

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392771 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.12.18(51) Int. Cl. *A61K 31/702* (2006.01)  
*A61K 31/04* (2006.01)  
*C07H 17/04* (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2022.04.01

## (54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ CLOSTRIDIODES DIFFICILE

(31) 63/170,250

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.02

Киллин Кевин П., Танавастиен Энн,  
Карти Роберт Т., Финн Майкл В. (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/023029

(74) Представитель:

(87) WO 2022/212827 2022.10.06

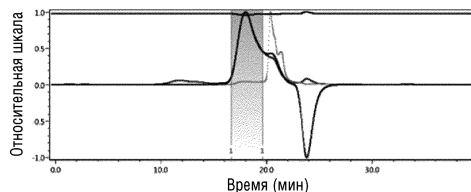
Медведев В.Н. (RU)

(88) 2022.11.10

(71) Заявитель:

МЭТРИВЭКС, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям для лечения инфекции Clostridiodes difficile.



Молярные массовые моменты (г/моль)	
Mп	8.224×10 <sup>3</sup> (±1.642%)
Mр	8.184×10 <sup>3</sup> (±0.625%)
Mv	н/п
Mw	8.228×10 <sup>3</sup> (±1.659%)
Mz	8.232×10 <sup>3</sup> (±3.727%)
Полидисперсность	
Mw/Mп	1.000 (±2.334%)
Mz/Mп	1.001 (±4.072%)
скв моменты радиуса (нм)	
п	3.4 (±455.6%)
р	4.1 (±317.8%)
z	4.7 (±243.6%)

Колонка Yaiga 3u SEC 2000  
Скорость потока: 0.5 мл/мин PBS  
Средняя молярная масса: 8228 дальтон  
Полидисперсность (Mw/Mn) = 1.00

202392771

A1

A1

202392771

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579390EA/23

### СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 63/170250, поданной 2 апреля 2021 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

#### СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Копия в формате ASCII, созданная 1 апреля 2022 г., носит название 51744-701.601\_SL.txt и имеет размер 114688 байт.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Инфекция *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*) (ИКД) представляет собой симптоматическую инфекцию, вызываемую спорообразующей бактерией *C. difficile*. ИКД является причиной примерно 20% случаев диареи, связанной с приемом антибиотиков, и может вызывать опасное для жизни воспаление толстой кишки. Необходимы эффективные способы индукции иммунного ответа против ИКД.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0004] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка специально и индивидуально включены посредством ссылки.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем документе раскрыта композиция, содержащая полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), который представляет собой антиген PSII, обогащенный из *C. difficile*, где композиция имеет общее процентное содержание по массе углеводов, составляющее по меньшей мере примерно 40%, и где антиген PSII, обогащенный из *C. difficile*, составляет по меньшей мере 90% от общего процентного содержания углеводов.

[0006] В настоящем документе раскрыта композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид, содержащий белок-носитель;

[0007] где белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* присутствуют в композиции в соотношении от менее примерно 10:1 до примерно 1:3. В настоящем документе раскрыта композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид, содержащий белок-носитель, полученный из организма, отличного от *C. difficile*; где белок-носитель и

полисахарид клеточной поверхности присутствуют в композиции в соотношении от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0008]** В настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) первый полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где фармацевтическая композиция имеет общее процентное содержание углеводов, в котором по меньшей мере примерно 90% общего процентного содержания углеводов составляет PSII.

**[0009]** В настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) первый полипептид, содержащий первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид, содержащий второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, не конъюгирован с первым полипептидом или вторым полипептидом.

**[0010]** В настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид или полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент, который представляет собой инактивированный токсин; где фармацевтическая композиция содержит менее примерно 5% по массе белка *C. difficile*, отличного от инактивированного токсина *C. difficile*.

**[0011]** В настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) первый полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент, и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где первый анатоксин представляет собой полноразмерный анатоксин токсина А и второй анатоксин представляет собой полноразмерный анатоксин токсина В.

**[0012]** В настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид или полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый инактивированный токсин *C. difficile* или его фрагмент, где фармацевтическая композиция содержит менее примерно 5% по массе белка *C. difficile*, отличного от инактивированного токсина *C. difficile*. В настоящем документе также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая полисахарид клеточной поверхности

*Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), конъюгированный с белком-носителем; где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем химическим линкером, содержащим от 1 до 10 атомов углерода.

**[0013]** В настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая: (a) полисахарид клеточной поверхности из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), конъюгированный с белком-носителем; (b) первый полипептид, содержащий первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид, содержащий второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где полисахарид клеточной поверхности из *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем химическим линкером, содержащим тиосукцинимид или тиозфир.

**[0014]** В настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, состоящая в основном из: (a) полисахарида клеточной поверхности из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), конъюгированного с фармацевтически приемлемым носителем; (b) первого полипептида или первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второго полипептида или второго полинуклеотида, кодирующего второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) адъюванта.

**[0015]** В настоящем документе раскрыт способ лечения, предотвращения или подавления проявлений или симптомов инфекции, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, который нуждается в этом.

**[0016]** В настоящем документе раскрыт способ лечения инфекции, включающий: (a) введение терапевтически эффективного количества композиции или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, который нуждается в этом; где инфекция представляет собой инфекцию *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) после введения фармацевтической композиции сбор образца фекалий у субъекта; и (c) анализ образца фекалий и определение изменения количества колониеобразующих единиц (КОЕ)/мг *C. difficile* в фекалиях в качестве маркера инфекции.

**[0017]** В настоящем документе раскрыт способ лечения инфекции, включающий введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, где полипептид содержит анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; где введение выполняют еженедельно или раз в две недели, и где инфекция вызвана *C. difficile*.

**[0018]** В настоящем документе раскрыт способ, включающий: (a) выбор субъекта из группы, состоящей из: (i) первого субъекта, который старше 55 лет; (ii) второго субъекта, который в анамнезе перенес инфекцию *C. difficile* в пределах 6-месячного периода; и (iii) третьего субъекта, который имеет положительное количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мг *C. difficile*; и (b) введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *C.*

*difficile* и полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, где полипептид содержит анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

**[0019]** В настоящем документе раскрыт способ лечения инфекции, включающий (а) получение информации о генетической последовательности биологического образца, полученного от субъекта, для определения наличия инфекции, где инфекция представляет собой инфекцию *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (б) введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0020]** В настоящем документе раскрыт способ лечения инфекции, включающий введение субъекту, который нуждается в этом: (а) терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению; и (б) терапевтического средства; где инфекция вызвана *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*).

**[0021]** В настоящем документе раскрыт способ лечения инфекции, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), где введение вызывает увеличение количества иммуноглобулина М (IgM), специфичного к полисахариду клеточной поверхности, по меньшей мере примерно в 250 раз в сравнении с отсутствием фармацевтической композиции.

**[0022]** В настоящем документе раскрыт способ обогащения по полисахариду клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), включающий: (а) получение экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*, и (б) обогащение по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* из ЭКП, с получением в результате обогащенного по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образца; где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образец содержит менее примерно 5% по массе примесей *C. difficile*.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

**[0023]** На **ФИГ. 1** представлены результаты анализа методом ЭХ-МУЛС PSII, очищенного описанным способом и с соответствующими параметрами.

