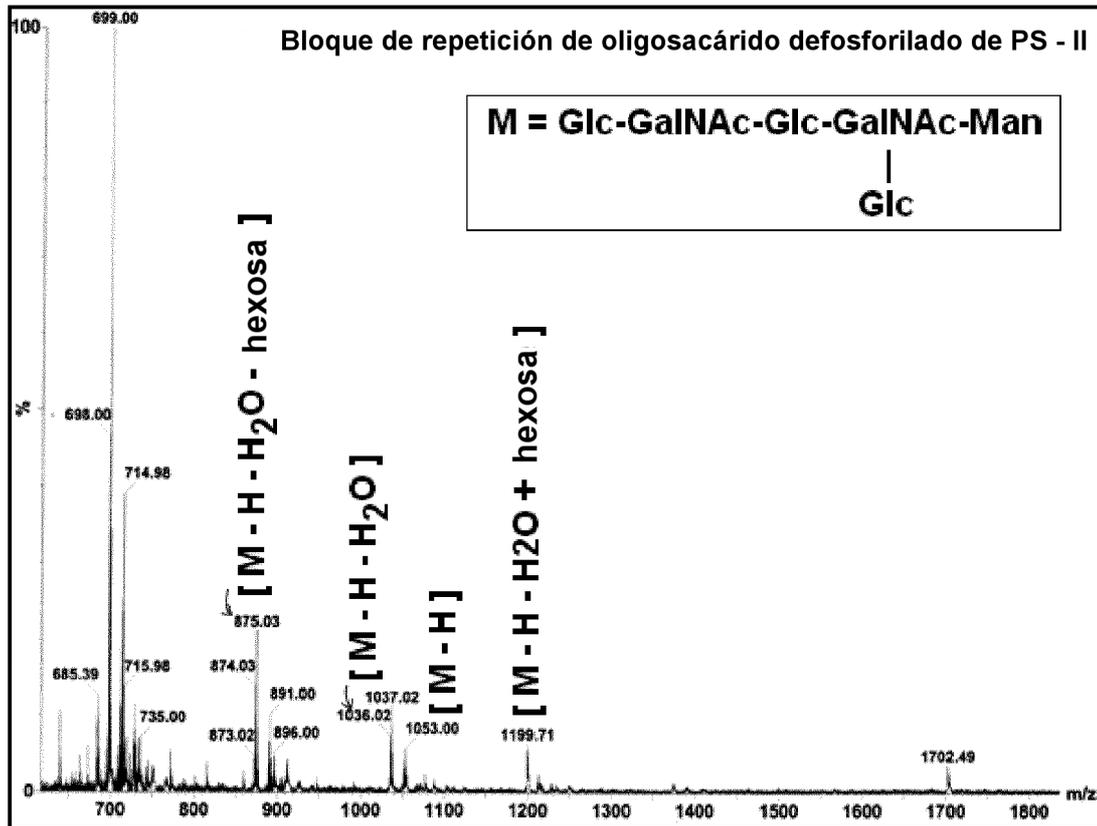


Figura 6

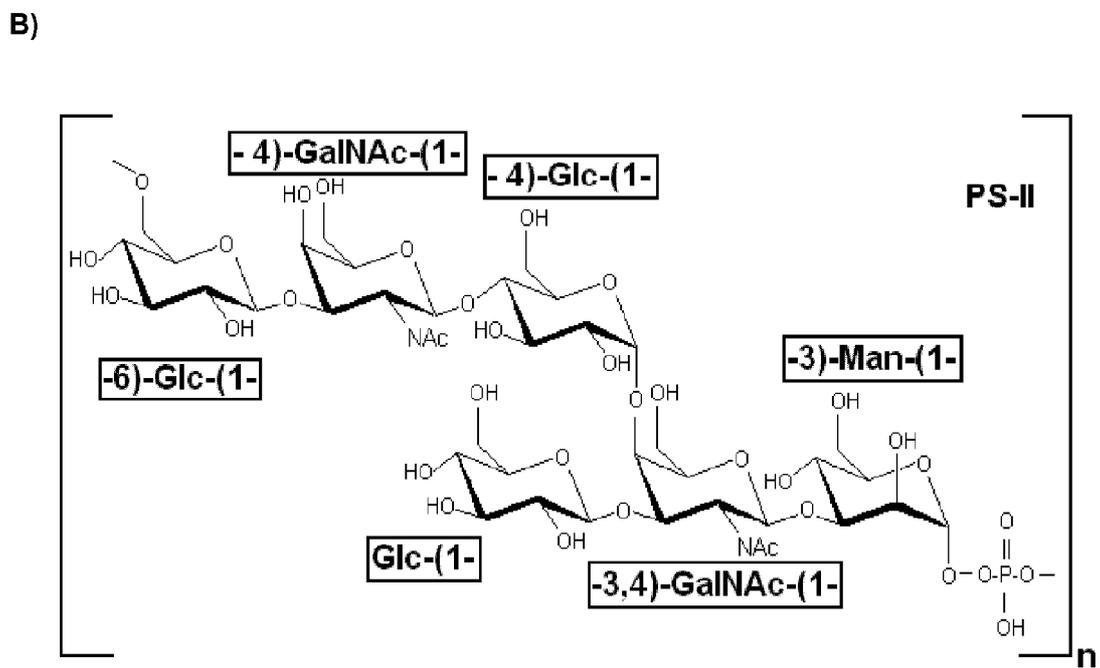
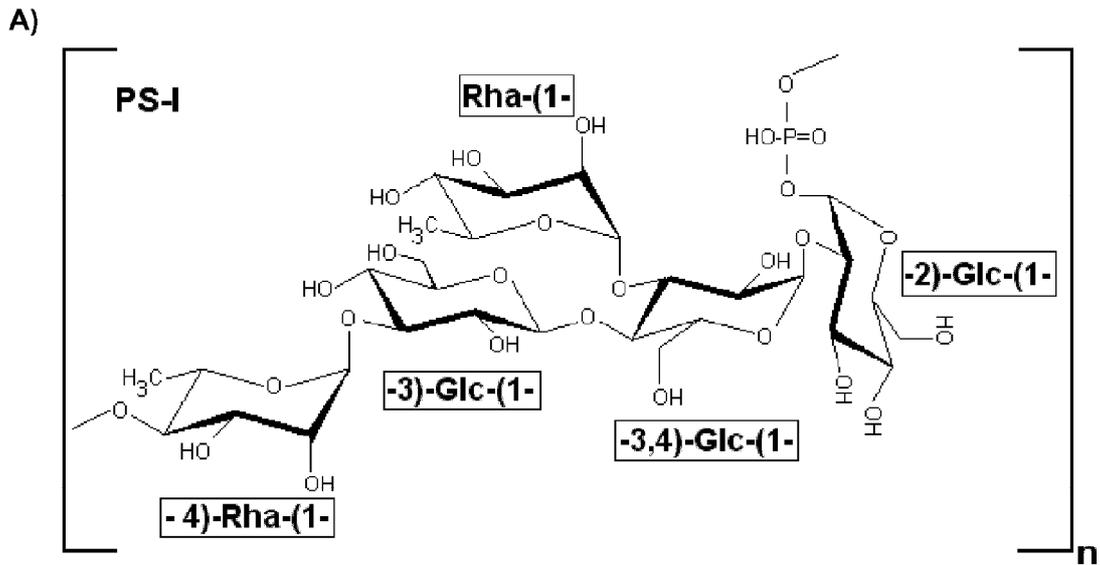


