

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 485**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/08** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2008 PCT/US2008/010767**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2009 WO09035707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2008 E 08830210 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2198007**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen toxoides A y B de Clostridium difficile**

30 Prioridad:

**14.09.2007 US 972496 P**

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

**05.03.2018**

73 Titular/es:

**SANOFI PASTEUR BIOLOGICS, LLC (100.0%)  
38 Sidney Street  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**MIDDAUGH, C., RUSSELL;  
FAHRNER, RICHARD y  
CIARAMETARO, PETER**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 657 485 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que contienen toxoides A y B de *Clostridium difficile*

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a composiciones que incluyen toxoides de *Clostridium difficile* y métodos correspondientes.

10 **Antecedentes de la invención**

Las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (*C. difficile*) son las responsables de la enfermedad asociada con *C. difficile* (CDAD), la cual se manifiesta a sí misma como diarrea nosocomial y colitis pseudomembranosa (Kuijper y colaboradores, *Clinical Microbiology and Infection* 12 (Suppl. 6):2-18, 2006; Drudy y colaboradores, *International Journal of Infectious Diseases* 11(1):5-10, 2007; Warny y colaboradores, *Lancet* 366(9491): 1079-1084, 2005; Dove y colaboradores, *Infection and Immunity* 58(2):480-488, 1990; Barroso y colaboradores, *Nucleic Acids Research* 18(13):4004, 1990). El tratamiento de las toxinas con formaldehído resulta en los toxoides A y B correspondientes, los cuales están completamente desactivados y retienen inmunogenicidad por lo menos parcial (Torres y colaboradores, *Infection and Immunity* 63(12):4619-4627, 1995). Se ha mostrado que la vacunación que emplea ambos toxoides es efectiva en hámsteres, adultos saludables, y pacientes con CDAD recurrente (Torres y colaboradores, *Infection and Immunity* 63(12):4619-4627, 1995; Kotloff y colaboradores, *Infection and Immunity* 69(2):988-995, 2001; Sougioultzis y colaboradores, *Gastroenterology* 128(3):764-770, 2005; Torres y colaboradores, *Vaccine Research* 5(3):149-162, 1996). Adicionalmente, la administración de toxoides tanto libres como ligados a sal de aluminio (adyuvante) lleva a respuestas inmunológicas apropiadas (Torres y colaboradores, *Vaccine Research* 5(3): 149-162, 1996; Giannasca y colaboradores, *Infection and Immunity* 67(2):527-538, 1999). La administración de ambos toxoides simultáneamente es más efectiva que la administración de proteínas individuales solas (Kim y colaboradores, *Infection and Immunity* 55(12):2984-2992, 1987). Ambos de los toxoides A y B son por lo tanto candidatos para el desarrollo de vacunas. La mejora de su integridad de conformación y/o reducción en su tendencia para aglomerarse es deseable para producir estabilidad en almacenamiento óptima.

30 El documento US 6214341 describe la inmunización pasiva frente a una enfermedad provocada por *Clostridium difficile*.

35 **Compendio de la invención**

La invención proporciona composiciones, tales como composiciones farmacéuticas (p. ej., composiciones de vacuna), incluyendo un toxoide de *Clostridium difficile* (p. ej., un toxoide de toxinas A y/o B de *C. difficile*; con toxoides A y B estando presentes en una relación de, por ejemplo, 5:1 a 1:5, p. ej., 3:2 (A:B)) y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden (a) un regulador seleccionado de un regulador de citrato de sodio o potasio y un regulador de fosfato de sodio o potasio; y (b) sacarosa, que reducen o retrasan la aglomeración del toxoide, y/o incrementan la estabilidad térmica del toxoide, con relación a una composición que carece de los excipientes farmacéuticamente aceptables. En un ejemplo, los excipientes farmacéuticamente aceptables reducen o retrasan la aglomeración del toxoide un 50% o más, con relación a una composición que carece de los excipientes farmacéuticamente aceptables. En otro ejemplo, los excipientes farmacéuticamente aceptables incrementan la estabilidad térmica del toxoide 0.5°C o más, con relación a una composición que carece de los excipientes farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante (p. ej., un compuesto de aluminio, tal como un compuesto de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, o hidroxifosfato de aluminio). Las composiciones pueden estar en forma líquida, forma de polvo seco, secadas por congelación, secadas por rocío, o secadas por espuma.

50 Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser, por ejemplo, seleccionados a partir del grupo que consiste en reguladores, agentes de tonicidad, carbohidratos simples, azúcares, polímeros de carbohidratos, aminoácidos, oligopéptidos, poliaminoácidos, alcoholes polihídricos y éteres de los mismos, detergentes, lípidos, tensioactivos, antioxidantes, sales, albúmina de suero humana, gelatinas, formaldehído, o combinaciones de los mismos. Se describe que (i) el regulador se selecciona a partir del grupo que consiste en citrato, fosfato, glicina, histidina, carbonato, y bicarbonato, y está en una concentración de 5-100 mM; (ii) el agente de tonicidad es manitol, en una concentración de 1-50 mM; (iii) el azúcar se selecciona a partir de sorbitol, trehalosa, y sacarosa, a una concentración de 1-30%; (iv) el aminoácido, oligopéptido, o poliaminoácido está presente en una concentración de hasta 100 mM; (v) el alcohol polihídrico se selecciona a partir del grupo que consiste en glicerol, polietilenglicol, y ésteres de los mismos de peso molecular de 200-10 000, a una concentración de hasta 20%; (vi) los detergentes y lípidos se seleccionan a partir del grupo que consiste en desoxicolato de sodio, Tween 20, Tween 80, y plurónicos, a concentraciones de hasta 0.5%; (vii) los polímeros de carbohidratos se seleccionan a partir de dextrano y celulosa; (viii) las sales se seleccionan a partir del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, y acetato de magnesio, hasta 150 mM; y (ix) el formaldehído está presente en 0.001-0.02%.

Se describen excipientes que incluyen aquellos listados en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 8, o Tabla 9. En otros ejemplos, las composiciones incluyen citrato de sodio o potasio, y/o fosfato de sodio o potasio, opcionalmente en combinación con sacarosa y/o formaldehído. Por lo tanto, en varios ejemplos, las composiciones incluyen toxoides A y B de *Clostridium difficile*, citrato (o fosfato) de sodio o potasio 5-100 mM (p. ej., 10-30 mM, o 20 mM), sacarosa al 2-20% (p. ej., 2-10% o 5%), y formaldehído a  $\leq 0.020\%$  (p. ej., 0.016%), pH 5.5-8.5 (p. ej., 6.5-8.0, o 7.5). También se describe una combinación de sorbitol, dextrosa, y/o Tween 80.

La invención también proporciona métodos para hacer composiciones que incluyen un toxoide de *Clostridium difficile* y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden (a) un regulador seleccionado de un regulador de citrato de sodio o potasio y un regulador de fosfato de sodio o potasio; y (b) sacarosa, los cuales reducen o retrasan la aglomeración del toxoide, y/o incrementan la estabilidad térmica del toxoide, con relación a una composición que carece de los excipientes farmacéuticamente aceptables. Estos métodos incluyen proporcionar un toxoide de *Clostridium difficile* y mezclar el toxoide de *Clostridium difficile* con los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como aquellos descritos en la presente. Las composiciones pueden almacenarse en forma líquida o liofilizarse, como se describe en la presente.

La invención también proporciona una composición de la invención para el uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad o infección provocada por *C. difficile* en un sujeto.

La invención también proporciona el uso de una combinación de  
 (a) un regulador seleccionado de un regulador de citrato de sodio o potasio y un regulador de fosfato de sodio o potasio; y  
 (b) sacarosa,  
 para incrementar la estabilidad térmica y/o reducir o retrasar la aglomeración de un toxoide de *Clostridium difficile* *in vitro*.

Se describen métodos para inducir una respuesta inmunológica a *C. difficile* en un sujeto, que implican administrar al sujeto una composición como se describe en la presente. En un ejemplo, el paciente no tiene, pero está en riesgo de desarrollar, enfermedad de *C. difficile*, y en otro ejemplo, el paciente tiene enfermedad de *C. difficile*. Se describe el uso de las composiciones de la invención para inducir una respuesta inmunológica a *C. difficile* en un sujeto, o en preparación de medicamentos para uso en este propósito.

La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, el uso de los excipientes descritos en la presente puede resultar en estabilidad física incrementada de los toxoides A y B de *C. difficile*, y/o aglomeración disminuida o retrasada, que son importantes para la producción de productos farmacéuticos (p. ej., vacunas) incluyendo los toxoides. Además, el uso de las relaciones de la invención (p. ej., 3:2, A:B) y añadir adyuvante justo antes de la administración (en lugar de en formulación de vacuna almacenada), puede llevar a inmunogenicidad incrementada.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos, y las reivindicaciones.

### **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Estudios de efectos de solutos sobre la estabilidad estructural del toxoide A (x) en presencia de trehalosa al 20% (□), sacarosa al 20% (■), sorbitol al 10% (○), dextrosa al 10% (●), glicerol al 20% (Δ), Tween 80 al 0.05% (▲), plurónico F68 al 0.1% (◇): (a) señal CD a 208 nm; (b) intensidad de emisión de ANS; (c) posición de pico de emisión de ANS; y (d) termograma de DSC. Las trazas térmicas representan un promedio de 2 mediciones, donde cada punto de datos tuvo un error estándar de menos de 0.5.

Figura 2. Estudios de efectos de solutos sobre la estabilidad estructural del toxoide B (x) en presencia de trehalosa al 20% (□), sacarosa al 20% (■), sorbitol al 10% (○), dextrosa al 10% (●), glicerol al 20% (Δ), Tween 80 al 0.05% (▲), plurónico F68 al 0.1% (◇): (a) señal CD a 208 nm; (b) intensidad de emisión de ANS; (c) posición de pico de emisión de ANS; y (d) termograma de DSC. Las trazas térmicas representan un promedio de 2 mediciones. Cada punto de datos tuvo un error estándar de menos de 0.5.

Figura 3. Estudios del efecto de combinaciones de solutos sobre la estabilidad térmica del toxoide A (x) en presencia de sorbitol al 10% y Tween 80 al 0.05% (□), dextrosa al 10% y Tween 80 al 0.05% (■), sorbitol al 10%, dextrosa al 10% y Tween 80 al 0.05% (○), dextrosa al 10% y sorbitol al 10% (●): (a) monitorizado por la señal CD a 208 nm y (b) OD 350 nm. Las trazas térmicas representan un promedio de 2 mediciones, en las cuales cada punto de datos tuvo un error estándar de menos de 0.05.

Figura 4. Estudios de combinaciones de solutos y sus efectos sobre la estabilidad térmica del toxoide B (x) en presencia de sorbitol al 10% y Tween 80 al 0.05% (□), dextrosa al 10% y Tween 80 al 0.05% (■), sorbitol al 10%, dextrosa al 10% y Tween 80 al 0.05% (○), dextrosa al 10% y sorbitol al 10% (●): (a) monitorizado por la señal CD a

208 nm y (b) OD 350 nm. Las trazas térmicas representan un promedio de 2 mediciones, en las cuales cada punto de datos tuvo un error estándar de menos de 0.05.

5 Figura 5. Estudios de propiedades de Tween 80 (□) en presencia de dextrosa al 10% (■), sorbitol al 10% (○), dextrosa al 10% y sorbitol al 10% (●) como una función de la temperatura: señal CD de 208 nm de Tween 80 al 0.05% (a) y Tween 80 al 0.1% (b); OD 350 nm para Tween 80 al 0.05% (c) y Tween 80 al 0.1% (d); MSD de diámetro hidrodinámico a base de número (cuadrado lleno) y a base de número lognormal (rombo lleno) para Tween 80 al 0.05% (e) y Tween 80 al 0.1% (f). Los tamaños de  $> 1 \mu\text{m}$  no son precisos dada la naturaleza de las mediciones de DLS. Las trazas térmicas representan un promedio de 2 mediciones, donde cada punto de datos

10 tiene un error estándar de menos de 0.5.

15 Figura 6. Estudios del efecto de la concentración de soluto en el punto medio de la transición térmica ( $T_m$ ) monitorizado con señal CD de 208 nm para el toxoide A (a) y el toxoide B (b) en presencia de sorbitol y Tween 80 al 0.05% (◆), dextrosa y Tween 80 al 0.05% (■), sorbitol, dextrosa, y Tween 80 al 0.05% (▲), sorbitol, dextrosa, y Tween 80 al 0.1% (×), sorbitol y dextrosa (◇).

20 Figura 7. El diámetro hidrodinámico como una función de temperatura para el toxoide A (a-c) y el toxoide B (d-f) donde los cuadrados llenos representan diámetro a base de número MSD y los romboides llenos representan el diámetro a base de número lognormal. Los tamaños de  $>1 \mu\text{m}$  no son precisos dada la naturaleza de las mediciones DLS. (a, d) proteína sola; (b, e) proteína en presencia de sorbitol al 10% y dextrosa al 10%; (c, f) proteína en presencia de sorbitol al 10%, dextrosa al 10% y Tween 80 al 0.05%. Las trazas térmicas representan un promedio de 2 mediciones, donde cada punto de datos tuvo un error estándar de menos de 0.5.

25 Figura 8. Estudios de ligadura de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio): (a) isoterma de adsorción y (b) isoterma de desorción en presencia de NaCl 2M para toxoide A (◇) y toxoide B (▲).

30 Figura 9. Estudio de estructura secundaria de toxoide A por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) sobre rango de pH de 5.5 a 7.5.

35 Figura 10. Estudio de estructura secundaria de toxoide B por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) sobre rango de pH de 5.5 a 7.5.

40 Figura 11. Estudio de temperatura de fusión de toxoide A por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) sobre rango de pH de 5.5-8.0.

45 Figura 12. Estudio de temperatura de fusión de toxoide B por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) sobre rango de pH de 5.0-7.5.

50 Figura 13. Estudio de aglomeración a diferentes valores de pH sobre el tiempo a una temperatura de almacenamiento fija.

Figura 14. Estudio de aglomeración dependiente de sal de toxoide A a 37°C sobre el tiempo.

55 Figura 15. Estudio de aglomeración dependiente de sal de toxoide B a 37°C sobre el tiempo.

Figura 16. Estudio de parámetros de liofilización de formulaciones de vacuna.

### **Descripción detallada**

50 La invención proporciona composiciones que incluyen toxoides de *Clostridium difficile* y excipientes farmacéuticamente aceptables que proporcionan propiedades benéficas a las composiciones. Por ejemplo, como se describe adicionalmente más adelante, los excipientes incluidos en las composiciones de la invención pueden resultar en estabilidad incrementada de uno o más de los componentes de toxoide de las composiciones y/o aglomeración disminuida o retrasada de los toxoides.

55 Los toxoides de *C. difficile* que pueden incluirse en las composiciones de la invención pueden hacerse usando cualquiera de un número de métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse métodos que involucran la desactivación de formaldehído (ver, p. ej., Kotloff y colaboradores, *Infection and Immunity* 69(2):988-995, 2001). De preferencia, las composiciones incluyen tanto el toxoide A como el toxoide B, pero también se incluyen en la invención composiciones que incluyen solamente uno de estos toxoides. Una cepa de *C. difficile* ejemplar que puede usarse como una fuente de toxinas es ATCC 43255 (VPI 10463). Los toxoides pueden estar presentes en las composiciones en relaciones variables, p. ej., 5:1 (A:B) a 1:5 (A:B). En ejemplos específicos, las relaciones pueden ser 2:1, 3:1, o 3:2 (A:B). La cantidad total de toxoide en las composiciones de la invención puede ser, p. ej., 100 ng-1 mg, 100 ng-500  $\mu\text{g}$ , 1-250  $\mu\text{g}$ , 10-100  $\mu\text{g}$ , 25-75  $\mu\text{g}$ , o 50  $\mu\text{g}$ . Las composiciones pueden almacenarse opcionalmente

en frascos en una dosis de una sola unidad.