**[0024]** На **ФИГ. 2** представлен обзор химических схем TEMPO, CDAP и аминоксиконъюгации, а также получаемых «решетчатых» и «звездчатых» структур конъюгатов.

**[0025]** На **ФИГ. 3**, верхней панели, представлена кривая ЭХ-МУЛС для конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, синтезированного методом TEMPO/EDC химии. На нижней панели представлена сводка аналитических параметров конъюгата TEMPO/EDC/PSII-CRM<sub>197</sub>.

**[0026]** На **ФИГ. 4**, верхних панелях, представлены кривые поглощения при 280 нм (A<sub>280</sub>) конъюгата CRM-малеимида и PSII-CRM<sub>197</sub>, синтезированного методом CDAP-химии и разделенного методом ЭХ-ВЭЖХ. На средней панели представлена кривая ЭХ-МУЛС конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, полученного методом CDAP, и соответствующая определенная молекулярная масса (MW) компонентов. На нижней панели представлены параметры ЭХ-МУЛС, используемые для анализа конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, полученного методом CDAP.

[0027] На **ФИГ. 5**, панели А, представлен конъюгат PSII-CRM<sub>197</sub>, синтезированный методом химии концевого тиола, и кривые поглощения при А280 CRM-малеимида после разделения методом ЭХ. На панели В представлена кривая ЭХ-МУЛС для PSII-CRM. На панели С представлены аналитические параметры анализа ЭХ-МУЛС, OD280 (А280) и анализа с резорцином.

[0028] На **ФИГ. 6** показаны стадии снятия поверхностного слоя с клеток *C. difficile* с использованием дезоксихолата натрия (DOC) для очистки PSII.

[0029] На **ФИГ. 7** показана процедура стадии экстракции 20% этанолом при очистке PSII.

[0030] На **ФИГ. 8** показана процедура первого осаждения ТХУ экстрагированного 20% этанолом материала при очистке PSII.

[0031] На **ФИГ. 9** показана процедура ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ 1) PSII после первого осаждения ТХУ и добавления сульфата аммония в препарат для стадии хроматографии гидрофобного взаимодействия на колонке с фенил-сефарозой.

[0032] На **ФИГ. 10** показана процедура нанесения материала после УФ/ДФ 1 на колонку с фенил-сефарозой и сбора проточной и промывочной фракций.

[0033] На **ФИГ. 11** показана процедура второй стадии УФ/ДФ (УФ/ДФ-2) объединенных фракций с колонки с фенил-сефарозой при подготовке для разделения методом анионообменной хроматографии на колонке с Q-сефарозой.

[0034] На **ФИГ. 12** показана процедура нанесения материала после УФ/ДФ-2 на колонку с Q-сефарозой и элюирования PSII с использованием 10 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 300 мМ NaCl (15% буфера В).

[0035] На **ФИГ. 13** показана процедура второго осаждения ТХУ элюата с колонки с Q-сефарозой.

[0036] На **ФИГ. 14** показана процедура ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ-3) PSII после второго осаждения ТХУ в воде.

[0037] На **ФИГ. 15** показана процедура концентрирования материала после УФ/ДФ-3 на центробежном фильтре с порогом отсечения по MW 3 кДа.

[0038] На **ФИГ. 16** показана общая схема профилактической иммунизации и заражения в мышинной модели ИКД.

[0039] На **ФИГ. 17**, панели А, показана временная шкала заражения спорами, график иммунизации и моменты времени сбора фекалий для отдельных образцов фекалий. На панели В показан прирост *C. difficile* после терапевтической иммунизации, нормализованный на исходный уровень КОЕ в день 0 до иммунизации.

[0040] На **ФИГ. 18** показан прирост *C. difficile* в % от исходного уровня КОЕ в день 0.

[0041] На **ФИГ. 19**, панели А, представлен график иммунизации, используемый для получения анти-PSII IgG. На панели В показана колонизация фекалий (КОЕ/мг фекалий), определенная через 2 недели после первой иммунизации в день 14.

[0042] На **ФИГ. 20** показано, что профилактическая иммунизация конъюгатом PSII-

CRM<sub>197</sub> защищает мышей от снижения массы тела и симптомов при введении только PSII, конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> и контрольного PBS.

[0043] На **ФИГ. 21A-D** представлены полученные методом ЭХ-МУЛС данные хроматографического анализа трех вариантов конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub>, связанных концами. На **ФИГ. 21A** представлены полученные методом ЭХ-МУЛС хроматографические данные конъюгата 3хPSII-CRM<sub>197</sub>. На **ФИГ. 21B** представлены полученные методом ЭХ-МУЛС хроматографические данные конъюгата 6хPSII-CRM<sub>197</sub>. На **ФИГ. 21C** представлены полученные методом ЭХ-МУЛС хроматографические данные конъюгата 10хPSII-CRM<sub>197</sub>. На **ФИГ. 21D** представлены полученные методом ЭХ-МУЛС хроматографические данные конъюгатов 3х, 6х и 10х PSII-CRM<sub>197</sub>.

[0044] На **ФИГ. 22** показана защита от ИКД после иммунизации конъюгатом PSII-CRM<sub>197</sub> с анатоксинами А и В и без них.

[0045] На **ФИГ. 23A** представлены данные по зависимости молярной массы от объема (мл) для связанного концами конъюгата 6хPSII-CRM<sub>197</sub>. На **ФИГ. 23B** приведено сравнение массы конъюгата, массы CRM<sub>197</sub> и массы PSII образца.

[0046] На **ФИГ. 24** представлен репрезентативный анализ структуры (6хPSII-CRM) с сигналом конъюгата PSII в момент времени 30 мин, а также пиками PSII и тиол-PSII в момент времени примерно 38 мин.

[0047] На **ФИГ. 25A-25D** представлены результаты конечного анализа методом ЭХ-МУЛС с подробным указанием компонентов белка CRM<sub>197</sub> и PSII в сигналах конъюгата, а также анализа с объединенными компонентами.

[0048] На **ФИГ. 26** представлено среднее геометрическое значение снижения массы тела после профилактической иммунизации и заражения спорами у мышей, получавших связанный концами конъюгат PSII-CRM<sub>197</sub>; CDAP-конъюгат PSII-CRM<sub>197</sub> и носитель.

[0049] На **ФИГ. 27A-27D** показано связанное с ИКД снижение массы тела после заражения спорами *C. difficile*. На **ФИГ. 27A** показано снижение массы тела после ИКД у мышей; на **ФИГ. 27B** показаны процентные изменения массы тела в сравнении с днем 0 заражения спорами у мышей, получавших 3:1 PSII:CRM<sub>197</sub> в течение дней 1-14; на **ФИГ. 27C** показаны процентные изменения массы тела в сравнении с днем 0 заражения спорами у мышей, получавших 6:1 PSII:CRM<sub>197</sub> в течение дней 1-14; на **ФИГ. 27D** показаны процентные изменения массы тела в сравнении с днем 0 заражения спорами у мышей, получавших 10:1 PSII:CRM<sub>197</sub> в течение дней 1-14.

[0050] На **ФИГ. 28** представлен график исследования, используемого для определения эффектов различных адъювантов.