Figura 7

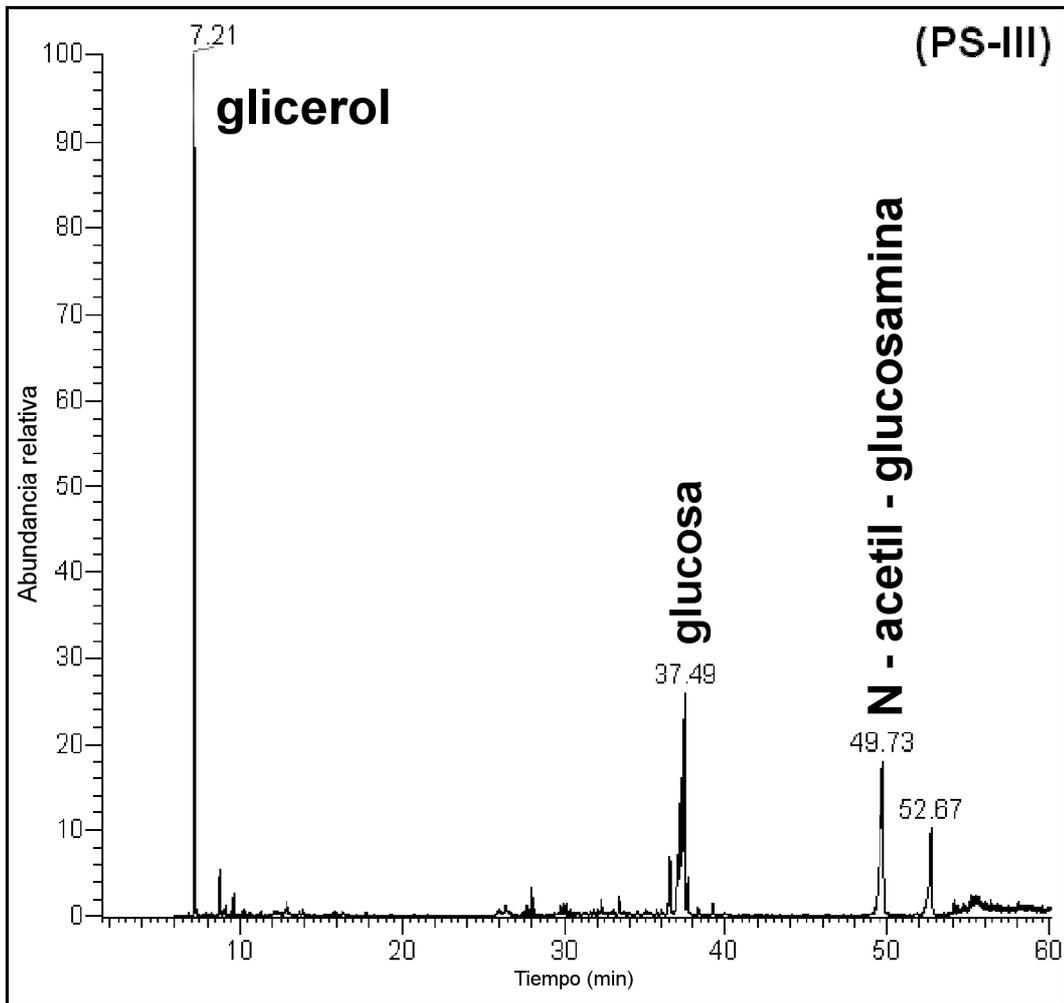


Figura 8