Se describen composiciones que incluyen uno o más compuestos tales como, por ejemplo, reguladores (p. ej., citrato, fosfato, glicina, histidina, carbonato, o bicarbonato; 5-100 mM; ejemplos de sales de citrato que pueden usarse incluyen sodio, potasio, magnesio y zinc); agentes de tonicidad (p. ej., manitol; 1-50 mM); carbohidratos, tales como azúcares o alcoholes de azúcar (p. ej., sorbitol, trehalosa, o sacarosa; 1-30%) o polímeros de carbohidrato (p. ej., dextrano y celulosa); aminoácidos, oligopéptidos, o poliaminoácidos (hasta 100 mM); alcoholes polihídricos (p. ej., glicerol, polietileno glicoles, o éteres de los mismos, de peso molecular 200-10 000, y concentraciones hasta 20%); detergentes, lípidos, o tensioactivos (p. ej., Tween 20, Tween 80, o plurónicos, con concentraciones de hasta 0.5%); antioxidantes; sales (p. ej., cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, o acetato de magnesio, hasta 150 mM); albúmina (p. ej., albúmina de suero humana); gelatinas; formaldehído (0.001-0.02%); o combinaciones de los mismos.

Se describen excipientes que incluyen aquellos que se enlistan en las Tablas 1, 2, 8, y 9, siguientes. En varios ejemplos, los excipientes pueden ser aquellos que resultan en (i) estabilidad térmica incrementada (p. ej., de por lo menos 0.5°C, p. ej., 0.55°C, 1-4°C, o 2-3°C) según se mide por, p. ej., los ensayos descritos más adelante (p. ej., Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC)), y/o (ii) aglomeración disminuida o retrasada del toxoide A, toxoide B, o ambos toxoides A y B de, por ejemplo, 50% o más (p. ej., 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, 99% o más, o 100%), según se mide, por ejemplo, por ensayos descritos más adelante. Composiciones que incluyen aglomerados toxoides también se incluyen en la invención.

Los excipientes y reguladores ejemplares por tanto incluyen citrato de sodio (p. ej., 0.01-0.2 M, p. ej., 0.02-0.1 M) y sacarosa (p. ej., 1-20%, o 5-10%). Se describen excipientes y reguladores que incluyen sorbitol (p. ej., 4-20% o 5-10%), trehalosa (p. ej., 4-20% o 5-10%), Tween 80 (p. ej., 0.05-0.1%), dietanolamina (p. ej., 0.3 M), histidina (p. ej., 0.02-0.3 M), guanidina (p. ej., 0.3 M), dextrosa (p. ej., 5-20%), glicerol (p. ej., 20%), albúmina (p. ej., 1-2.5%), lactosa (p. ej., 10-20%), manitol (p. ej., 10%), sacarosa (p. ej., 5-20%), plurónico F-68 (p. ej., 0.1%), 2-OH-propil p-CD (p. ej., 5-10%), dextrano T40 (p. ej., 0.03-0.08 mg/ml), Brij (p. ej., 0.01-0.11), lisina (p. ej., 0.3 M), Tween 20 (p. ej., 0.01-0.05%), y ácido aspártico (p. ej., 0.15 M) (ver Tablas 1, 2, 8, y 9). Estos excipientes pueden usarse en las concentraciones listadas en las tablas. Alternativamente, las cantidades pueden variar, p. ej., 0.1-10 veces, como se entiende en la materia. Otros carbohidratos, alcoholes de azúcar, tensioactivos, y aminoácidos que se conocen en la materia también pueden incluirse en las composiciones de la invención.

Los excipientes y reguladores pueden usarse individualmente o en combinación. Como un ejemplo de una combinación, las composiciones pueden incluir citrato de sodio y sacarosa, que han mostrado que proporcionan beneficios con respecto a la estabilidad del toxoide. Las cantidades de estos componentes pueden ser, por ejemplo, citrato de sodio 10-30 mM, 15-25 mM, o 20 mM; y sacarosa al 1-20% o 5-10%. Además de estos componentes, tales composiciones pueden incluir una cantidad baja de formaldehído, tal como 0.001-0.020, 0.01-0.018, o formaldehído al 0.16%. El pH de tal composición puede ser, p. ej., 5.5-8.0 o 6.5-7.5, y la composición puede almacenarse a, p. ej., 2-8°C, en forma líquida o liofilizada. En variaciones de esta composición, el citrato de sodio puede reemplazarse con fosfato de sodio (10-30 mM, 15-25 mM, o 20 mM). Se describe que la sacarosa puede reemplazarse con sorbitol (p. ej., 4-20% o 5-10%), o trehalosa (p. ej., 4-20% o 5-10%). Otras variaciones de las composiciones se incluyen en la invención, e involucran el uso de otros componentes listados en la presente. Con base en lo anterior, una composición ejemplar de la invención incluye citrato de sodio 20 mM, sacarosa al 5%, y formaldehído al 0.016%, pH 7.5.

Se describen composiciones que incluyen sorbitol, dextrosa, y Tween 80, que son una combinación que se ha mostrado proporcionando beneficios con respecto a aglomeración y estabilidad (ver más adelante). Las cantidades de estos componentes pueden ser, por ejemplo, sorbitol al 5-15%, 8-12%, o 10%; dextrosa al 5-15%, 8-12%, o 10%; y Tween 80 al 0.01-1%, 0.025-0.5%, o 0.05-0.1%. Se describe una composición en la que estos componentes están presentes al 10% (sorbitol y dextrosa) y Tween 80 al 0.05-0.1%. También se describe que los excipientes son dextrosa (al 10%) y sorbitol (al 10%).

Las composiciones de la invención pueden almacenarse en forma líquida o seca, con la última incluyendo como ejemplos forma en polvo liofilizada, forma secada por congelación, forma secada por rocío, y forma secada por espuma. Por ende, además de uno o más excipientes, como se describe anteriormente, las composiciones de la invención pueden incluir un medio líquido (p. ej., solución salina o agua), que se puede regular con, p. ej., fosfato de sodio (p. ej., 5 mM) que contiene NaCl (p. ej., 150 mM). Un rango de pH ejemplar de las composiciones de la invención es 5-10, p. ej., 5-9, 5-8, 5.5-9, 6-7.5, o 6.5-7. Además, las composiciones pueden incluir uno o más agentes estabilizantes. En otros ejemplos, las composiciones están en forma liofilizada, y tales composiciones pueden reconstituirse con el uso de un medio líquido (p. ej., solución salina o agua) antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden opcionalmente incluir uno o más adyuvantes, además de los antígenos de toxoide y los excipientes descritos anteriormente. Los adyuvantes que pueden usarse en la invención incluyen compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, e hidroxifosfato de aluminio. El

antígeno puede precipitarse con, o adsorberse sobre, el compuesto de aluminio usando métodos estándar. Como un ejemplo específico, puede usarse alumbre (p. ej., Rehydragel LV®, Reheis, Inc., Berkeley Heights, Nueva Jersey; hasta, p. ej., 2 mg de AlOH/dosis, p. ej., alrededor de 1.5 mg de AlOH/dosis; Alhydrogel® (p. ej., Alhydrogel® 2%; (adyuvante de hidróxido de aluminio)), Brenntag Biosector, Frederickssund, Dinamarca (AlOH<sub>3</sub>)). La cantidad de aluminio usado puede ser, por ejemplo, 100-850 µg/dosis, 200-600 µg/dosis, o 300-600 µg/dosis.

Un enfoque de la formulación incluida en la invención implica formular los toxoides y excipientes juntos, y luego añadir un adyuvante, tal como un adyuvante de alumbre, justo antes de la administración. Este enfoque se ha descubierto que incrementa la inmunogenicidad, como se describe adicionalmente más adelante. En otro enfoque, el adyuvante se incluye en la formulación antes del almacenamiento (ya sea en forma líquida o liofilizada). Los adyuvantes adicionales que pueden usarse en las composiciones y métodos de la invención incluyen RIBI (Immuno-Chem, Hamilton, Manitoba, Canadá), QS21 (Aquila), Bay (Bayer), y Polifosfazeno (Virus Research Institute, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos; WO 95/2415).

La invención también incluye métodos para hacer las composiciones descritas en la presente, que involucran producción de toxoides como se describe, p. ej., por Kotloff y colaboradores, *Infection and Immunity* 69(2):988-995, 2001, y combinar los toxoides con uno o más excipientes como se describe en la presente usando métodos estándar de formulación farmacéutica. Como se describe anteriormente, las composiciones pueden almacenarse en forma líquida o liofilizada. La liofilización puede llevarse a cabo usando métodos estándar (ver, p. ej., los ejemplos más adelante), y el material liofilizado puede reconstituirse en un líquido estéril (p. ej., agua, solución salina, o una solución que incluye cualquiera de los excipientes deseados), con o sin un adyuvante, antes de la administración.

Además, la invención incluye el uso de composiciones en la prevención y tratamiento de infección o enfermedad de *C. difficile*. Por ende, la invención incluye la administración de las composiciones de la invención para prevenir o tratar una enfermedad asociada con *C. difficile*. (CDAD), tal como CDAD recurrente, así como características de CDAD que incluyen diarrea (p. ej., diarrea nosocomial) y colitis pseudomembranosa. Como se conoce en la materia, CDAD frecuentemente se asocia con tratamiento de sujetos con antibióticos, tal como sujetos que están hospitalizados. Por ende, las composiciones para el uso en los métodos de tratamiento de la invención pueden usarse en el tratamiento de tales pacientes. Además, el tratamiento de acuerdo con la invención puede combinarse con tratamiento con antibióticos (p. ej., vancomicina y/o metronidazol) y/o inmunoterapia pasiva (ver, p. ej., patente US 6,214,341). Los métodos de administración de la invención pueden usarse también en la generación de inmunoglobulina *C. difficile* para uso en inmunización pasiva de pacientes (ver, p. ej., patente US 6,214,341).

Se describen métodos para identificar excipientes que pueden usarse para generar composiciones que incluyen toxinas o toxoides de *C. difficile* teniendo propiedades mejoradas. Estos métodos involucran ensayos de exploración, tales como aquellos descritos adicionalmente más adelante, que facilitan la identificación de condiciones resultantes en aglomeración reducida o retardada y/o estabilidad incrementada de uno o más de los componentes de toxina y/o toxoide de las composiciones. Estos métodos incluyen ensayos de aglomeración y ensayos de estabilidad como se describe adicionalmente más adelante. Además, se describe el uso de otros ensayos para identificar formulaciones deseables, incluyendo ensayos de solubilidad, inmunogenicidad, y viscosidad.

Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante, por ejemplo, la ruta percutánea (p. ej., intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal) en cantidades y en regímenes determinados siendo apropiados por los técnicos en la materia. Por ejemplo, pueden administrarse 100 ng-1 mg, 100 ng-500 µg, 1-250 µg, 10-100 µg, 25-75 µg, o 50 µg de toxoide. Para los propósitos de profilaxis o terapia, la vacuna puede administrarse, por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 veces. Cuando múltiples dosis se administran, las dosis pueden separarse entre sí, por ejemplo, de una semana a un mes. En otro ejemplo, cuatro dosis de 50 µg cada una pueden administrarse intramuscularmente durante cualquier periodo de ocho semanas.

### Ejemplo 1

Para identificar las condiciones que mejoran la estabilidad física de los toxoides A y B de *C. difficile*, se llevó a cabo un análisis para compuestos estabilizadores. El análisis de 30 compuestos GRAS (generalmente relacionados como seguros) en varias concentraciones y en varias combinaciones se llevó a cabo en dos partes. Primero, un ensayo de aglomeración de alto rendimiento se usó para analizar los compuestos que retrasan o previenen aglomeración de toxoides en condiciones de estrés (toxoides a pH 5-5.5 se incubaron a 55°C de 55 a 75 minutos). Los compuestos que estabilizaron ambas proteínas se estudiaron adicionalmente por su habilidad para retrasar el desdoblamiento en condiciones que llevan a un estado plegado presumiblemente similar a nativo (pH 6.5). La estabilidad térmica de los toxoides en la superficie de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) se monitorizó con DSC y también mostró mejora significativa en la presencia de ciertos excipientes. Compuestos que efectivamente inhibieron aglomeración de ambos toxoides se investigaron adicionalmente por su habilidad para mejorar la estabilidad estructural de las proteínas. Para identificar agentes estabilizantes para toxoides ligados a adyuvante, se estudiaron adicionalmente excipientes seleccionados por su habilidad para mejorar la estabilidad térmica de toxoides ligados a

adyuvante. En conclusión, este estudio ha generado información respecto del comportamiento de toxoides libres y ligados a adyuvante en un rango de condiciones (temperaturas y solutos) que se pueden usar para diseñar formulaciones farmacéuticas de estabilidad física mejorada.

## 5 Materiales y métodos experimentales

### Materiales

Se produjeron toxoides A y B en forma altamente purificada usando los métodos descritos previamente (Kotloff y colaboradores, *Infection and Immunity* 69(2):988-995, 2001). La concentración de las proteínas se determinó por absorbencia de UV en 280 nm usando unidades de absorbencia de 1.173 para el toxoide A y 0.967 para el toxoide B a concentraciones de 1 mg/mL, respectivamente. Todos los reactivos usados fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Se usó regulador de fosfato de sodio (5 mM, pH 5.0, 5.5, y 6.5) que contenía NaCl 150 mM para los estudios de análisis de excipiente. Se usó regulador de fosfato de sodio (5 mM, pH 6.5) que contenía NaCl 150 mM para los estudios de agitación y adyuvante. Para intercambio de regulador, se dializó proteína a temperatura de refrigerador usando cartuchos de diálisis Slide-A-Lyzer, 10 kDa de MWCO (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos).

### Estudios de análisis y selección de excipiente

*Ensayo de Aglomeración.* Aproximadamente 30 compuestos GRAS (generalmente considerados como seguros) en 58 variaciones de concentración y en varias combinaciones se analizaron por sus habilidades para inhibir la aglomeración de los toxoides. La aglomeración de la proteína se monitorizó por mediciones de densidad óptica a 350 nm (OD 350 nm) usando un lector de placa de 96 pozos (Spectra Max M5, Molecular Devices, Sunnyvale, California, Estados Unidos). El ensayo de aglomeración se llevó a cabo a pH 5.5 para toxoide el A (1.2 mg/ml) y un pH 5.0 para el toxoide B (0.5 mg/ml) a 55°C. Bajo estas condiciones, las proteínas están parcialmente desdobladas y se asocian espontáneamente. Por ende, puede detectarse potencialmente cualquier influencia de estabilización de los excipientes que perturba estos dos procesos. La proteína se añadió a los pozos de una placa de 96 pozos que contenía excipientes en el pH correspondiente y las muestras se incubaron a 55°C durante 75 minutos en el caso del toxoide A y 55 minutos para el toxoide B. La densidad óptica de las soluciones se monitorizó a 350 nm cada 5 minutos. Se examinaron simultáneamente controles de soluciones de proteína sin compuestos añadidos y regulador solo con excipientes (blancos). Las mediciones se corrigieron para comportamiento de regulador-excipiente intrínseco mediante sustracción de los blancos antes del análisis de datos. Cada muestra se evaluó por triplicado. La inhibición porcentual de aglomeración se calculó empleando la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición de aglomeración} = 100 - \left[ \frac{\Delta OD_{350}(E)}{\Delta OD_{350}(C)} \times 100 \right]$$

donde  $\Delta OD_{350}(E)$  representa el cambio en OD 350 nm de la proteína en la presencia del excipiente y  $\Delta OD_{350}(C)$  el cambio en OD 350 nm de la proteína sin excipiente (Peek y colaboradores, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(1):44-60, 2006).

*Estudios de Estabilidad Estructural.* Se estudiaron soluciones de toxoide a una concentración de 0.2 mg/ml para mediciones de CD y 0.1 mg/ml para fluorescencia y análisis de absorción de UV. No se observó dependencia de concentración sobre este rango. Cada muestra se evaluó por duplicado para asegurar la capacidad de reproducción de las mediciones.

*Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) UV Lejana.* Se adquirieron espectros de CD usando un espectropolarímetro Jasco J-810 equipado con un controlador de temperatura Peltier de 6 posiciones. Se obtuvieron espectros de CD de 260-190 nm con una velocidad de exploración de 20 nm/minuto, una acumulación de 2 y un tiempo de respuesta de 2 segundos. La señal de CD a 208 nm se monitorizó cada 0.5°C sobre un rango de temperaturas de 10 a 85°C empleando una rampa de temperatura de 15°C/hora para estudiar transiciones térmicas (curvas de fusión) de las proteínas (en probetas selladas con una longitud de trayectoria de 0.1 cm). La señal de CD se convirtió a elipticidad molar por software Jasco Spectral Manager. La temperatura de punto medio de la transición térmica se obtuvo a partir de un ajuste sigmoide de las curvas de fusión usando software Origin.

*Espectroscopia de Fluorescencia ANS.* La capacidad de acceso de sitios apolares en las proteínas se monitorizó por emisión de fluorescencia de la sonda extrínseca sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). Cada muestra contuvo un exceso molar de 20 veces de ANS a proteína. Los espectros de emisión se recolectaron a partir de 400 a 600 nm con un tamaño de paso de 2 nm y un tiempo de integración de 1 segundo después de excitación de ANS a 372 nm. Los espectros de emisión se recolectaron cada 2.5°C con 5 minutos de equilibrio sobre un rango de temperaturas de

10 a 85°C. La línea de base de regulador de ANS en cada pH correspondiente se restó de los espectros de emisión brutos. Las posiciones pico de los espectros de emisión se obtuvieron a partir de ajustes polinomiales usando software Origin.

5 *Espectroscopia de Absorbencia UV de Alta Resolución.* Los espectros de absorbencia UV de alta resolución se adquirieron usando un espectrofotómetro visible UV Agilent 8453. La aglomeración de las proteínas se estudió mediante monitorización del OD a 350 nm cada 2.5°C en el rango de temperaturas de 10 a 85°C con una incubación de 5 minutos (suficiente para alcanzar el equilibrio) en cada temperatura.

10 *Diseminación de Luz Dinámica.* El diámetro hidrodinámico medio de las proteínas a pH 6.5 (solo y en presencia de excipientes) se analizó usando un instrumento de diseminación de luz dinámica (Brookhaven Instrument Corp., Holtzville, NY, Estados Unidos). El instrumento se equipó con un láser bombeado con diodo de 50 mW ( $\lambda = 532$  nm) y la luz diseminada se monitorizó a 90° al haz incidente. Las funciones de auto-correlación se generaron usando un auto-correlador digital (BI-9000AT). El diámetro hidrodinámico se calculó a partir del coeficiente de difusión por la ecuación de Stokes-Einstein usando el método de acumulados (con base en número lognormal). Los datos se ajustaron a un algoritmo de mínimos cuadrados restringido no negativamente para producir distribuciones multimodales (MSD). El instrumento se equipó con un baño de agua circulante controlado por temperatura RTE111 (Neslab, Newington, NH, Estados Unidos) y el diámetro hidrodinámico se monitorizó sobre un rango de temperaturas de 10 a 85°C.

20 *Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC).* DSC se llevó a cabo usando un MicroCal VPDSK con auto-muestreador (MicroCal, LLC; Northampton, MA, Estados Unidos). Los termogramas de toxoides (0.5 mg/ml) solos y en presencia de excipientes se obtuvieron de 10-90°C usando una tasa de exploración de 60°C/hora. Las celdas llenas se equilibraron durante 15 minutos a 10°C antes de comenzar cada exploración. Los termogramas del regulador solo se restaron de cada exploración de proteína antes del análisis.

25 *Estudios de agitación.* Se estudiaron soluciones de toxoides a una concentración de 0.4 mg/ml en presencia y ausencia de los excipientes. Las muestras de proteínas (0.4 ml) se colocaron en tubos de centrifuga de 1.5 ml y se agitaron en un rotador (Thermomixer R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 300 rpm durante 72 horas a una temperatura constante de 4°C. La concentración de la proteína y OD 350 nm se midieron antes y después de la rotación para evaluar la adsorción a paredes de recipiente y aglomeración. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a una velocidad de 10,000xg a 4°C y la concentración y OD 350 nm del sobrenadante se midió para detectar formación de aglomerados insolubles. Las estructuras de las proteínas se evaluaron por CD. Cada muestra se midió por duplicado.

### 35 Estudios de adyuvante

40 *Adsorción a Hidróxido de Aluminio (Alhydrogel®) (adyuvante de hidróxido de aluminio).* La habilidad de los toxoides para adsorberse a Alhydrogel® (Brenntag Biosector, Frederickssund, Dinamarca; adyuvante de hidróxido de aluminio) a varias concentraciones (0.025-1 mg/ml) se determinó mediante construcción de una isoterma de ligadura. Las soluciones de proteína en la presencia de 0.4 mg/ml de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) se volcaron en un rotador de tubos de extremo a extremo a temperatura de refrigerador durante 20 minutos. Las muestras se sometieron a centrifugación a 14,000xg durante 30 segundos para formar una pelotilla del adyuvante. El valor de la concentración de la proteína restante en los sobrenadantes se usó para la construcción de curvas de ligadura. La habilidad de la proteína para ligarse al Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) en presencia de excipientes se determinó por el mismo procedimiento. En este caso, el Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) se añadió a la solución de excipiente de proteína.

50 *Desorción de toxoides de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio).* La desorción de las proteínas de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) se evaluó en presencia de NaCl 2M. Las pelotillas del toxoide Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) se prepararon como se describe anteriormente. Las pelotillas se lavaron con regulador (pH 6.5) para remover proteína presente en el sobrenadante antes de la adición de la solución de NaCl. Las soluciones de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) se volcaron en un rotador de tubos de extremo a extremo a temperatura de refrigerador durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14,000xg durante 30 segundos para formar pelotillas del adyuvante. La concentración de la proteína en los sobrenadantes se usó para la construcción de isotermas de desorción.

60 *Estabilidad de Toxoides Ligados a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio).* La estabilidad térmica de los toxoides ligados a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) se monitorizó con DSC usando un MicroCal VP-AutoDSC (MicroCal, LLC, Northampton, MA, Estados Unidos). Toxoides a 0.5 mg/ml se ligaron a 0.4 mg/ml de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) mediante el procedimiento descrito anteriormente. Los termogramas de los toxoides se obtuvieron de 10 a 90°C con una tasa de exploración de 60°C/hora. Las muestras se equilibraron durante 15 minutos a 10°C antes de cada exploración. Los termogramas del Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) solo se restaron de cada exploración de proteína/adyuvante antes del análisis.



## Resultados y discusión

### Estudios de exploración de excipiente

5 Para investigar la habilidad de compuestos GRAS para prevenir/retrasar la aglomeración, se incubaron toxoides solos y en presencia de excipientes bajo condiciones de esfuerzo (incubación a 55°C). La aglomeración de los toxoides se monitorizó en alto rendimiento mediante monitorización de cambios en OD a 350 nm durante el tiempo de incubación. Los cambios de turbiedad se usaron adicionalmente para calcular el % de inhibición de aglomeración y se resumen en la Tabla 1 para el toxoide A y en la Tabla 2 para el toxoide B.

15 En los ensayos de aglomeración de alto rendimiento del toxoide A se descubrió que más de la mitad de los excipientes retrasaron o previnieron incrementos de OD 350 nm con el tiempo y llevaron a inhibición de aglomeración en un 90% o más (Tabla 1). Entre los excipientes examinados, 2.5% de albúmina, 2.5% de  $\alpha$ -ciclodextrina, 0.1% de Tween 80, histidina 0.3 M, y lisina 0.3 M llevaron a valores de OD 350 nm instantáneamente altos, lo cual sugiere que el toxoide A es insoluble bajo estas condiciones. La aglomeración del toxoide A también se acrecentó significativamente en presencia de otros 16 excipientes, entre los cuales, mezcla de arginina/glutamina 25 y 50 mM, arginina 0.3 M, y prolina 0.3 M fueron especialmente potentes.

20 La inhibición de aglomeración del toxoide B en un 90% o más ocurrió en presencia de 15 excipientes (Tabla 2). La presencia de histidina 0.3 M o citrato de sodio 0.2 M llevó a un OD 350 nm instantáneamente alto. Otros 20 compuestos indujeron más gradualmente la aglomeración durante el tiempo monitorizado. Los incrementos extremadamente altos en OD 350 nm se observaron en presencia de cloruro de calcio 0.015 M, ácido ascórbico 0.15 M, y arginina 0.3 M.

25 En muchos casos, la aglomeración de ambos toxoides se facilitó por los mismos excipientes (Tablas 1 y 2). En contraste, 2-OH-propil  $\gamma$ -CD al 5%, Tween 20 al 0.01% y 0.1%, ácido aspártico 0.15 M, y guanidina 0.3 M facilitaron la aglomeración de toxoide B solo. Además, la aglomeración en presencia de cloruro de calcio 0.015 M fue mucho mayor para el toxoide B que para el toxoide A. Esto puede relacionarse con la estabilidad térmica incrementada conocida del dominio C-terminal de toxina A en presencia de cloruro de calcio (Demarest y colaboradores, *Journal of Molecular Biology* 346(5):1197-1206, 2005). Las disimilitudes entre los toxoides y sus respuestas a la aglomeración inducida por soluto se relacionan de manera presumible con diferencias estructurales entre las toxinas correspondientes (Warny y colaboradores, *Lancet* 366(9491):1079-1084, 2005; Just y colaboradores, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 152:23-47, 2005). Una ausencia de inositolfosfatos entre compuestos estudiados sugiere que la aglomeración observada de los toxoides no involucra separación auto-catalítica (Reineke y colaboradores, *Nature (Londres, Reino Unido)* 446(7134):415-419, 2007). La mayoría de los carbohidratos, detergentes, y ciclodextrinas examinados inhibieron aglomeración de los toxoides. Los siguientes excipientes se descubrió que inhiben de manera eficiente la aglomeración de ambos de los toxoides: trehalosa al 20%, sacarosa al 20%, sorbitol al 10%, dextrosa al 10%, y glicerol al 20%.

40 Los carbohidratos anteriormente mencionados, sorbitol, glicerol, y dos tensioactivos (Tween 80 al 0.05%/0.1% y plurónico F-68 al 0.1%) se estudiaron adicionalmente por su habilidad para estabilizar las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas a pH 6.5 para monitorizar fluorescencia de ANS, cambios de señal de CD ante calentamiento, y DSC (figuras 1 y 2). El toxoide A en presencia de sacarosa al 20% y trehalosa al 20% produjo un establecimiento temprano de cambio de estructura secundaria, mientras que el resto de los excipientes retrasó la transición térmica en 2°C (figura 1a). Sorprendentemente, el toxoide B manifestó un establecimiento temprano del cambio en la estructura secundaria solo en presencia de sacarosa al 20%, mientras que el resto de los excipientes retrasó la transición térmica en ~1°C (figura 2a). El establecimiento temprano del cambio en la estructura secundaria de los toxoides en presencia de trehalosa y/o sacarosa podría explicarse por estabilización de estados parcialmente desdoblados por los solutos. Adicionalmente, no puede descartarse la posibilidad de que los toxoides sean parcialmente desdoblados por polisacáridos ante ligadura a sus repeticiones de secuencia de reconocimiento de carbohidratos de terminal C (Greco y colaboradores, *Nature Structural & Molecular Biology* 3(5):460-461, 2006). En el caso de desestabilización estructural por el segundo mecanismo, la disimilitud del comportamiento de los dos toxoides en presencia de trehalosa podría relacionarse con diferencias estructurales entre toxoides (el dominio terminal C posee 30 repeticiones en el toxoide A y 19 repeticiones en el toxoide B; Just y colaboradores, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 152:23-47, 2005). Es interesante destacar que el monosacárido (dextrosa) tuvo un efecto estabilizante en la estructura secundaria de ambos toxoides. El desdoblamiento inducido por temperatura de ambos toxoides y ligadura asociada de ANS no fue influenciado por la presencia de los compuestos (figura 1b, 2b). El efecto de los detergentes en el desdoblamiento inducido por temperatura de los toxoides se monitorizó con DSC y no pareció ser significativo (figuras 1c, 2c, y Tabla 3). Estas observaciones sugieren que los excipientes no estabilizan fuertemente la estructura de los toxoides por el mecanismo de exclusión preferencial descrito, sino que en su lugar inhiben la aglomeración por otros mecanismos, tales como bloqueo directo de las interacciones proteína/proteína que son responsables por asociación de proteínas (Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(15):9721-9726, 2002; Timasheff, *Advances in Protein Chemistry* 51 (Linkage

Thermodynamics of Macromolecular Interactions):355-432, 1998).

Para estudiar el efecto de una combinación de los agentes más activos sobre la estructura secundaria, los resultados a partir de una mezcla de sorbitol, dextrosa, y Tween 80 se caracterizaron por monitorización de las transiciones térmicas de los toxoides con CD y aglomeración con OD 350 nm (figuras 3 y 4). El calentamiento de soluciones de Tween 80 (0.05% o 0.1%) solas o en la presencia de sorbitol y/o dextrosa llevó a cambios en su estructura micelar, que se manifestaron por una disminución en la señal de CD y esparcimiento de luz incrementado según se monitoriza por OD 350 nm (figura 5). La concentración de los excipientes tuvo un efecto aproximadamente lineal sobre la temperatura de las transiciones térmicas (figura 6). Esto soporta la hipótesis de que los excipientes previenen aglomeración al inhibir directamente la asociación de proteínas. Los efectos de los excipientes sobre la transición térmica se resumen en las Tablas 4 y 5. La combinación de dextrosa al 10% y sorbitol al 10% en presencia o ausencia de Tween 80 al 0.05% tiende a retrasar el punto medio de la transición térmica de ambos de los toxoides al mayor grado (~4°C para el toxoide A y ~10°C para el toxoide B) (figura 3). Esto se puede explicar mediante ya sea un efecto de sinergia y/o la concentración total más alta de los compuestos de estabilización. En el caso del toxoide B, la temperatura de establecimiento de la transición no se retrasó en presencia de la combinación de agentes, pero el punto medio de la transición térmica se retrasó significativamente. Esto podría relacionarse con un desdoblamiento más gradual del toxoide B en presencia de los dos o más excipientes. El toxoide A manifestó un retraso significativo de aglomeración (monitorizado con OD 350 nm) en presencia de compuestos de estabilización (figura 4a). El diámetro hidrodinámico de los toxoides en presencia y ausencia de los excipientes también se monitorizó por DLS (figura 7). El toxoide A manifestó un establecimiento retrasado del incremento en el diámetro hidrodinámico previamente observado en presencia de los excipientes (figuras 7 a-c), mientras que un efecto más pequeño se observó con el toxoide B (figuras 7 d-f). Estas observaciones sugieren que la combinación particular de excipientes de vacuna potenciales probados en la presente estabilizan la estructura de proteínas mediante tanto un mecanismo de hidratación preferencial como inhibición potencial de asociación de proteínas. El uso de tales compuestos estabilizantes podría incrementar potencialmente la estabilidad física de los toxoides durante el almacenamiento.

#### Estudios de agitación

El efecto de agitación sobre la estabilidad física del toxoide se estudió mediante monitorización de la adsorción de proteínas a las paredes de frascos de almacenamiento, formación de agregados insolubles, y cambios en la estabilidad térmica de la proteína. Un cambio insignificante en la concentración de proteínas, OD 350 nm, y en fusiones en CD en la presencia y ausencia de los excipientes indicó que los toxoides no sufren cambios físicos mayores ante aplicación de este esfuerzo a base de agitación.

#### Estudios de adyuvante

Isotermas de ligadura de adyuvante revelaron que los toxoides se ligan eficientemente a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) a bajas concentraciones con ligadura saturada a mayor concentración de proteína (figura 8a). Los toxoides a 0.5 mg/ml están 95% o más ligados a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio), lo cual permite el uso de DSC para monitorizar directamente la estabilidad de la proteína sobre la superficie del adyuvante. La ausencia de desorción de toxoides ante adición de NaCl 2M indica que la interacción de toxoides con Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) no es solamente electrostática como frecuentemente se observa en interacciones de proteína/hidróxido de aluminio (figura 8b; Gupta y colaboradores, *Pharmaceutical Biotechnology* 6:229-248, 1995; Seeber y colaboradores, *Vaccine* 9(3):201-203, 1991; White y colaboradores, *Developments in Biologicals* (Basel, Suiza) 103 (Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines):217-228, 2000).