[0051] На **ФИГ. 29** представлено среднее геометрическое значение снижения массы тела вследствие ИКД после заражения спорами в течение первых 9 дней после инфекции.

[0052] На **ФИГ. 30** представлено среднее геометрическое значение снижения массы тела вследствие ИКД после заражения спорами в течение первых 30 дней после инфекции.

[0053] На **ФИГ. 31A-C** показаны реципрокные титры анти-TcdA в группах, получавших анатоксины А и В (AlOH); связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и

В+AlPO<sub>4</sub>; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+AlOH; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+Advax2; а также стерильный солевой раствор (AlPO<sub>4</sub>) в день 14 (ФИГ. 31А), день 27 (ФИГ. 31В) и день 41 (ФИГ. 31С). На ФИГ. 31D показаны титры анти-TcdA в анализе ELISA для групп, получавших PSII-CRM<sub>197</sub>; анатоксины А и В (AlOH); связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+AlPO<sub>4</sub>; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+AlOH; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+Advax2; а также стерильный солевой раствор (AlPO<sub>4</sub>) в течение всего исследования.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0054]** Инфекция *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*) (ИКД) представляет собой симптоматическую инфекцию, вызываемую спорообразующей бактерией *C. difficile*. ИКД распространяется бактериальными спорами, присутствующими в фекалиях. Факторы риска инфицирования включают использование антибиотиков или ингибиторов протонного насоса, госпитализацию или пожилой возраст. Диагноз ставят на основе посева стула или анализа ДНК бактерий или токсинов. Если у человека положительный результат теста на ИКД без симптомов, это состояние известно как колонизация *C. difficile*. *C. difficile* может бессимптомно колонизировать толстую кишку человека. Примерно 2-5% взрослых являются носителями, и риск колонизации связан с перенесенными в анамнезе несвязанными диарейными заболеваниями (например, злоупотреблением слабительными и пищевым отравлением вследствие сальмонеллеза или инфекции *Vibrio cholerae*). Осложнения ИКД включают псевдомембранозный колит, токсический мегаколон, перфорацию толстой кишки и сепсис. Прекращение приема антибиотиков может приводить к разрешению симптомов в течение 3 дней примерно у 20% инфицированных пациентов. Рецидивы отмечаются у 25% людей.

**[0055]** Клостридии представляют собой анаэробные подвижные бактерии, повсеместно распространенные в природе и наиболее многочисленные в почве. Клостридии имеют длинные и неправильной формы (в форме барабанной палочки или веретена) клетки с выпуклостью на концах. Клетки *C. difficile* являются грамположительными и демонстрируют оптимальный рост на кровяном агаре при температуре тела человека в отсутствие кислорода. При стрессе бактерии производят споры, способные переносить экстремальные условия, которые активные бактерии не переносят.

**[0056]** *C. difficile* передается фекально-оральным путем. Организм образует термостойкие споры, которые не уничтожаются чистящими средствами для рук на спиртовой основе или обычной очисткой поверхностей. Поверхности могут быть заражены спорами, и споры бактерий могут распространяться при контакте. Споры выживают в клинических условиях в течение длительного времени. После попадания спор в организм через ротовую полость кислотоустойчивость позволяет спорам проходить через желудок. Под воздействием желчных кислот споры прорастают и размножаются в вегетативные клетки в толстой кишке. У людей, которые в анамнезе не имели желудочно-кишечных расстройств, вызванных применением антибиотиков, или диарейных заболеваний, колонизация *C. difficile* менее вероятна.



**[0057]** Использование системных антибиотиков, включая пенициллин, цефалоспорины, фторхинолоны и клиндамицин широкого спектра действия, приводит к изменению нормальной микробиоты кишечника. Когда антибиотик убивает другие бактерии в кишечнике, оставшиеся бактерии меньше конкурируют за пространство и питательные вещества. Общий эффект приводит к более массовому росту других бактерий, таких как *C. difficile*.

**[0058]** Патогенные штаммы *C. difficile* продуцируют множество токсинов, включая энтеротоксин (токсин А), цитотоксин (токсин В) и бинарный токсин. *C. difficile* оказывает свое воздействие на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), выделяя токсины А и В, которые могут связываться с эпителием кишечника и повреждать его. И токсин А, и токсин В могут вызывать диарею и воспаление у инфицированных людей. Токсины А и В представляют собой глюкозилтрансферазы, которые направлены на членов семейства Rho ГТФаз и инактивируют их. Токсин А связан с секрецией жидкости и генерализованным воспалением в ЖК тракте. Токсин В вызывает деполимеризацию актина по механизму, коррелирующему со снижением АДФ-рибозилирования низкомолекулярных GTP-связывающих белков Rho. Токсин В считается основным фактором, определяющим вирулентность рецидивирующей ИКД, и связан с более тяжелым повреждением толстой кишки. *C. difficile* имеет третий токсин, который представляет собой бинарный токсин.

**[0059]** Симптомы включают водянистую диарею, лихорадку, тошноту и боль в животе. ИКД может вызывать тяжелое, опасное для жизни воспаление толстой кишки. ИКД составляет около 20% случаев связанной с приемом антибиотиков диареи. У взрослых значительная диарея (то есть, появление частично сформированного или водянистого стула более трех раз за 24 часа), недавний прием антибиотиков, боль в животе, лихорадка (до 40,5°C) и характерный запах стула, напоминающий конский навоз, используют в качестве инструмента клинического прогнозирования ИКД. В стационаре в качестве индикаторов ИКД используют предшествующее лечение антибиотиками, а также диарею или боль в животе. У детей наиболее распространенным симптомом ИКД является водянистая диарея с дефекацией не менее трех раз в сутки в течение двух и более дней, которая может сопровождаться лихорадкой, потерей аппетита и/или болью в животе. У пациентов с тяжелой инфекцией может развиваться воспаление толстой кишки без диареи.