Ante ligadura a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio), el toxoide A no manifiesta cambio detectable en su estabilidad térmica, mientras que el toxoide B ligado a adyuvante demuestra una disminución de la T<sub>m</sub> en ~1.4°C. La fracción de Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) ligada a toxoide está un tanto reducida en la presencia de la mayoría de los excipientes (Tablas 6 y 7). Esto sugiere que los excipientes parcialmente interfieren con ligadura de toxoide a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) quizás por interacción directa con ya sea la proteína y/o adyuvante. La estabilidad térmica de las proteínas ligadas a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) en presencia y ausencia de los excipientes se resume en la Tabla 6 para el toxoide A y en la Tabla 7 para el toxoide B. La presencia de excipientes perturbó la estabilidad térmica de los toxoides ligados a adyuvante ya sea mediante disminución o incremento de la temperatura de transición. Una disminución en la estabilidad térmica se observó en ambos toxoides en presencia de sorbitol al 10%, mientras que la presencia de sorbitol al 10% y dextrosa al 10% disminuye la estabilidad térmica del toxoide B solo. Adicionalmente, Tween 80 tuvo un efecto de estabilización solamente en el caso del toxoide B ligado a adyuvante. Por otro lado, la dextrosa (10%) tuvo un efecto de estabilización sobre la estabilidad térmica de ambos toxoides. De manera interesante, la combinación de los tres excipientes (sorbitol al 10%, dextrosa al 10%, con Tween 80 al 0.05% o 0.1%) tiende a elevar la transición térmica de ambos toxoides ligados a adyuvante en 3-4°C.

## Conclusiones

Un enfoque sistemático a análisis y selección de estabilizador resultó en la identificación de excipientes que mejoraron la estabilidad térmica de ambos toxoides de *Clostridium difficile* A y B. Los estudios de toxoides ligados a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) en presencia de excipientes seleccionados identificaron condiciones que produjeron estabilidad física mejorada de proteínas ligadas a adyuvante. Este estudio también generó información respecto del comportamiento físico de los toxoides bajo un rango de condiciones (temperatura, soluto) que puede usarse para diseñar formulaciones de estabilidad de almacenamiento mejorada.

## Ejemplo II

Se investigaron cambios adicionales en la formulación de la vacuna de toxoide de *C. difficile* en un esfuerzo por mejorar los perfiles de estabilidad e inmunogenicidad de la vacuna. Los datos preclínicos y clínicos generados con la vacuna hasta la fecha indicaron que los perfiles de estabilidad e inmunogenicidad incrementados serían importantes para apoyar estudios clínicos futuros.

## pH

Determinar un pH que produce la máxima estabilidad fue parte del esfuerzo de mejora de la formulación. Los estudios se llevaron a cabo en muestras líquidas mantenidas a -65°C, 5°C, 25°C, y 37°C hasta 28 días con un pH que varía de 5.5-7.5. Los siguientes métodos se emplearon para establecer el perfil de estabilidad:

1. espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (cambios en la estructura secundaria),
2. espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (cambios en la temperatura de fusión,  $T_m$ ), y
3. espectrofotometría ( $OD_{350nm}$ ) y SEC-HPLC (formación de aglomerados).

No hubo cambio en la estructura secundaria observada en el espectro de CD para el toxoide A por encima de pH 6.0 y para el toxoide B a través del rango de pH entero probado (figura 9 y figura 10; Salnikova y colaboradores, J. Pharm. Sci. 97(9):3735-3752, 2008). Los datos de punto de fusión adquiridos a partir de las mediciones de CD revelaron que la estabilidad máxima de ambos toxoides es a un pH de más de 7.0 (figura 11 y figura 12).

Los estados de aglomeración de los toxoides A y B a través de un rango de pH de 6-7.5 variaron poco en el rango de  $\leq 60^\circ\text{C}$ , cuando se analizaron por SEC-HPLC para formación de aglomerados (% de monómero) y % de área de recuperación. Sin embargo, las diferencias en los estados de aglomeración se volvieron más aparentes a través del rango de pH cuando las temperaturas fueron elevadas (particularmente por encima de 5°C), con los valores de pH más bajos tendiendo hacia mayores cambios en los niveles de aglomeración. Esto se acompaña por un incremento en la densidad óptica a 350 nm a valores de pH más bajos, como se describe en Salnikova y colaboradores, J. Pharm. Sci. 97(9):3735-3752, 2008.

Cuando la aglomeración se evalúa a diferentes valores de pH sobre el tiempo a una temperatura de almacenamiento fija ( $\leq 60^\circ\text{C}$ ) (figura 13), los resultados de nuevo indicaron que los estados de aglomeración fueron muy estables a temperatura ultrabaja, con una sugerencia de que la aglomeración se promovió a niveles de pH más bajos ( $< \text{pH } 7.0$ ). Con estos datos en mente, el pH nominal para almacenamiento del volumen de vacuna se fijó en 7.5.

## Resistencia iónica

Determinar la resistencia iónica que produce la máxima estabilidad también fue parte del esfuerzo de mejora de la formulación. Los estudios se llevaron a cabo en muestras líquidas mantenidas a -65°C, 5°C, 25°C, y 37°C hasta 28 días en regulador de citrato de sodio 20 mM, pH 7.25, con concentraciones variables (0-300 mM) de cloruro de sodio. También se probó reemplazar NaCl con sacarosa al 5%. Los métodos empleados para establecer el perfil de estabilidad fueron SEC-HPLC, SDS-PAGE, y apariencia visual.

No fue discernible una diferencia clara por SDS-PAGE o apariencia visible. SEC-HPLC claramente mostró aglomeración de toxoide B a concentraciones de sal más altas. La aglomeración en toxoide A pareció ser dependiente de tiempo y temperatura, donde solamente se observó un efecto notable en NaCl 50 mM. Los datos indican que debe añadirse cloruro de sodio 50 mM o sacarosa al 5% para lograr la máxima estabilidad de los toxoides (figura 14 y figura 15).

## Cambio de regulador y adición de excipientes

Un estudio preliminar se llevó a cabo para evaluar el efecto de regulador y excipiente sobre la estabilidad de los toxoides. Datos derivados de HPLC-SEC demostraron que el regulador de citrato de sodio con sorbitol como un excipiente proporcionó la mayor estabilidad según se determina por la recuperación porcentual de los toxoides sobre el tiempo, como se muestra en la Tabla 8 y la Tabla 9.

### Evaluación de preparaciones liofilizadas

5 Para seleccionar una formulación liofilizada que sería estable para pruebas clínicas de Fase II, se empleó un ensayo de inmunogenicidad de hámster, debido a que es el ensayo pre-clínico que demuestra la mayor sensibilidad a cambios de producto que se relacionan con inmunogenicidad clínica. Los datos a partir de los estudios preliminares llevan a un estudio de exploración de excipiente con base en citrato de sodio como un regulador y sorbitol como un excipiente de estabilización. La sacarosa se introdujo como un excipiente de estabilización como un reemplazo para sorbitol en las formulaciones liofilizadas debido a la baja Tg' y los largos tiempos de liofilización observados en formulaciones de sorbitol. Un segundo estudio de liofilización/exploración de excipiente también se llevó a cabo usando regulador de fosfato de potasio y trehalosa según los datos de un estudio paralelo. A partir de estos estudios y datos de los experimentos previos, surgieron tres formulaciones principales, una líquida y dos liofilizadas.

15 Las formulaciones liofilizadas se prepararon y su estabilidad se evaluó en condiciones de tiempo real y aceleradas.

Los toxoides A y B se almacenaron por separado para estudiar de manera más cercana sus perfiles de estabilidad individuales. Los datos de apariencia y los datos de inmunogenicidad de hámster a partir de una formulación (liofilizada, citrato 20 mM, sacarosa al 5%, formaldehído al 0.016%, pH 7.5) después de almacenamiento a -65, 5 o 42°C por tres meses, se presentan más adelante. Se observa de ligera a ninguna diferencia en la apariencia entre las formulaciones al comienzo del estudio y después de almacenamiento a -65, 5, o 42°C durante 3 meses (Tabla 10 y Tabla 11). Además, la respuesta inmunológica del hámster no es significativamente diferente entre las formulaciones almacenadas a 5°C y 42°C durante 7 meses, o entre las mismas formulaciones con o sin formaldehído. El almacenamiento a 42°C es una condición muy extrema y, debido a que no se observa cambio durante el almacenamiento, los resultados suponen que la formulación muy probablemente será estable durante considerablemente más tiempo a temperaturas más bajas. Sin embargo, un análisis estadísticamente sólido de los datos con la intención de estimar la vida en estantes requiere que se observe algún cambio cuantificable para que pueda calcularse una tasa. Como no se observa cambio a la fecha, ninguna tasa verdadera puede calcularse. A la luz de estos datos, se planea usar una formulación de producto de fármaco liofilizado que consiste en toxoides A y B de *C. difficile* en citrato 20 mM, sacarosa al 5%, formaldehído al 0.016%, pH 7.5, almacenada a 2-8°C.

Las formulaciones usadas en los estudios de estabilidad detallados en este informe se prepararon usando el ciclo de liofilización resumido en la Tabla 12. Este ciclo produjo tortas sólidas, blancas, elegantes, pero estuvo muy al límite de completar el secado primario según se determina por la lectura de vacío Pirani que disminuye para igualar la lectura de vacío manométrica (figura 16). Los siguientes cambios críticos se hicieron al ciclo de liofilización para atender esta preocupación y crear un proceso más escalable:

1. La temperatura de estante se redujo a -35°C para asegurar que la sustancia de fármaco permaneciera congelada durante el secado primario a una mayor escala,
2. El secado primario se extendió a 4000 minutos para asegurar la terminación del secado primario a una mayor escala, y
3. El vacío se extendió a 100 mT para expedir secado y permitir un proceso más escalable.

El ciclo de liofilización transferido a Althea Technologies, Inc. para el procesamiento de los lotes clínicos GMP se destaca en la Tabla 13.

### 45 Resumen de propiedades fisicoquímicas y biológicas

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas clave de la vacuna determinadas experimentalmente se resumen más adelante.

50 Químicamente, la vacuna está compuesta de formas desactivadas (toxoides) de toxinas A y B de *C. difficile* presentes en una relación de 3:2, respectivamente. Las toxinas A y B de *C. difficile* son proteínas grandes, 308 kDa y 270 kDa, respectivamente que son similares pero distintas en estructura.

55 Físicamente, la vacuna se presenta como una solución de > 90% de pureza sin evidencia de aglomeración medible.

Bioquímicamente, los toxoides A y B de la vacuna son inmunológicamente reactivos a sus anticuerpos respectivos específicos de toxina A o B en un análisis Western blot.

60 Biológicamente, la vacuna es inmunógena en hámsteres, produciendo respuestas de anticuerpos de suero consistentes y dependientes de dosis. Los toxoides A y B de vacuna están desprovistos de actividad citotóxica. El componente del toxoide A de la vacuna retiene alguna actividad de ligadura a receptor, como aquella observada para la toxina A nativa.

La vacuna se presenta como una forma liofilizada en un regulador compuesto de citrato de sodio 20 mM, pH 7.5, sacarosa al 5%, formaldehído al 0.016%. El producto se almacena a 2-8°C.

#### Estudios de análisis y selección de liofilización

5 Para analizar y seleccionar formulaciones liofilizadas se empleó una inmunogenicidad de hámster para evaluación. La liofilización tuvo lugar en un FTS LyoStar II. La congelación se logró mediante la reducción de la temperatura de los estantes lo suficientemente como para forzar la temperatura del producto por debajo de Tg'. El secado primario comenzó aplicando un vacío y manteniéndolo hasta que el agua libre se sublimara. La temperatura de los estantes  
10 entonces se incrementó para comenzar el secado secundario y se mantuvo para secar adicionalmente el producto mediante la expulsión del agua adsorbida. Las formulaciones se pusieron en estabilidad a condiciones de temperatura de 5, 25, y 42°C.

15 **Tabla 1.** Efecto de excipientes GRAS sobre aglomeración del toxoide A. Los compuestos que retrasan/previene la aglomeración tienen un % positivo de valores de inhibición de aglomeración; los compuestos que inducen la aglomeración tienen un % negativo de valores de inhibición de aglomeración.

Excipiente, concentración	% de inhibición de aglomeración	Excipiente, concentración	% de inhibición de aglomeración
Albúmina, 2.5%	103*	Glicerol, 10%	88
$\alpha$ -ciclodextrina, 2.5%	101*	2-OH propil $\gamma$ -CD, 10%	81
Tween 80, 0.1%	100*	Tween 20, 0.05%	73
Dietanolamina, 0.3 M	100	Tween 80, 0.05%	67
Citrato de sodio, 0.1 M	100	Ácido aspártico, 0.15 M	65
Sorbitol, 10%	100	Tween 20, 0.1%	64
Histidina, 0.3 M	100*	Plurónico F-68, 0.05%	50
Sacarosa, 10%	100	Tween 20, 0.01%	37
Trehalosa, 10%	100	Sulfato de dextrano, 0.04 mg/ml	30
Guanidina, 0.3 M	99	Brij 35, 0.05%	26
Sorbitol, 20%	99	Sulfato de dextrano, 0.004 mg/ml	16
Dextrosa, 20%	99	2-OH propil $\gamma$ -CD, 5%	10
Dextrosa, 10%	99	Albúmina, 5%	9
Trehalosa, 20%	99	Brij 35, 0.01%	-2
Citrato de sodio, 0.2 M	99	Cloruro de calcio, 0.015 M	-7
Glicerol, 20%	98	Plurónico F-68, 0.01%	-14
Tween 80, 0.01%	98	Gelatina, 5%	-46
Albúmina, 1%	98	Ácido málico, 0.15 M	-52
Lactosa, 20%	98	Ácido láctico, 0.15 M	-72
Manitol, 10%	97	Gelatina, 2.5%	-74
Sacarosa, 20%	97	Ácido glutámico, 0.15 M	-77
Plurónico F-68, 0.1%	96	Dextrano T40, 0.003 mg/ml	-87
2-OH propil $\beta$ -CD, 10%	96	Glicina, 0.3 M	-88

## ES 2 657 485 T3

2-OH propil $\beta$ -CD, 5%	96	Sulfato de dextrano, 0.1 mg/ml	-88
Dextrano T40, 0.08 mg/ml	95	Ácido ascórbico, 0.15 M	-99
Brij 35, 0.1%	95	Prolina, 0.3 M	-112
Dextrano T40, 0.03 mg/ml	93	Arginina, 0.3 M	-265
Lactosa, 10%	92	Arg/Glu 50 mM cada una	-426
Lisina, 0.3 M	89*	Arg/Glu 25 mM cada una	-463

Incertitudes en el orden de +11. \* OD 350 nm inicial alto.

5 **Tabla 2.** Efecto de excipientes GRAS sobre aglomeración de toxoide B. Los compuestos que retrasan/previene la aglomeración tienen un % positivo de valores de inhibición de aglomeración; los compuestos que inducen la aglomeración tienen un % negativo de valores de inhibición de aglomeración.

Excipiente, concentración	% de inhibición de aglomeración	Excipiente, concentración	% de inhibición de aglomeración
$\alpha$ -ciclodextrina, 2.5%	100	Dextrano T40, 0.03 mg/ml	35
Histidina, 0.3 M	100*	Dextrano T40, 0.08 mg/ml	25
Tween 80, 0.1%	100	2-OH propil $\gamma$ -CD, 10%	12
Tween 80, 0.05%	100	Brij 35, 0.05%	10
Albúmina, 1%	99	Plurónico F-68, 0.05%	6
Dextrosa, 20%	99	Glicerol, 10%	4
Albúmina, 5%	98	Sulfato de dextrano, 0.04 mg/ml	3
Citrato de sodio, 0.2 M	98*	Sulfato de dextrano, 0.004 mg/ml	2
Trehalosa, 20%	98	Tween 20, 0.05%	0
Citrato de sodio, 0.1 M	97	2-OH propil $\gamma$ -CD, 5%	-5
Sorbitol, 20%	97	Tween 20, 0.01%	-5
Sacarosa, 20%	96	Plurónico F-68, 0.01%	-8
Dietanolamina, 0.3 M	96	Tween 20, 0.1%	-13
Dextrosa, 10%	95	Brij 35, 0.01%	-25
Sorbitol, 10%	92	Glicina, 0.3 M	-26
Albúmina, 2.5%	87	Gelatina, 2.5%	-36
2-OH propil $\beta$ -CD, 5%	79	Sulfato de dextrano, 0.1 mg/ml	-38
2-OH propil $\beta$ -CD, 10%	78	Arg/Glu 50 mM cada una	-39
Manitol, 10%	76	Ácido glutámico, 0.15 M	-41
Sacarosa, 10%	71	Arg/Glu 25 mM cada una	-42
Glicerol, 20%	71	Ácido aspártico, 0.15 M	-50
Trehalosa, 10%	69	Gelatina, 5%	-56
Plurónico F-68, 0.1%	68	Prolina, 0.3 M	-57

## ES 2 657 485 T3

Brij 35, 0.1%	63	Dextrano T40, 0.003 mg/ml	-59
Lactosa, 20%	52	Ácido láctico, 0.15 M	-80
Ácido málico, 0.15 M	44	Guanidina, 0.3 M	-96
Tween 80, 0.01%	40	Cloruro de calcio, 0.015 M	-141
Lactosa, 10%	39	Ácido ascórbico, 0.15 M	-223
Lisina 0.3 M	37	Arginina, 0.3 M	-280

Incertitudes en el orden de +11. \* OD 350 nm inicial alto.

5 **Tabla 3.** Efecto de solutos (detergentes) sobre la estabilidad térmica del toxoide A y B. La estabilidad térmica ( $T_m$ ) se monitorizó por DSC. La  $T_m$  es la temperatura correspondiente a la posición pico máxima de la transición térmica.

Proteína	$T_m$ (°C)
Toxoide A	59.8 + 0.0
Toxoide A + Tween 80 al 0.05%	59.1 + 0.4
Toxoide A + Plurónico F-68 al 0.1%	59.1 + 0.4
Toxoide B	55.8 + 0.0
Toxoide B + Tween 80 al 0.05%	56.1 + 0.3
Toxoide B + Plurónico F-68 al 0.1%	58.0 ± 0.3

**Tabla 4.** Efecto de excipientes sobre el punto medio de la temperatura de transición térmica ( $T_m$ ) del toxoide A. La transición térmica se monitorizó por la señal de CD a 208 nm como una función de la temperatura. Cada medición se llevó a cabo por duplicado y tiene -0.5°C de incertitud.

Toxoide A en presencia de excipiente(s)	$T_m$	Diferencia de $T_m$
Toxoide A	59.8	0.0
Trehalosa al 20%	59.4	-0.5
Sacarosa al 20%	63.1	3.3
Glicerol al 20%	62.4	2.6
Plurónico F-68 al 0.1%	61.1	1.3
Sorbitol al 10%	62.4	2.6
Dextrosa al 10%	62.4	2.6
Tween 80 al 0.05%	59.9	0.0
Sorbitol al 5% + Tween 80 al 0.05%	60.4	0.6
Sorbitol al 10% + Tween 80 al 0.05%	62.3	2.5
Sorbitol al 15% + Tween 80 al 0.05%	62.4	2.6
Dextrosa al 5% + Tween 80 al 0.05%	60.2	0.4
Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	62.3	2.5
Dextrosa al 15% + Tween 80 al 0.05%	62.5	2.7
Sorbitol al 2.5% + Dextrosa al 2.5% + Tween 80 al 0.05%	60.2	0.4

Toxoide A en presencia de excipiente(s)	Tm	Diferencia de Tm
Sorbitol al 5% + Dextrosa al 5% + Tween 80 al 0.05%	61.3	1.5
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	63.5	3.7
Tween 80 al 0.1%	59.0	-0.8
Sorbitol al 10% + Tween 80 al 0.1%	60.6	0.7
Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.1%	61.5	1.7
Sorbitol al 2.5% + Dextrosa al 2.5% + Tween 80 al 0.1%	60.0	0.2
Sorbitol al 5% + Dextrosa al 5% + Tween 80 al 0.1%	60.5	0.7
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.1%	62.1	2.3
Sorbitol al 2.5% + Dextrosa al 2.5%	60.8	0.9
Sorbitol al 5% + Dextrosa al 5%	61.7	1.8
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10%	63.9	4.0
Sorbitol al 15% + Dextrosa al 15%	64.6	4.8
Sorbitol al 20% + Dextrosa al 20%	66.6	6.7
Sorbitol al 20% + Dextrosa al 10%	69.9	5.1
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 20%	50.1	-9.7

**Tabla 5.** Efecto de excipientes sobre el punto medio de la temperatura de transición térmica (Tm) del toxoide B. La transición térmica se monitorizó por la señal de CD a 208 nm como una función de la temperatura. Cada medición se llevó a cabo por duplicado y tiene -0.5°C de incertitud.

5

Toxoide B en presencia de excipiente(s)	Tm	Diferencia de Tm
Toxoide B	55.8	0.0
Trehalosa al 20%	60.3	4.5
Sacarosa al 20%	-	-
Glicerol al 20%	58.6	2.8
Plurónico F-68 al 0.1%	56.2	0.4
Sorbitol al 10%	56.6	0.8
Dextrosa al 10%	57.3	1.6
Tween 80 al 0.05%	55.1	-0.7
Sorbitol al 5% + Tween 80 al 0.05%	56.7	0.9
Sorbitol al 10% + Tween 80 al 0.05%	63.2	7.4
Sorbitol al 15% + Tween 80 al 0.05%	64.0	8.2
Dextrosa al 5% + Tween 80 al 0.05%	59.1	3.3
Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	70.8	15.0
Sorbitol al 2.5% + Dextrosa al 2.5% + Tween 80 al 0.05%	56.7	0.9
Sorbitol al 5% + Dextrosa al 5% + Tween 80 al 0.05%	63.5	7.7
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	69.1	13.3
Tween 80 al 0.1%	53.6	-2.2



Toxoide B en presencia de excipiente(s)	Tm	Diferencia de Tm
Sorbitol al 10% + Tween 80 al 0.1%	58.5	2.7
Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.1%	62.6	6.9
Sorbitol al 2.5% + Dextrosa al 2.5% + Tween 80 al 0.1%	60.0	4.2
Sorbitol al 5% + Dextrosa al 5% + Tween 80 al 0.1%	56.5	0.8
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.1%	60.8	5.1
Sorbitol al 5% + Dextrosa al 5%	56.5	0.7
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10%	65.3	9.6
Sorbitol al 15% + Dextrosa al 15%	60.1	4.4
Sorbitol al 20% + Dextrosa al 20%	63.1	7.3
Sorbitol al 20% + Dextrosa al 10%	38.0	-17.8
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 20%	61.2	5.5

5 **Tabla 6.** Estabilidad térmica del toxoide A ligado a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) en presencia y ausencia de excipiente(s) (a menos que se especifique de otra manera). La estabilidad térmica (Tm) se monitorizó por DSC, con la Tm indicando la temperatura correspondiente a la posición pico de la transición térmica. El porcentaje de toxoide ligado a adyuvante se midió en cada condición con una incertitud de 1%. Cada condición se estudió por duplicado.

Toxoide A ligado a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) en presencia de solutos	% de proteína ligada	Tm	Diferencia de Tm
Toxoide A no ligado		58.8 ± 0.4	0.1
Toxoide A	96	58.7 + 0.3	-
Sorbitol al 10%	81	52.4 + 1.5	-6.2
Dextrosa al 10%	86	60.6 + 0.5	2.0
Tween 80 al 0.05%	93	58.7 + 0.1	0.0
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10%	77	62.9 + 0.0	4.2
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	81	63.1 + 1.2	4.2
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.1%	74	62.0 + 1.3	3.3
Sorbitol al 10% + Tween 80 al 0.05%	86	59.3 ± 0.8	0.7
Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	85	59.5 + 1.1	0.8

10 **Tabla 7.** Estabilidad térmica del toxoide B ligado a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) en presencia y ausencia de excipiente(s) (a menos que se especifique de otra manera). La estabilidad térmica (Tm) se monitorizó por DSC. La Tm indica la temperatura correspondiente a la posición pico de la transición térmica. El porcentaje de proteína ligado a adyuvante se midió en cada condición con una incertitud de 1%. Cada condición se estudió por duplicado.

ES 2 657 485 T3

Toxoide B ligado a Alhydrogel® (adyuvante de hidróxido de aluminio) en presencia de solutos	% de proteína ligada	T <sub>m</sub>	Diferencia de T <sub>m</sub>
Toxoide B no ligado	-	56.2 ± 0.4	1.4
Toxoide B	99	54.8 + 0.5	-
Sorbitol al 10%	92	52.5 + 1.4	-2.2
Dextrosa al 10%	96	57.9 + 0.2	3.1
Tween 80 al 0.05%	96	58.2 + 0.6	3.4
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10%	95	54.2 + 0.9	-0.5
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	99	58.0 + 2.8	3.3
Sorbitol al 10% + Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.1%	77	58.7 + 1.0	3.9
Sorbitol al 10% + Tween 80 al 0.05%	96	58.5 + 1.0	3.8
Dextrosa al 10% + Tween 80 al 0.05%	92	55.8 + 2.5	1.1

Tabla 8

**Toxoides A**  
**2 meses de estabilidad**  
**% de recuperación de toxoides**

	Fosfato de Sodio 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD A	Fosfato de Sodio 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD A	Fosfato de Sodio 20 mM, Trehalosa al 4%, pH 7.5 TXD A	Citrato de Sodio 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD A	Citrato de Sodio 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD A	Citrato de Sodio 20 mM, Trehalosa al 4%, pH 7.5 TXD A	Histidina 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD A	Histidina 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD A	Hepes 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD A	Hepes 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD A	Histidina 75 mM, PS20 al 0.05%, pH 7.5 TXD A	Dietanolamina 75 mM, PS20 al 0.05%, pH 7.5 TXD A
Temperatura (°C)												
-65	95.0	91.2	90.2	100.0	54.6	90.1	69.2	75.2	89.9	91.0	80.8	52.6
5	88.3	91.7	86.4	99.2	96.8	88.3	64.3	72.9	88.0	89.0	79.5	37.7
25	83.5	88.0	62.9	91.8	93.5	64.0	63.0	69.0	78.9	88.2	55.3	23.1

5

Tabla 9

**Toxoides B**  
**2 meses de estabilidad**  
**% de recuperación de toxoides**

	Fosfato de Sodio 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD B	Fosfato de Sodio 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD B	Fosfato de Sodio 20 mM, Trehalosa al 4%, pH 7.5 TXD B	Citrato de Sodio 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD B	Citrato de Sodio 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD B	Citrato de Sodio 20 mM, Trehalosa al 4%, pH 7.5 TXD B	Histidina 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD B	Histidina 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD B	Hepes 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5 TXD B	Hepes 20 mM, Sorbitol al 4%, pH 7.5 TXD B	Histidina 75 mM, PS20 al 0.05%, pH 7.5 TXD B	Dietanolamina 75 mM, PS20 al 0.05%, pH 7.5 TXD B
Temperatura (°C)												
-65	76.72	78.52	65.97	100.0	90.11	77.84	59.70	66.97	75.73	82.54	62.44	57.79
5	74.52	78.82	36.44	84.36	86.73	47.83	60.20	67.34	77.68	80.69	34.20	26.13
25	71.88	78.93	1.83	84.31	86.65	4.07	55.15	60.48	73.23	75.14	0.00	1.15

10

**Tabla 10. Apariencia de una formulación liofilizada después de almacenamiento a diferentes temperaturas**

Molécula			Apariencia después de 3 meses a:		
	Atributo	Inicio	-65°C	5°C	42°C
Toxoide A	Apariencia de torta	blanca, encogimiento mínimo	blanca, encogimiento mínimo	blanca, encogimiento mínimo	blanca, encogimiento mínimo
	Tiempo de reconstitución	< 10 s	< 1 min	< 1 min	< 1 min
	Apariencia líquida	clara, incolora, sin partículas	clara, incolora, sin partículas	clara, incolora, sin partículas	clara, incolora, sin partículas
Toxoide B	Apariencia de torta	blanca, encogimiento mínimo	blanca, encogimiento mínimo	blanca, encogimiento mínimo	blanca, encogimiento mínimo
	Tiempo de reconstitución	< 10 s	< 1 min	< 1 min	< 1 min
	Apariencia líquida	clara, incolora, sin partículas	clara, incolora, sin partículas	clara, incolora, sin partículas	clara, incolora, sin partículas

**Tabla 11. Inmunogenicidad de una formulación liofilizada después de almacenamiento a diferentes temperaturas (títulos de IgG antitoxinas A y B de suero en hámsteres)**

Molécula	Descripción de formulación: relación A:H = 3:2, proteína total . 0.4 mg/ml	Citrato 20 mM, sacarosa al 5% pH 7.5 liofilizada			Citrato 20 mM, sacarosa al 5%, H <sub>2</sub> CO al 0.016%, pH 7.5 liofilizada		
		T. Almacenamiento	5°C	25°C	42°C	5°C	25°C
		Mediana Log <sub>10</sub>			Mediana Log <sub>10</sub>		
Toxoide A	1 mes	5.34	-	5.26		-	
	3 meses	5.57		5.56		-	5.42
	5 meses	5.33	5.23	-	-	5.30	
	7 meses		5.49	5.41	5.47	5.45	-
	<b>Cambio de Log</b>	<b>-0.01</b>	<b>0.26</b>	<b>0.15</b>		<b>0.15</b>	<b>-</b>
Toxoide H	1 mes	5.49		5.62		-	
	3 meses	5.54	-	5.42			5.23
	5 meses	5.62	5.34	-	-	5.49	
	7 meses	-	5.49	5.62	5.70	5.78	-
	<b>Cambio de Log</b>	<b>0.13</b>	<b>0.15</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0.29</b>	<b>-</b>

H<sub>2</sub>CO = formaldehído

Tabla 12

Congelación
Llevar estantes a 1°C/minuto hasta 5°C. Mantener durante 30 minutos.
Llevar estantes a 1°C/minuto hasta -5°C. Mantener durante 30 minutos.
Llevar estantes a 5°C/minuto hasta -50°C. Mantener durante 90 minutos.
Encender vacío con un punto fijo de 60 mT.
Secado primario
Llevar estantes a 1°C/minuto hasta -40°C. Mantener durante 300 minutos. Vacío igual a 60 mT.
Llevar estantes a 0.5°C/minuto hasta -34°C. Mantener durante 1100 minutos. Vacío igual a 60 mT.
Secado secundario
Llevar estantes a 0.2°C/minuto a 5°C. Mantener durante 480 minutos. Vacío igual a 60 mT.
Llevar estantes a 0.1°C/minuto a 25°C. Mantener durante 300 minutos. Vacío igual a 60 mT.
Paso de retención
Llevar estantes a 0.5°C/minuto a 0°C. Mantener durante 9999 minutos. Vacío igual a 100 mT.
Retro-llenado
Retro-llevar a 600 000 mT con N <sub>2</sub> purificado seco.

Tabla 13

Congelación
Llevar estantes a 10C/minuto hasta 5°C. Mantener durante 30 minutos.
Llevar estantes a 0.5°C/minuto hasta -45°C. Mantener durante 120 minutos.
Encender vacío con un punto fijo de 100 mT.
Secado primario
Llevar estantes a 0.2°C/minuto hasta -35°C. Mantener durante 4000 minutos. Vacío igual a 100 mT.
Secado secundario
Llevar estantes a 0.2°C/minuto a 5°C. Mantener durante 480 minutos. Vacío igual a 100 mT.
Llevar estantes a 0.2°C/minuto a 25°C. Mantener durante 300 minutos. Vacío igual a 100 mT.
Paso de retención
Llevar estantes a 0.5°C/minuto a 0°C. Mantener durante 9999 minutos. Vacío igual a 100 mT.
Retro-llenado
Retro-llevar a 600 000 mT con N <sub>2</sub> purificado seco.