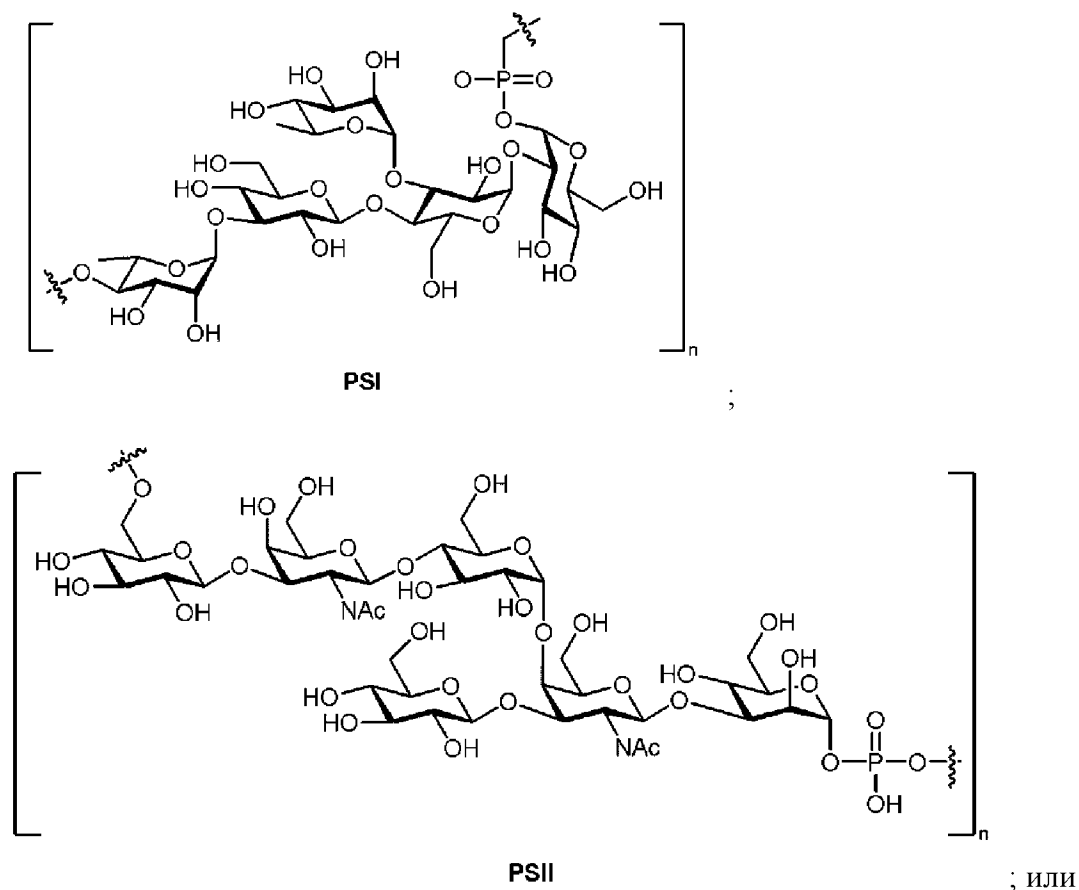
**[0060]** В некоторых вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению могут быть направлены на токсины *C. difficile* и антигены поверхности бактериальных клеток для уменьшения колонизации и рецидивов ИКД.

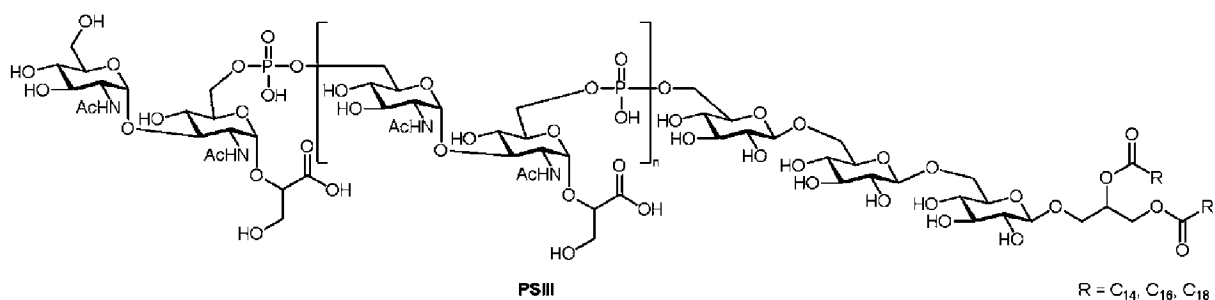
#### **Антиген**

**[0061]** Фармацевтические композиции по изобретению содержат по меньшей мере один антиген *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*. *C. difficile* экспрессирует три полисахарида, PSI, PSII и PSIII. PSI состоит из разветвленной повторяющейся пентаглицозилфосфатной единицы. PSII представляет собой полимер из повторяющихся гексаглицозилфосфатных единиц. PSII представляет собой консервативный антиген,

присутствующий на клеточной поверхности и биопленке *C. difficile*. PSII имеет структуру гексагликозильного повтора и представляет собой полимер с низкой молекулярной массой, составляющей ~ 10 кДа. PSII экспонирован на поверхности, и антитела к PSII могут быть обнаружены в образцах стула пациентов с ИКД. PSIII представляет собой липид-связанный полисахарид, состоящий из дигликозилфосфатной основной цепи с боковой цепью глицериновой кислоты и представляет собой липотейхоевую кислоту *C. difficile*.

[0062] В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* не является синтетическим. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* очищают из одного или более штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* получают из экстракта клеточной поверхности одного или более штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности представляет собой PSII. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности имеет формулу:





где n представляет собой целое число от 1 до 100, или их фармацевтически приемлемой соли.

**[0063]** Полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 100 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 50 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 25 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу примерно 5 кДа, примерно 6 кДа, примерно 7 кДа, примерно 8 кДа, примерно 9 кДа, примерно 10 кДа, примерно 11 кДа, примерно 12 кДа, примерно 13 кДа, примерно 14 кДа, примерно 15 кДа, примерно 16 кДа, примерно 17 кДа, примерно 18 кДа, примерно 19 кДа или примерно 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу примерно 5 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу примерно 8,8 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности может иметь среднюю молекулярную массу примерно 10 кДа.

**[0064]** Полисахарид клеточной поверхности по настоящему изобретению может быть очищен. Соединение по настоящему изобретению может иметь по меньшей мере 1% чистоту, по меньшей мере 2% чистоту, по меньшей мере 3% чистоту, по меньшей мере 4% чистоту, по меньшей мере 5% чистоту, по меньшей мере 6% чистоту, по меньшей мере 7% чистоту, по меньшей мере 8% чистоту, по меньшей мере 9% чистоту, по меньшей мере 10% чистоту, по меньшей мере 11% чистоту, по меньшей мере 12% чистоту, по меньшей мере 13% чистоту, по меньшей мере 14% чистоту, по меньшей мере 15% чистоту, по меньшей мере 16% чистоту, по меньшей мере 17% чистоту, по меньшей мере 18% чистоту, по меньшей мере 19% чистоту, по меньшей мере 20% чистоту, по меньшей мере 21% чистоту, по меньшей мере 22% чистоту, по меньшей мере 23% чистоту, по меньшей мере 24% чистоту, по меньшей мере 25% чистоту, по меньшей мере 26% чистоту, по меньшей мере 27% чистоту, по меньшей мере 28% чистоту, по меньшей мере 29% чистоту, по меньшей мере 30% чистоту, по меньшей мере 31% чистоту, по меньшей мере 32% чистоту, по меньшей мере 33% чистоту, по меньшей мере 34% чистоту, по меньшей мере 35% чистоту,