- 5 El uso de formas singulares en la presente, tales como "un", "uno", "una", "el" y "la" no excluye indicación de la forma plural correspondiente, a menos que el contexto indique lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, si una reivindicación indica el uso de "una" toxina, toxoide, o excipiente, también se puede interpretar que abarca el uso de más de una toxina, toxoide, o excipiente, a menos que se indique de otra manera. Otras formas de realización están dentro de las reivindicaciones siguientes.

10

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un toxoide de *Clostridium difficile* y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden
- 5 (a) un regulador seleccionado de un regulador de citrato de sodio o potasio y un regulador de fosfato de sodio o potasio; y  
(b) sacarosa,  
donde dichos excipientes farmacéuticamente aceptables incrementan la estabilidad térmica del
- 10 toxoide y/o reducen o retrasan la aglomeración del toxoide, con relación a una composición que carece de dichos excipientes farmacéuticamente aceptables.
2. La composición de la reivindicación 1 que comprende además formaldehído a una concentración de 0.001 a 0.0020%.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, donde:  
(a) dichos excipientes farmacéuticamente aceptables reducen o retrasan la aglomeración del toxoide un 50% o más, con relación a una composición que carece de dichos excipientes farmacéuticamente aceptables; o  
(b) dichos excipientes farmacéuticamente aceptables incrementan la estabilidad térmica del toxoide en
- 20 0.5°C o más, con relación a una composición que carece de dichos excipientes farmacéuticamente aceptables.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición comprende un toxoide de toxinas A y B de *C. difficile*.
- 25 5. La composición de la reivindicación 4, donde:  
(a) los toxoides A y B están presentes en la composición en una relación de 5:1 (A:B) a 1:5 (A:B); o  
(b) los toxoides A y B están presentes en la composición en una relación de 3:1 a 3:2, o 1:1 (A:B).
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la composición es una composición farmacéutica.
- 30 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un adyuvante.
8. La composición de la reivindicación 7, donde el adyuvante comprende un compuesto de aluminio, donde opcionalmente el compuesto de aluminio es un compuesto de hidróxido de aluminio.
- 35 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la composición está  
(a) en forma líquida; o  
(b) en forma de polvo seco, liofilizada, secada por congelación, secada por rocío, o secada por
- 40 espuma.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde  
(a) el regulador de citrato es citrato de sodio; o  
(b) el regulador de fosfato es fosfato de sodio.
- 45 11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la composición comprende:  
(a) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, citrato de sodio o potasio 5-100 mM, sacarosa al 2-20%, y formaldehído a  $\leq 0.020\%$ , pH 5.5-8.5;  
(b) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, citrato de sodio o potasio 10-30 mM, sacarosa al 2-10%, y formaldehído a  $\leq 0.020\%$ , pH 6.5-8.0;  
(c) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, citrato de sodio 20 mM, sacarosa al 5%, y formaldehído al
- 50 0.016%, pH 7.5;  
(d) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, fosfato de sodio o potasio 5-100 mM, sacarosa al 2-20%, formaldehído a  $\leq 0.020\%$ , pH 5.5-8.5;  
(e) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, fosfato de sodio o potasio 10-30 mM, sacarosa al 2-10%, y formaldehído a  $\leq 0.020\%$ , pH 6.5-8.0; o  
(f) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, fosfato de sodio 20 mM, sacarosa al 5%, y formaldehído al
- 55 0.016%, pH 7.5.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la composición está en una forma liofilizada y comprende:  
(a) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, citrato de sodio o potasio 10-30 mM, sacarosa al 2-10%, y formaldehído a  $\leq 0.020\%$ , pH 6.5-8.0; o
- 60

(b) toxoides A y B de *Clostridium difficile*, citrato de sodio 20 mM, sacarosa al 5%, y formaldehído al 0.016%, pH 7.5.

5 13. Un método para hacer una composición que comprende un toxoide de *Clostridium difficile* y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden

(a) un regulador seleccionado de un regulador de citrato de sodio o potasio y un regulador de fosfato de sodio o potasio; y

(b) sacarosa,

10 donde dichos excipientes farmacéuticamente aceptables incrementan la estabilidad térmica del toxoide, y/o reducen o retrasan la aglomeración del toxoide con relación a una composición que carece de dichos excipientes farmacéuticamente aceptables, donde el método comprende proporcionar un toxoide de *Clostridium difficile* y mezclar el toxoide de *Clostridium difficile* con dichos excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 14. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad o infección provocada por *C. difficile* en un sujeto.

15 15. El uso de una combinación de

(a) un regulador seleccionado de un regulador de citrato de sodio o potasio y un regulador de fosfato de sodio o potasio; y

20 (b) sacarosa,

para incrementar la estabilidad térmica y/o reducir o retrasar la aglomeración de un toxoide de *Clostridium difficile in vitro*.

25 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15 donde dichos componentes (a) y (b) se proporcionan en una composición, siendo dicha composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

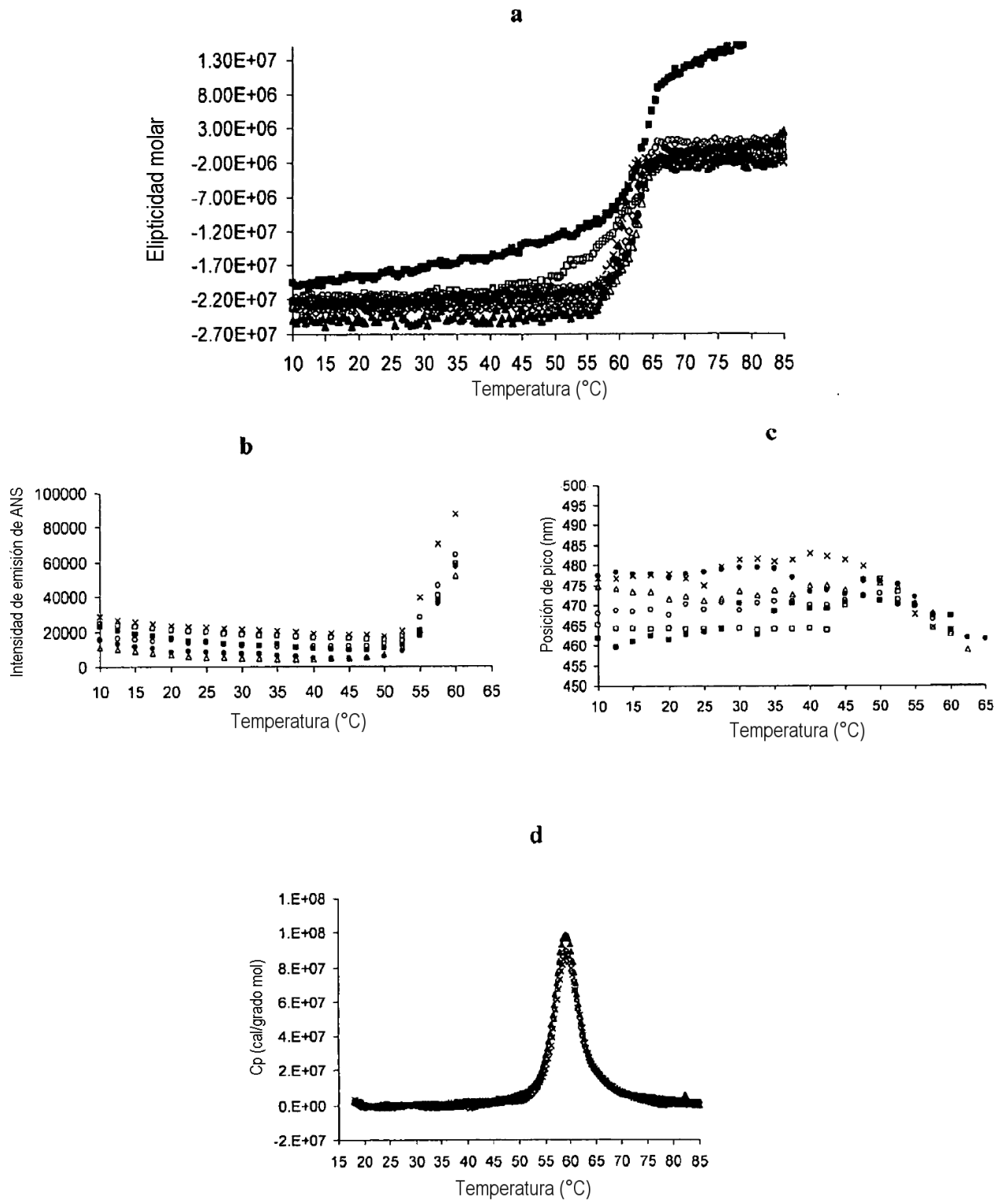


Figura 1



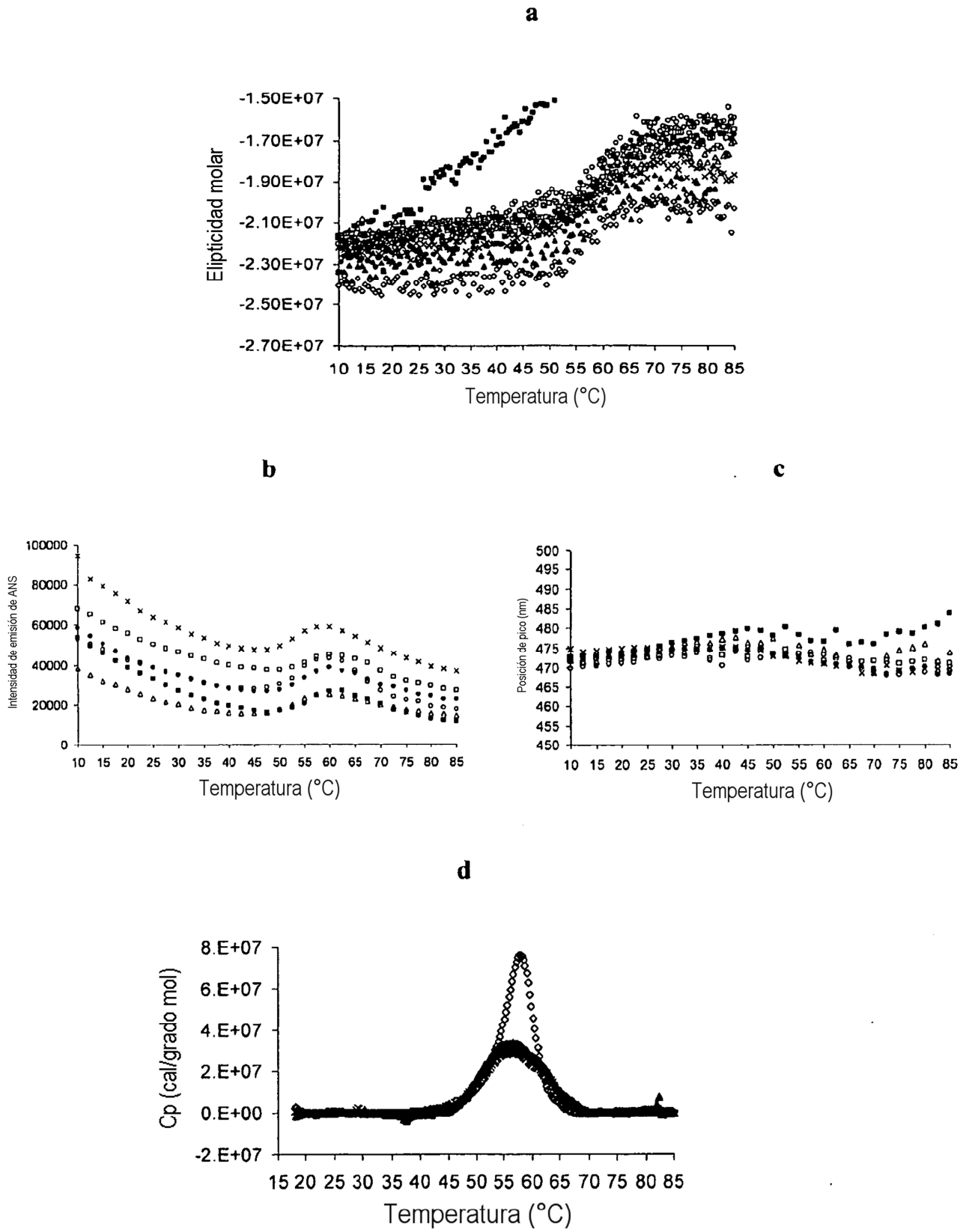


Figura 2

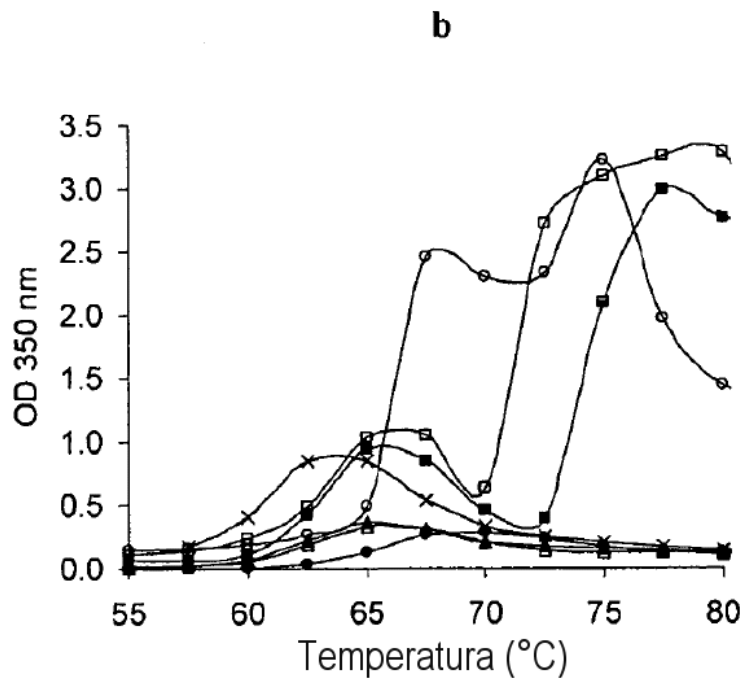
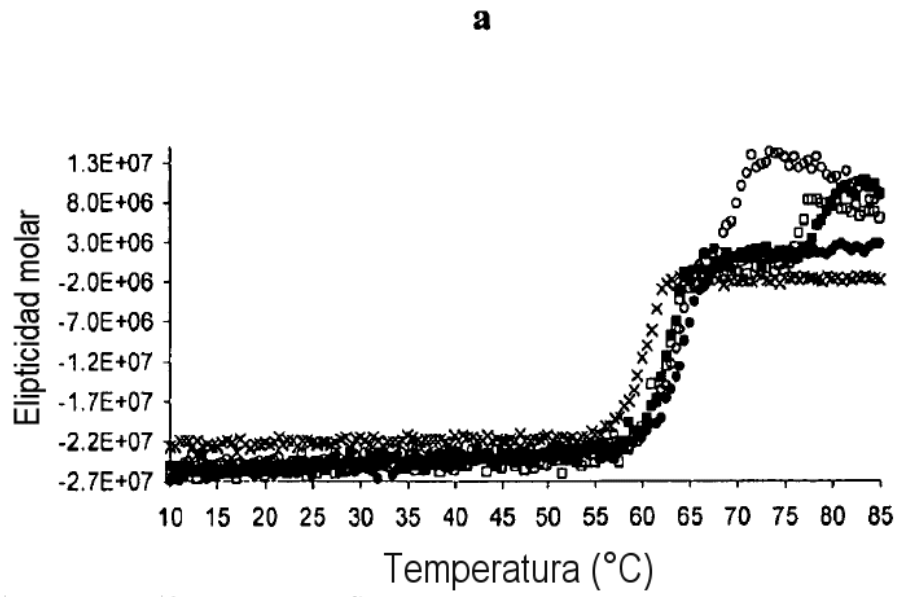
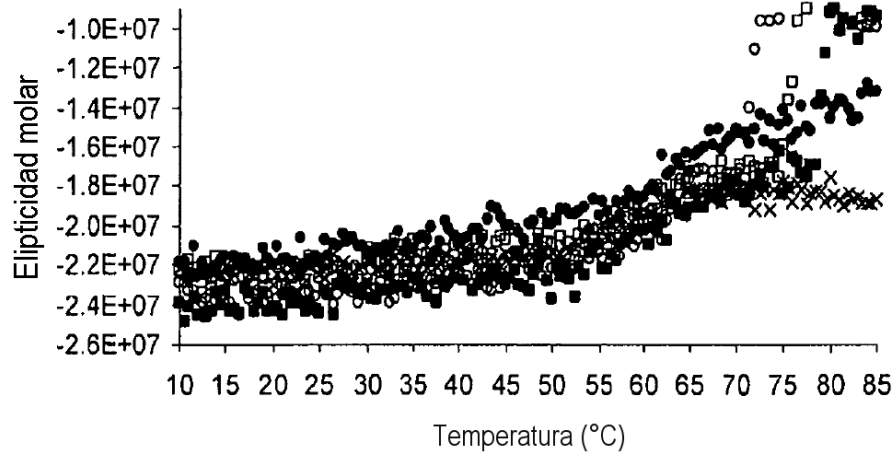


Figura 3

**a**



**b**

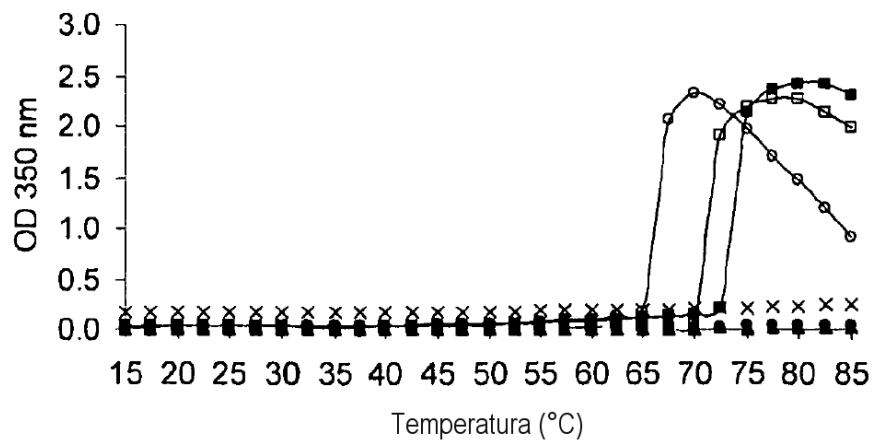


Figura 4

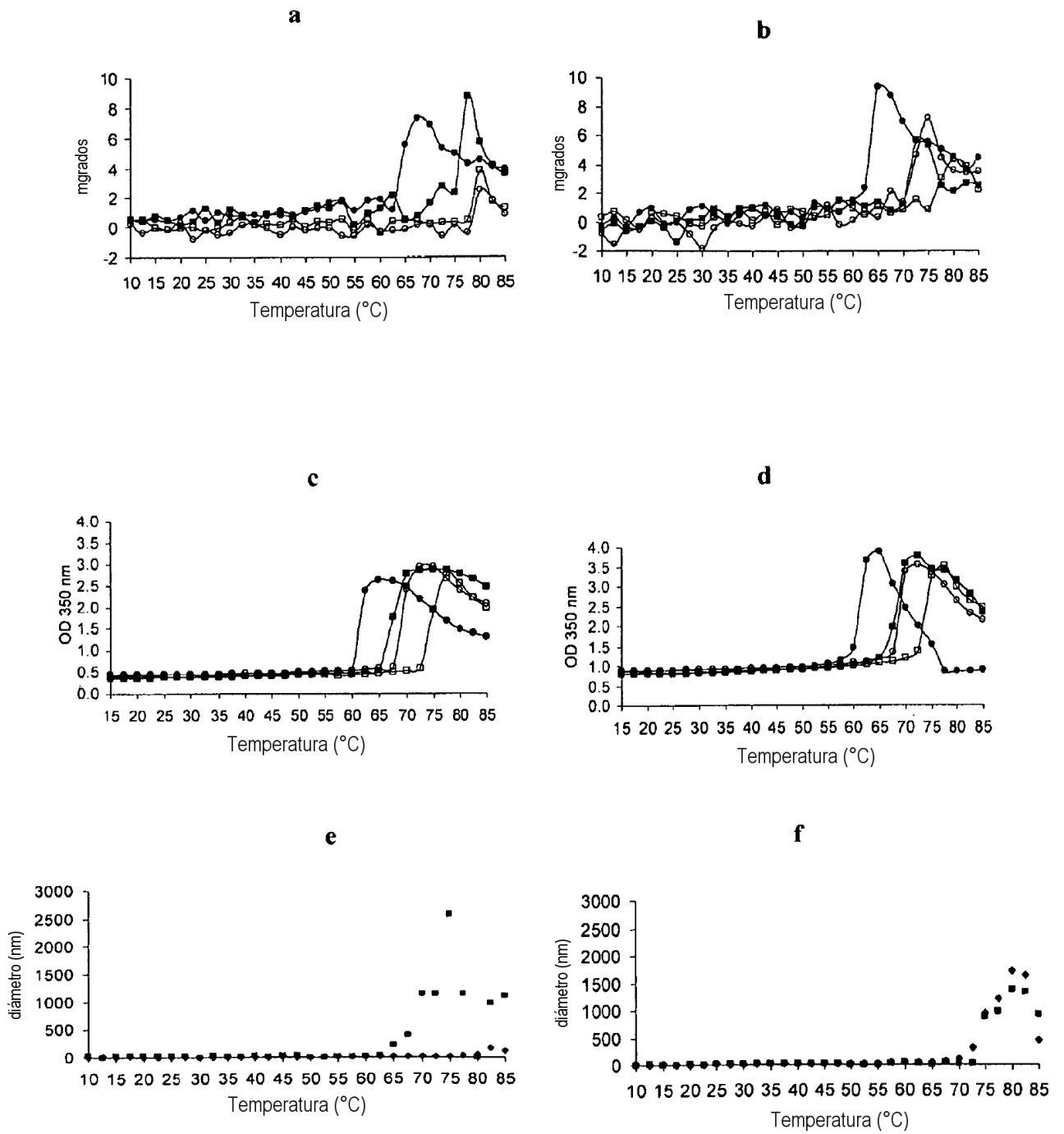


Figura 5

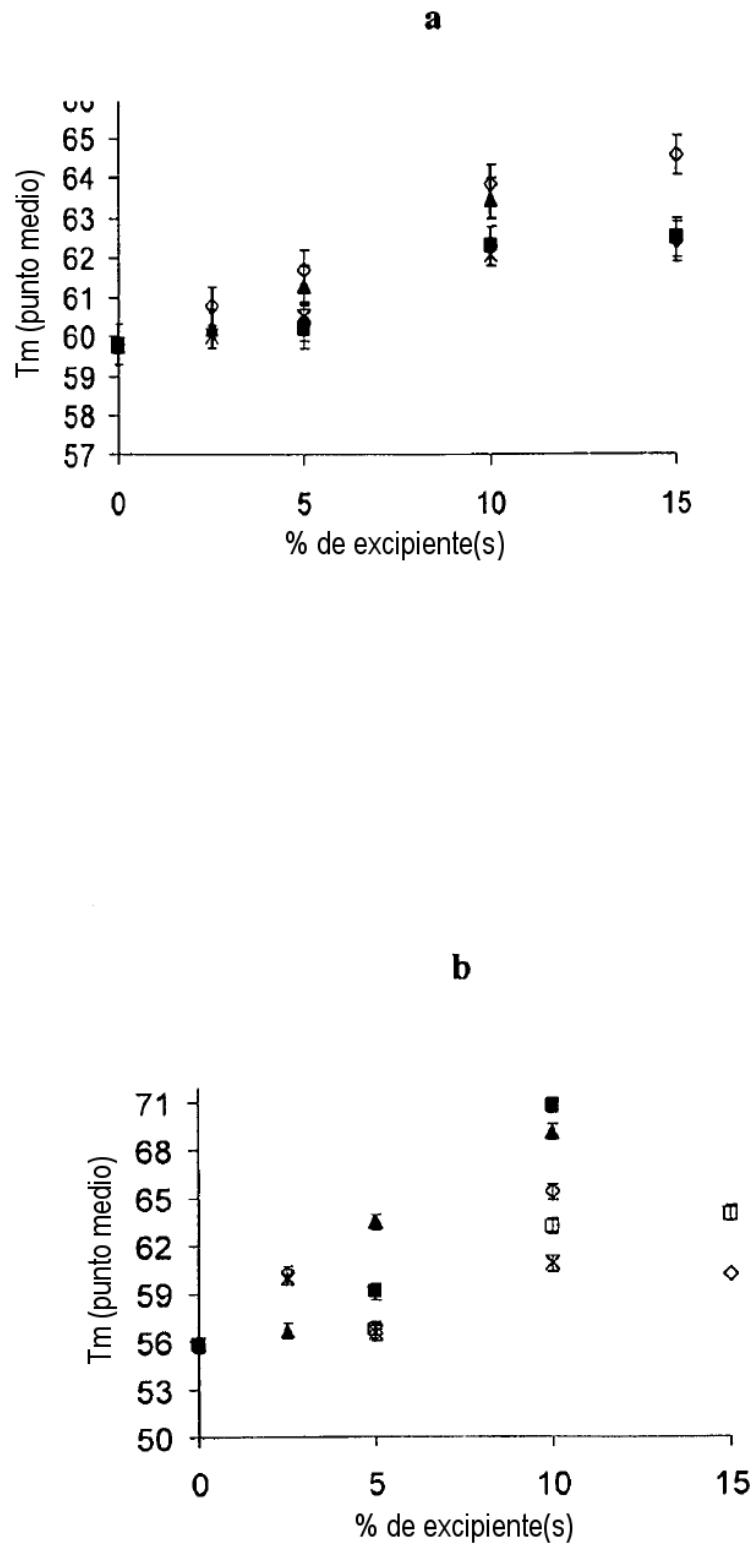


Figura 6

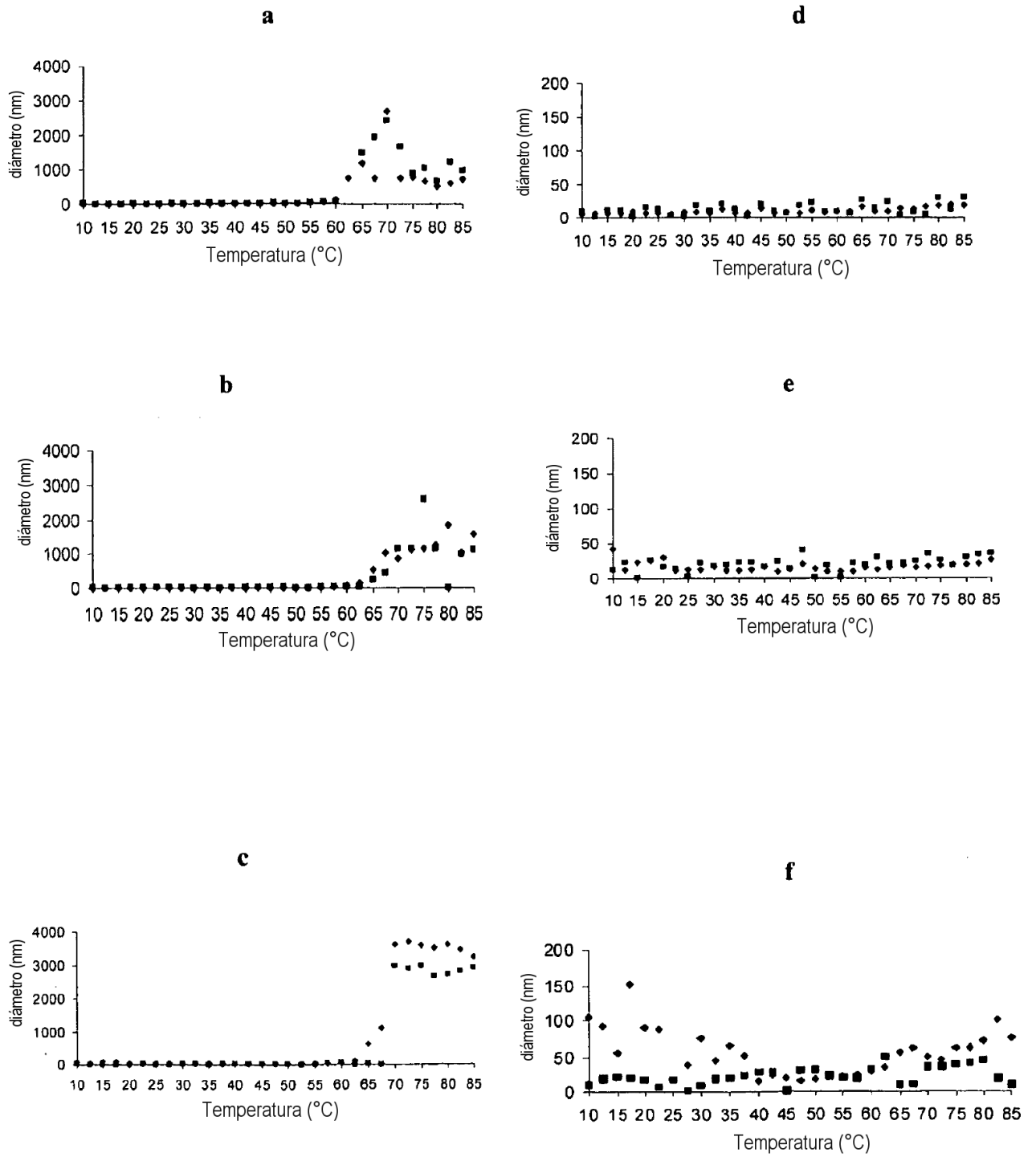


Figura 7

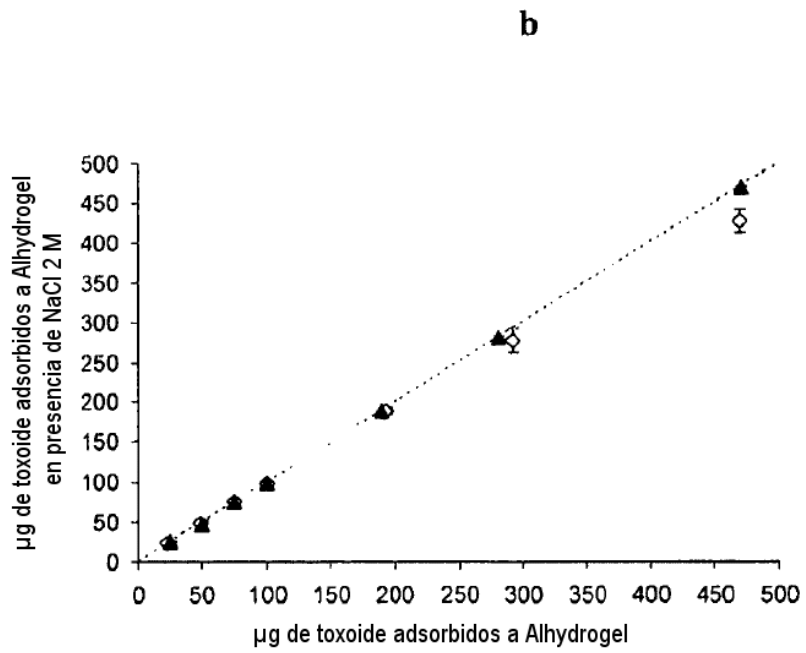
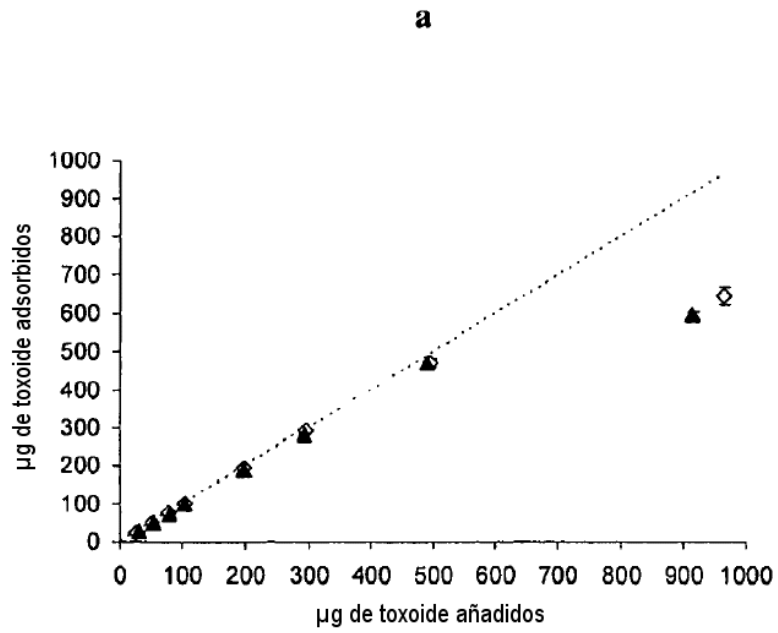
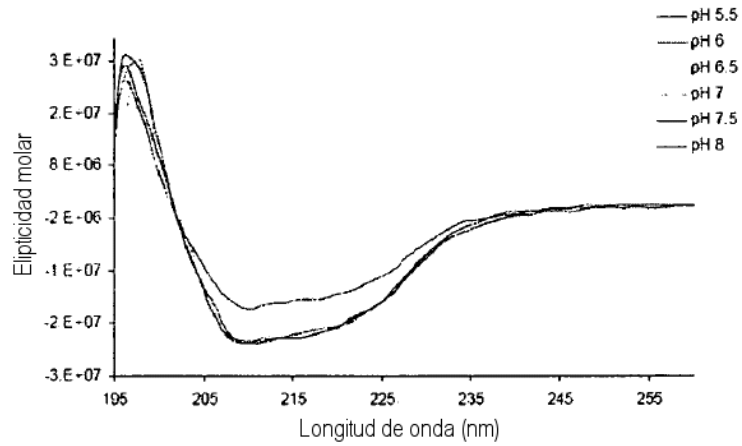