по меньшей мере 36% чистоту, по меньшей мере 37% чистоту, по меньшей мере 38% чистоту, по меньшей мере 39% чистоту, по меньшей мере 40% чистоту, по меньшей мере 41% чистоту, по меньшей мере 42% чистоту, по меньшей мере 43% чистоту, по меньшей мере 44% чистоту, по меньшей мере 45% чистоту, по меньшей мере 46% чистоту, по меньшей мере 47% чистоту, по меньшей мере 48% чистоту, по меньшей мере 49% чистоту, по меньшей мере 50% чистоту, по меньшей мере 51% чистоту, по меньшей мере 52% чистоту, по меньшей мере 53% чистоту, по меньшей мере 54% чистоту, по меньшей мере 55% чистоту, по меньшей мере 56% чистоту, по меньшей мере 57% чистоту, по меньшей мере 58% чистоту, по меньшей мере 59% чистоту, по меньшей мере 60% чистоту, по меньшей мере 61% чистоту, по меньшей мере 62% чистоту, по меньшей мере 63% чистоту, по меньшей мере 64% чистоту, по меньшей мере 65% чистоту, по меньшей мере 66% чистоту, по меньшей мере 67% чистоту, по меньшей мере 68% чистоту, по меньшей мере 69% чистоту, по меньшей мере 70% чистоту, по меньшей мере 71% чистоту, по меньшей мере 72% чистоту, по меньшей мере 73% чистоту, по меньшей мере 74% чистоту, по меньшей мере 75% чистоту, по меньшей мере 76% чистоту, по меньшей мере 77% чистоту, по меньшей мере 78% чистоту, по меньшей мере 79% чистоту, по меньшей мере 80% чистоту, по меньшей мере 81% чистоту, по меньшей мере 82% чистоту, по меньшей мере 83% чистоту, по меньшей мере 84% чистоту, по меньшей мере 85% чистоту, по меньшей мере 86% чистоту, по меньшей мере 87% чистоту, по меньшей мере 88% чистоту, по меньшей мере 89% чистоту, по меньшей мере 90% чистоту, по меньшей мере 91% чистоту, по меньшей мере 92% чистоту, по меньшей мере 93% чистоту, по меньшей мере 94% чистоту, по меньшей мере 95% чистоту, по меньшей мере 96% чистоту, по меньшей мере 97% чистоту, по меньшей мере 98% чистоту, по меньшей мере 99% чистоту, по меньшей мере 99,1% чистоту, по меньшей мере 99,2% чистоту, по меньшей мере 99,3% чистоту, по меньшей мере 99,4% чистоту, по меньшей мере 99,5% чистоту, по меньшей мере 99,6% чистоту, по меньшей мере 99,7% чистоту, по меньшей мере 99,8% чистоту или по меньшей мере 99,9% чистоту.

#### **Фармацевтически приемлемые соли**

[0065] По изобретению предложено применение фармацевтически приемлемых солей любого терапевтического соединения, описанного в настоящем документе. Фармацевтически приемлемые соли включают, например, соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Кислота, которую добавляют к соединению для образования соли присоединения кислоты, может представлять собой органическую кислоту или неорганическую кислоту. Основание, которое добавляют к соединению для образования соли присоединения основания, может представлять собой органическое основание или неорганическое основание. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль металла. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль аммония.

[0066] Соли металлов могут возникать в результате добавления неорганического

основания к соединению по изобретению. Неорганическое основание состоит из катиона металла в паре с основным противоионом, таким как, например, гидроксид, карбонат, бикарбонат или фосфат. Металл может представлять собой щелочной металл, щелочноземельный металл, переходный металл или металл основной группы. В некоторых вариантах осуществления металл представляет собой литий, натрий, калий, цезий, церий, магний, марганец, железо, кальций, стронций, кобальт, титан, алюминий, медь, кадмий или цинк.

**[0067]** В некоторых вариантах осуществления соль металла представляет собой соль лития, соль натрия, соль калия, соль цезия, соль церия, соль магния, соль марганца, соль железа, соль кальция, соль стронция, соль кобальта, соль титана, соль алюминия, соль меди, соль кадмия или соль цинка.

**[0068]** Соли аммония могут образовываться в результате добавления аммиака или органического амина к соединению по изобретению. В некоторых вариантах осуществления органический амин представляет собой триэтиламин, диизопропиламин, этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, морфолин, N-метилморфолин, пиперидин, N-метилпиперидин, N-этилпиперидин, дибензиламин, пиперазин, пиридин, пиразол, пипиразол, имидазол, пиразин или пипиразин.

**[0069]** В некоторых вариантах осуществления соль аммония представляет собой соль триэтиламина, соль диизопропиламина, соль этаноламина, соль диэтанолламина, соль триэтанолламина, соль морфолина, соль N-метилморфолина, соль пиперидина, соль N-метилпиперидина, соль N-этилпиперидина, соль дибензиламина, соль пиперазина, соль пиридина, соль пиразола, соль пипиразола, соль имидазола, соль пиразина или соль пипиразина.

**[0070]** Соли присоединения кислоты могут образовываться в результате присоединения кислоты к соединению по изобретению. В некоторых вариантах осуществления кислота является органической. В некоторых вариантах осуществления кислота является неорганической. В некоторых вариантах осуществления кислота представляет собой соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, иодистоводородную кислоту, азотную кислоту, азотистую кислоту, серную кислоту, сернистую кислоту, фосфорную кислоту, изоникотиновую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, винную кислоту, аскорбиновую кислоту, гентизиновую кислоту, глюконовую кислоту, глюкуроновую кислоту, сахарную кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, глутаминовую кислоту, пантотеновую кислоту, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, масляную кислоту, фумаровую кислоту, янтарную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, лимонную кислоту, щавелевую кислоту или малеиновую кислоту.

**[0071]** В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, нитрат, нитрит, сульфат, сульфит, фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, тартрат, аскорбат, гентизинат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, пантотенат, ацетат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат,

метансульфонат (мезилат), этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, цитрат, оксалат или малеат.

### **Способы очистки антигенов *C. difficile***

[0072] Полисахаридные антигены клеточной поверхности *C. difficile* вакцинных композиций по настоящему изобретению могут быть получены из инактивированных клеток или экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полисахаридные антигены вакцинных композиций по настоящему изобретению могут быть получены из инактивированных клеток *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полисахаридные антигены вакцинных композиций по настоящему изобретению могут быть получены из ЭКП *C. difficile*.

[0073] В некоторых вариантах осуществления штамм *C. difficile*, используемый для получения очищенных полисахаридных антигенов клеточной поверхности, относится к риботипу 001, 003, 027, 106, 012, 014, 036, 087 или 078. В некоторых вариантах осуществления штамм *C. difficile* может быть сконструирован для содержания повышенного количества эндогенного генного продукта. В некоторых вариантах осуществления штамм *C. difficile* может быть сконструирован для содержания пониженного количества эндогенного генного продукта. В некоторых вариантах осуществления штамм *C. difficile* может быть сконструирован для экспрессии экзогенного продукта.

[0074] Способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из 1, 2, 3, 4 или 5 штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из одного штамма *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из двух штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из трех штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из четырех штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из инактивированных клеток штамма VPI 10463 *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из инактивированных клеток штамма BI/NAP1/027 *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению позволяют получать очищенные полисахариды клеточной поверхности из инактивированных клеток штаммов VPI 10463 и BI/NAP1/027 *C. difficile*.

[0075] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения раскрыт способ обогащения по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile*, включающий: (a) получение экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile* и (b) обогащение по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* из ЭКП, с получением

в результате обогащенного по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образца; где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образец содержит менее примерно 5% по массе примесей *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой PSII.

**[0076]** В некоторых вариантах осуществления способ включает: обогащение по PSII из ЭКП, с получением в результате обогащенного по PSII образца; где обогащенный по PSII образец содержит PSII и (a) уровень примесей пептидогликана составляет менее 5% по массе пептидогликана относительно общей массы PSII; (b) уровень примесей белка составляет менее 5% по массе белка относительно общей массы PSII; или (c) уровень примеси нуклеиновых кислот составляет менее 5% по массе относительно общей массы PSII.

**[0077]** В некоторых вариантах осуществления получение включает снятие поверхностного слоя у одного или более штаммов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления обогащенный по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образец содержит менее примерно 5% по массе белка *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* выбран из группы, состоящей из PSI, PSII, PSIII, их фармацевтически приемлемых солей и их иммуногенных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* содержит фосфатный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или его иммуногенный фрагмент.

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления обогащение включает стадию осаждения этанолом. В некоторых вариантах осуществления обогащение включает одну или более стадий осаждения ТХУ. В некоторых вариантах осуществления обогащение включает стадию ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). В некоторых вариантах осуществления обогащение включает стадию ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления обогащение включает одну или более стадий осаждения ТХУ после стадии ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления обогащение включает одну или более стадий ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) после стадии осаждения ТХУ и/или после стадии ионообменной хроматографии.

**[0079]** В некоторых вариантах осуществления обогащение включает стадию фильтрации. В некоторых вариантах осуществления стадия фильтрации включает тангенциальную поточную фильтрацию или центрифугирование через фильтр с отсечкой по молекулярной массе. В некоторых вариантах осуществления фильтр имеет порог отсечки по молекулярной массе 3 кДа или менее. В некоторых вариантах осуществления фильтр имеет порог отсечки по молекулярной массе 10 кДа или более. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает лиофилизацию.

**[0080]** В некоторых вариантах осуществления обогащенный по PSII образец содержит PSII, и уровень примесей пептидогликана составляет менее 5% по массе пептидогликана относительно общей массы PSII по данным ЯМР. В некоторых вариантах

осуществления обогащенный по PSII образец содержит PSII, и уровень примесей белка составляет менее 5% по массе белка относительно общей массы PSII по данным ЯМР. В некоторых вариантах осуществления обогащенный по PSII образец содержит PSII, и уровень примесей нуклеиновой кислоты составляет менее 5% по массе нуклеиновой кислоты относительно общей массы PSII по данным ЯМР.

#### **Конъюгаты PSII-носитель**

[0081] Полисахариды клеточной поверхности *C. difficile* по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с молекулой-носителем. В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой бычий сывороточный альбумин (БСА). В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой перекрестно-реактивную молекулу, например, CRM<sub>197</sub>. В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой главный иммуностимулирующий белок (MIEP). В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой дифтерийный анатоксин. В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой столбнячный анатоксин. В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой белок, полученный из *Bordetella*. В некоторых вариантах осуществления молекула-носитель представляет собой обезвреженную форму полноразмерного токсина А и/или токсина В из *C. difficile* или не токсикогенный фрагмент токсина А и/или токсина В.

[0082] Полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* по изобретению может быть конъюгирован с молекулой-носителем посредством химической связи. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* по изобретению может быть конъюгирован с молекулой-носителем путем связывания гидроксильной группы полисахарида с молекулой-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* по изобретению может быть конъюгирован с молекулой-носителем путем связывания первичных гидроксильных групп полисахарида с молекулой-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* по изобретению может быть конъюгирован с молекулой-носителем путем связывания случайных гидроксильных групп полисахарида с молекулой-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* по изобретению может быть конъюгирован с молекулой-носителем путем связывания редуцирующего конца полисахарида с молекулой-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* по настоящему изобретению может быть конъюгирован с молекулой-носителем путем связывания карбоксильной группы полисахарида с молекулой-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* может быть модифицирован линкерами для введения функциональной группы с целью конъюгации белка-носителя.

[0083] В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности по изобретению может быть конъюгирован с гидразид-derivатизированным белком-



носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности по изобретению может быть конъюгирован с малеимид-derivатизированным белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности по изобретению может быть конъюгирован путем преобразования случайных гидроксильных групп в тиоловые группы; и конъюгации тиолированных полисахаридов с малеимид-derivатизированным белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности по изобретению может быть конъюгирован с белком-носителем путем окисления первичных гидрильных групп в карбоксильные группы; и конъюгации карбоксилированных полисахаридов с гидразид-derivатизированным белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности по изобретению может быть конъюгирован с белком-носителем путем тиолирования редуцирующего конца; и конъюгации тиолированного полисахарида с малеимид-derivатизированным белком-носителем.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления белок-носитель может быть конъюгирован более чем с одним полисахаридом клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель может быть конъюгирован с более чем одним полисахаридом клеточной поверхности в случайных участках по всему полисахариду клеточной поверхности, с образованием решетчатой структуры. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель может быть конъюгирован с более чем одним полисахаридом клеточной поверхности в положениях в местах расположения первичных гидроксильных групп по всему полисахариду клеточной поверхности, с образованием решетчатой структуры. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель может быть конъюгирован с более чем одним полисахаридом клеточной поверхности на редуцирующем конце каждого полисахаридного фрагмента клеточной поверхности, с образованием звездчатой структуры (например, один белок-носитель в центре с множеством полисахаридных цепей, выступающих наружу).

**[0085]** В некоторых вариантах осуществления белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности могут быть конъюгированы при соотношении белок-носитель:полисахарид клеточной поверхности, составляющем от примерно 10:1 до примерно 5:1, от примерно 5:1 до примерно 1:1, от примерно 1:1 до примерно 1:5, от примерно 1:5 до примерно 1:10. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности могут быть конъюгированы при соотношении белок-носитель:полисахарид клеточной поверхности, составляющем от примерно 8:1 до примерно 5:1. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности могут быть конъюгированы при соотношении белок-носитель:полисахарид клеточной поверхности, составляющем от примерно 5:1 до примерно 3:1. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности могут быть конъюгированы при соотношении белок-носитель:полисахарид клеточной поверхности, составляющем от примерно 1:5 до примерно 1:7. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель и полисахарид



соотношении белок-носитель:полисахарид клеточной поверхности, составляющем примерно 1:10.

### Токсины

**[0088]** Патогенные штаммы *C. difficile* продуцируют множество токсинов, включая энтеротоксин (токсин А; TcdA) и цитотоксин (токсин В; TcdB). И токсин А, и токсин В могут вызывать диарею и воспаление у инфицированных людей. Токсины А и В представляют собой глюкозилтрансферазы, которые направлены на членов семейства Rho ГТФаз и инактивируют их. Токсин В вызывает деполимеризацию актина по механизму, коррелирующему со снижением АДФ-рибозилирования низкомолекулярных GTP-связывающих белков Rho. *C. difficile* имеет третий токсин, который является бинарным.

**[0089]** Токсин А, также известный как TcdA, связан с секрецией жидкости и генерализованным воспалением в ЖК тракте. Токсин В, также известный как TcdB, считается основным фактором, определяющим вирулентность при рецидивирующей ИКД, и связан с более тяжелым повреждением толстой кишки. Токсин В имеет две изоформы: токсин В из исторических или не гипервирулентных штаммов (токсин В<sub>HIST</sub>), таких как VPI 10463 (TcdB1); и токсин В из гипервирулентных штаммов (токсин В<sub>HV</sub>), таких как VI/NAP1/027 (TcdB2). В гипервирулентных штаммах токсин В<sub>HV</sub> примерно в 10 раз более цитотоксичен в клеточных анализах и по меньшей мере в 4 раза более летален при введении токсина модельным мышам, чем токсин В<sub>HIST</sub>. Повышенная токсичность токсина В<sub>HV</sub> обусловлена различиями в аминокислотной последовательности С-концевой области (то есть, на участке аминокислот от положения 1651 до С-концевого положения 2366).