Figura 8

Figura 9

Toxoide A, CD (estructura secundaria)

---

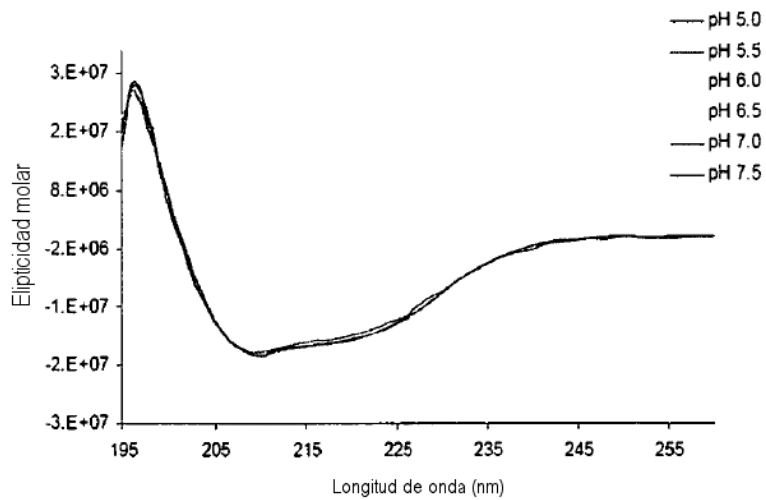


- La estructura secundaria no cambia con el pH excepto para pH 5.5.
- La estructura secundaria es compleja, donde domina la estructura helicoidal.

Figura 10

Toxoide B, CD (estructura secundaria)

---



- La estructura secundaria no cambia con el pH.
- La estructura secundaria es compleja, donde domina la estructura helicoidal.



Figura 11

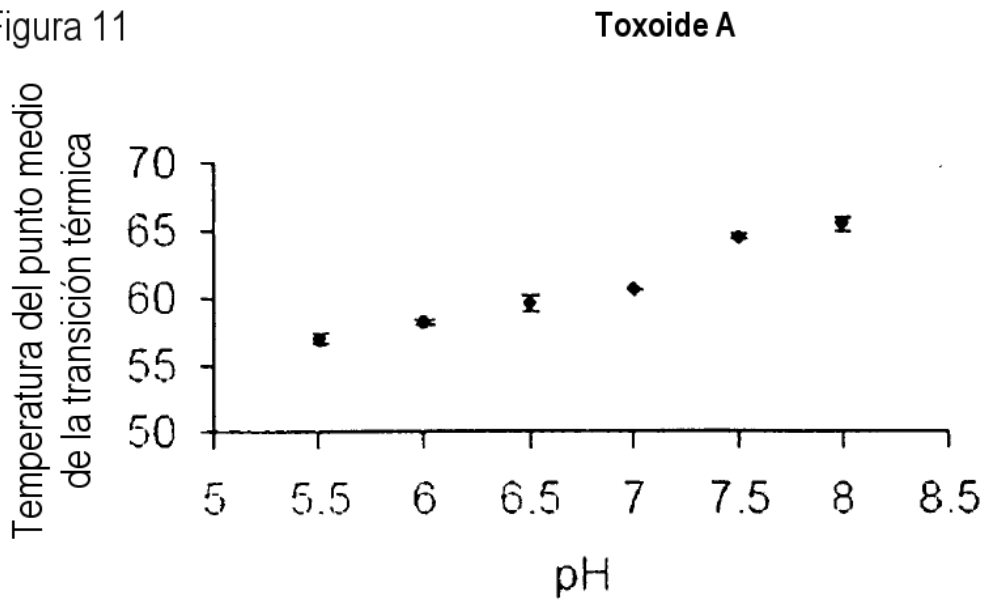


Figura 12

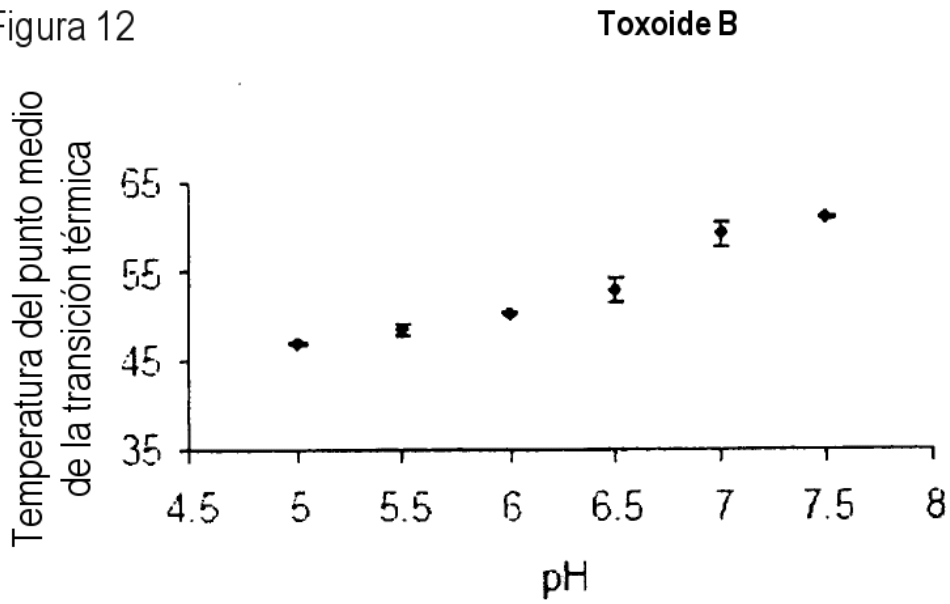


Figura 13

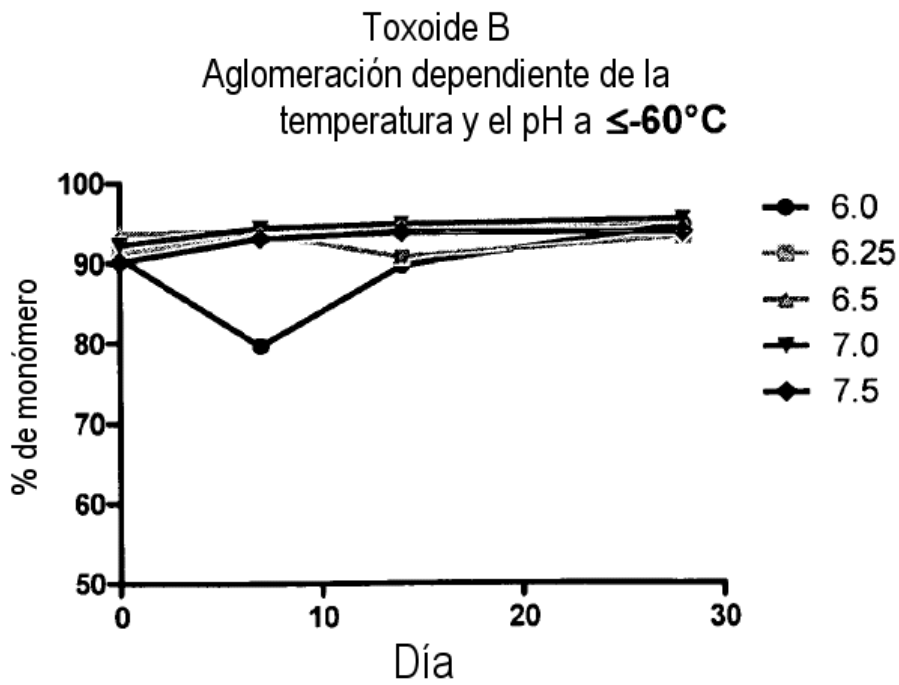
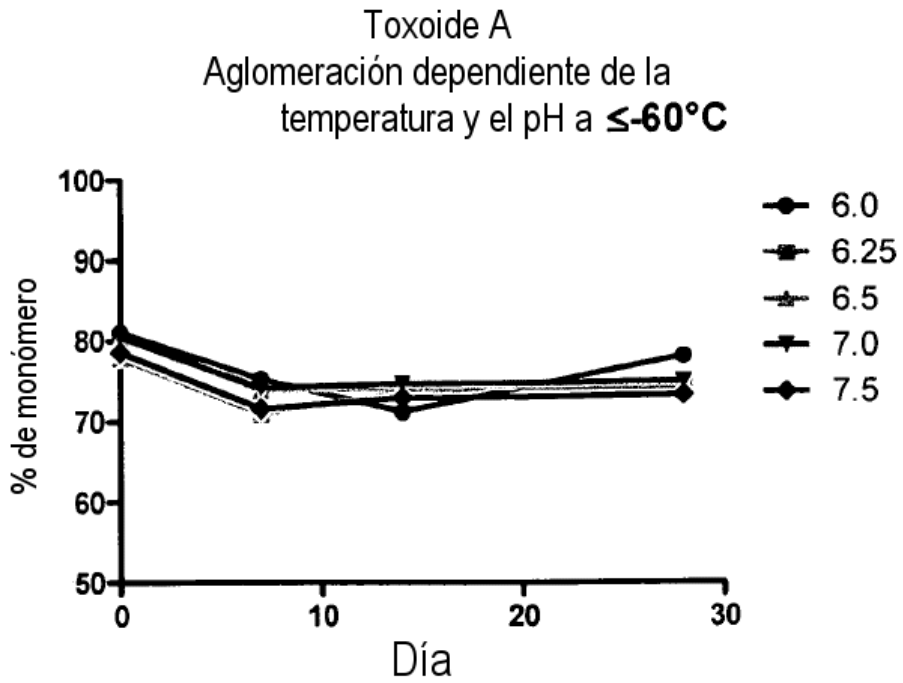


Figura 14

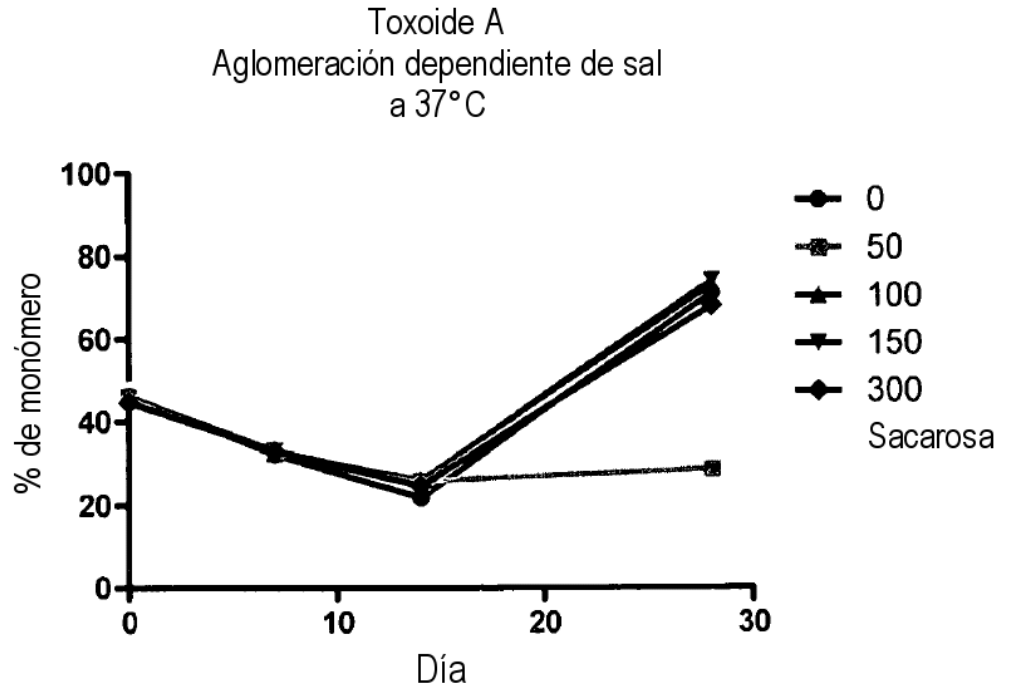


Figura 15

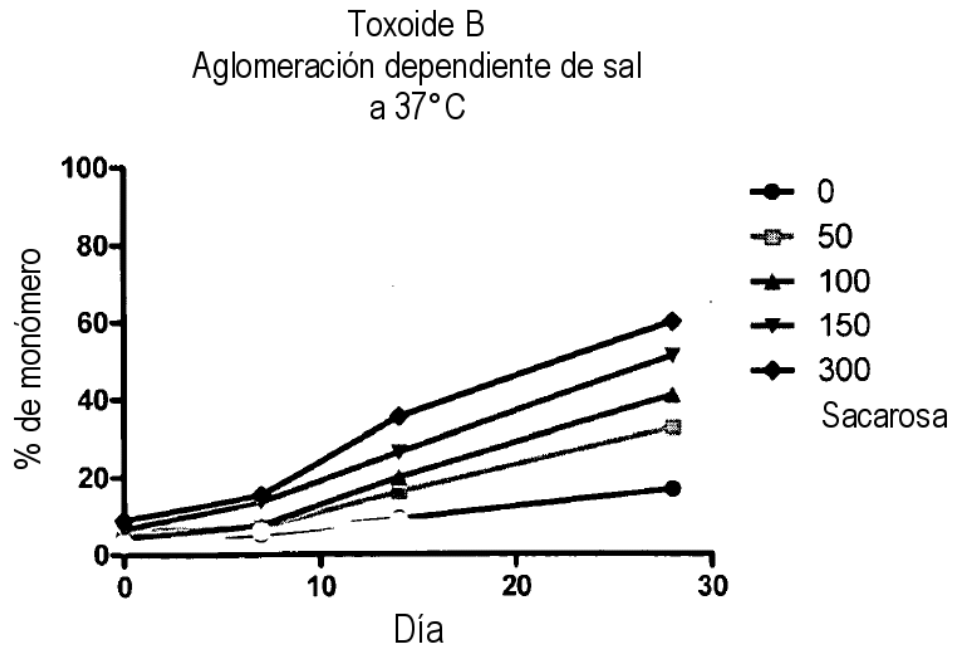


FIG. 16