**[0090]** В Таблице 1 приведен список штаммов *C. difficile* по риботипам с указанием экспрессируемых токсинов.

**ТАБЛИЦА 1**

Риботип	Токсин А/В	Бинарный токсин	Риботип	Токсин А/В	Бинарный токсин
001	+/+	-	039	-/-	-
002	+/+	-	045	+/+	-
003	+/+	-	046	+/+	-
005	+/+	-	049	+/+	-
009	-/-	-	053/163	+/+	-
010	-/-	-	072	+/+	-
011	+/+	-	075	+/+	+
012	+/+	-	078/126	+/+	-
013	+/+	-	085	-/-	-
014	+/+	-	087	+/+	-
015	+/+	-	104	+/+	-

017	-/+	-
018	+/+	-
020	+/+	-
023	+/+	+
027	+/+	+
029	+/+	-
033	-/-	+
035	-/-	-
038	-/-	

106	+/+	
128	-/-	-
150	+/+	-
161	+/+	-
162	+/+	-
164	-/-	-
165	+/+	-
166	-/-	-

**[0091]** Токсины, используемые в вакцинных композициях по изобретению, могут вызывать продуцирование антител, которые нейтрализуют токсин А или токсин В у иммунизированного субъекта. Вакцинные композиции по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид, содержащий анатоксин или нетоксичный иммуногенный полипептидный фрагмент токсина *C. difficile*, который может вызывать продуцирование защитных антител, связывающих по меньшей мере одним токсин *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению содержит токсин А или его нетоксичный иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению содержит токсин В или его нетоксичный иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению содержит токсин А или нетоксичный иммуногенный фрагмент токсина А; и токсин В или нетоксичный иммуногенный фрагмент токсина В. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может вызывать продуцирование защитных антител, связывающих токсин А *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может вызывать продуцирование защитных антител, связывающих токсин В *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может вызывать продуцирование защитных антител, связывающих токсин А и токсин В *C. difficile*.

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления полипептид токсина *C. difficile* может представлять собой полноразмерный токсин А или полноразмерный токсин В, который нетоксичен, но сохраняет иммуногенные свойства, достаточные для индукции гуморального ответа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления полипептид токсина *C. difficile* по изобретению можно обрабатывать (например, обрабатывать формальдегидом) для получения нетоксичной формы полипептида токсина.

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления полипептид вакцинной композиции может представлять собой полноразмерный токсин А *C. difficile* или полноразмерный токсин В *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полипептид вакцинной композиции может представлять собой обезвреженную форму полноразмерного токсина А *C. difficile* или полноразмерный токсин В *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления

полипептид вакцинной композиции может представлять собой полноразмерный токсин *A C. difficile* или обезвреженную форму полноразмерного токсина *B C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полипептид вакцинной композиции может представлять собой обезвреженную форму полноразмерного токсина *A C. difficile* или обезвреженную форму полноразмерного токсина *B C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция может содержать полноразмерный токсин *A C. difficile* и полноразмерный токсин *B C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полноразмерный токсин *A C. difficile* или полноразмерный токсин *B C. difficile* может быть обработан химическим веществом для получения нетоксичного фрагмента токсина А или токсина В, который сохраняет иммуногенность. В некоторых вариантах осуществления полноразмерный токсин *A C. difficile* или полноразмерный токсин *B C. difficile* может быть обработан формальдегидом для получения нетоксичного фрагмента токсина А или токсина В, который сохраняет иммуногенность. В некоторых вариантах осуществления нетоксичный фрагмент токсина А или токсина В представляет собой фрагмент, лишенный глюкозилтрансферазной активности, закодированной на N-конце токсина.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления полипептиды на по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% идентичны токсину А или токсину В, например, SEQ ID NO: 1-40.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления полипептиды получают из C-концевого домена токсина *B C. difficile*, который содержит комбинированные повторяющиеся олигопептиды (CROP). В некоторых вариантах осуществления полипептид *C. difficile* содержит TcdA<sub>1649-2710</sub> токсина А. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере примерно на 75% идентичен любой из SEQ ID NO: 4-6. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере примерно на 85% идентичен любой из SEQ ID NO: 4-6. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере примерно на 90% идентичен любой из SEQ ID NO: 4-6. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере примерно на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 4-6. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере примерно на 98% идентичен любой из SEQ ID NO: 4-6.

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит все 716 C-концевых аминокислот токсина *B C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит часть 716 C-концевых аминокислот токсина *B C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит TcdB<sub>1651-2366</sub> из гипервирулентного штамма VI/NAP1/027 *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит область CROP из TcdB<sub>1834-2366</sub>. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит область CROP из TcdA<sub>1832-2710</sub>.

[0097] В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептидный фрагмент содержит часть токсина В, которая является эпитопом антитела против токсина В. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, содержащий эпитоп антитела против токсина В, представляет собой любую из SEQ ID NO: 7-38. В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептид содержит аминокислоты 2152-2341 токсина В из штамма 10463 (SEQ ID NO: 39). В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептидный фрагмент содержит аминокислоты 2152-2341 токсина В из штамма VI/NAP1/027 (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит фрагмент TcdB, имеющий по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% идентичности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит фрагмент TcdB, имеющий по меньшей мере примерно 75% идентичности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит фрагмент TcdB, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит фрагмент TcdB, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере примерно на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 1-3 или 7-40. В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере примерно на 98% идентичен любой из SEQ ID NO: 1-3 или 7-40. В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептид, содержащий TcdA, TcdB или их фрагмент, обезвреживаются путем мутации одного или более из: глюкозилтрансферазы, сериновой протеазы или домена доставки.

[0098] В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептидный фрагмент токсина *A. C. difficile* связывается с актоксумабом. В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептидный фрагмент токсина *A. C. difficile* связывается с актоксумабом в двух сайтах внутри домена CROP токсина А: аминокислотах 2162-2189 и 2410-2437. В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептидный фрагмент токсина В *C. difficile* связывается с безлотоксумабом. В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептидный фрагмент токсина В *C. difficile* связывается с безлотоксумабом в двух сайтах домена CROP TcdB штамма VPI 10463 *C. difficile*, охватывающих два фрагмента CROP: E1 (прерывистый эпитоп в пределах аминокислот 1806-1961) и E2 (прерывистый эпитоп в пределах аминокислот 2007-2093).

[0099] В некоторых вариантах осуществления нетоксичный фрагмент полипептида *C. difficile* по изобретению может быть получен из одного или более штаммов, выбранных из группы, состоящей из *C. difficile* риботипов 001, 003, 027, 106, 012, 014, 036, 087 или 078. В некоторых вариантах осуществления полипептид токсина *C. difficile* происходит из гипервирулентного штамма *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления фрагмент

полипептида *C. difficile* происходит из токсина В штамма BI/NAP1/027 *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления нетоксичный фрагмент токсина В имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

[0100] В Таблице 2 приведен список аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-40.

**ТАБЛИЦА 2**

SEQ ID NO:	Последовательность			
1 <sup>a</sup>	MSLVNRKQLE	KMANVRFRTQ	EDEYVAILDA	LEEYHNMSEN
	TVVEKYLKLK			
	DINSLTDIYI	DTYKKSGRNK	ALKKFKEYLV	TEVLELKNNN
	LTPVEKNLHF			
	VWIGGQINDT	AINYINQWKD	VNSDYNVNVF	YDSNAFLINT
	LKKTVVESAI			
	NDTLESFREN	LNDPRFDYNK	FFRKRMEIYY	DKQKNFINYY
	KAQREENPEL			
	IIDDIVKTYL	SNEYSKEIDE	LNTYIEESLN	KITQNSGNDV
	RNFEEFKNGE			
	SFNLYEQELV	ERWNLAAASD	ILRISALKEI	GGMYLDVDMML
	PGIQPDLFES			
	IEKPSSVTVD	FWEMTKLEAI	MKYKEYIPEY	TSEHFDMLDE
	EVQSSFESVL			
	ASKSDKSEIF	SSLGDMEASP	LEVKIAFNSK	GIINQGLISV
	KDSYCSNLIV			
	KQIENRYKIL	NNSLNPAISE	DNDFNTTNT	FIDSIMAEAN
	ADNGRFMMEL			
	GKYLRVGFFP	DVKTTINLSG	PEAYAAAYQD	LLMFKEGSMN
	IHLIEADLRN			
FEISKTNISQ	STEQEMASLW	SFDDARAKAQ	FEEYKRNYFE	
GSLGEDDNLD				
FSQNIVVDKE	YLLEKISSLA	RSSERGYIHY	IVQLQGDKIS	
YEAACNLFAK				
TPYDSVLFQK	NIEDSEIAYY	YNPGDGEIQE	IDKYKIPSII	
SDRPKIKLTF				
IGHGKDEFNT	DIFAGFDVDS	LSTEIEAAID	LAKEDISPXS	
IEINLLGCNM				
FSYSINVEET	YPGKLLLVK	DKISELMPSI	SQDSIIVSAN	
QYEVRLINSEG				
RRELLDHSGE	WINKEESIIK	DISSKEYISF	NPKENKITVK	
SKNLPELSTL				
LQEIRNNSNS	SDIELEEKVM	LTECEINVIS	NIDTQIVEER	
IEEAKNLTSD				
SINYIKDEFK	LIESISDALC	DLKQQNELED	SHFISFEDIS	
ETDEGFSIRF				

INKETGESIF VETEKTI	SE	YANHIT	EEIS	KIKGTIFDTV	NGKLVKKVNL
DTTHEVNTLN	AAFFIQSLIE	YNSSKESLSN	LSVAMKVQVY		
AQLFSTGLNT					
ITDAAKVVEL	VSTALDETID	LLPTLSEGLP	IIATIIDGVS	LGAAIKELSE	
TSDPLL	RQEI	EAKIGIMAVN	LTTATTAIT	SSLGIASGFS	ILLVPLAGIS
AGIPSLVNE	LVL	RDKATKV	VDYFKHVSLV	ETEGVFTLLD	
DKIMMPQDDL					
VISEIDFNNN	SIVLGKCEIW	RMEGGSGHTV	TDDIDHFFSA		
PSITYREPHL					
SIYDVLEVQK	EELDLSKDLM	VLPNAPNRVF	AWETGWTPGL		
RSLENDGTKL					
LDRIRDNYEG	EFYWRYFAFI	ADALITTLKP	RYEDTNIRIN	LDSNTRSFIV	
PIITTEYIRE	KLSYSFYGSG	GTYALSLSQY	NMGINIELSE	SDVWIIDVDN	
VVRDVTIESD	KIKKGD	LIEG	ILSTLSIEEN	KIILNSHEIN	FSGEVNGSNG
FVSLTFSILE	GINAII	EVDL	LSKSYKLLIS	GELKILMLNS	NHIQQKIDYI
GFNSELQKNI	PYSFVDSE	SEK	ENGFINGSTK	EGLFVSELPD	
VVLISKVYMD					
DSKPSFGYYS	NNLKDV	KVIT	KDNVNIL	TGY	YLKDDIKISL
SLTLQDEKTI					
KLNSVHLDES	GVAEIL	KFMN	RKGNTNTSDS	LMSFLESMNI	
KSIFVNFLQS					
NIKFILDANF	IISGTT	SIGQ	FEFICDENDN	IQPYFIKFNT	LETNYTLYVG
NRQNMIVEPN	YDLDDSGDIS	STVINFSQKY	LYGIDSCVNK		
VVISPNYTD					
EINITPVYET	NNTYPEVIVL	DANYINEKIN	VNINDLSIRY		
VWSNDGNDFI					
LMSTSEENKV	SQVKIRFVNV	FKDKTLANKL	SFNFS	SDKQDV	
PVSEIILSFT					
PSYYEDGLIG	YDLGLVSLYN	EKFYINNFGM	MVSGLIYIND		
SLYYFKPPVN					
NLITGFVTVG	DDKYYFNPIN	GGAASIGETI	IDDKNYFFNQ		
SGVLQTVGFS					
TEDGFKYFAP	ANTLDENLEG	EADFTGKLI	IDENIYYFDD		
NYRGAVEWKE					
LDGEMHYFSP	ETGKAFKGLN	QIGDYKYYFN	SDGVMQKGFV		



	SINDNKHYFD			
	DSGVMKVGYT	EIDGKHFYFA	ENGEMQIGVF	NTEDGFKYFA
	HHNEDLGNEE			
	GEEISYSGIL	NFNNKIYYFD	DSFTAVVGWK	DLEDGSKYYF
	DEDTAEAYIG			
	LSLINDGQYY	FNDDGIMQVG	FVTINDKVFY	FSDSGIIESG
	VQNIDDNYFY			
	IDDNGIVQIG	VFDTSDGYKY	FAPANTVNDN	IYGQAVEYSG
	LVRVGEDVYY			
	FGETYTIETG	WIYDMENESD	KYYFNPETKK	ACKGINLIDD
	IKYYFDEKGI			
	MRTGLISFEN	NNYYFNENGE	MQFGYINIED	KMFYFGEDGV
	MQIGVFNTPD			
	GFKYFAHQNT	LDENFEGESI	NYTGWLDLDE	KRYYFTDEYI
	AATGSVIIDG			
	EEYYFDPDTA	QLVISE		
	MSLVNRKQLE	KMANVRFRVQ	EDEYVAILDA	LEEYHNMSEN
	TVVEKYLKLK			
	DINSLTDIYI	DTYKKSGRNK	ALKKFKEYLV	TEVLELKNNN
	LTPVEKNLHF			
	VWIGGQINDT	AINYINQWKD	VNSDYNVNVF	YDSNAFLINT
	LKKTIVESAT			
	NDTLESFREN	LNDPRFDYNK	FYRKRMEIYY	DKQKNFINYY
	KTQREENPDL			
	IIDDIVKIYL	SNEYSKDIDE	LNSYIEESLN	KVTENSGNDV
	RNFEEFKGGE			
	SFKLYEQELV	ERWNLAAASD	ILRISALKEV	GGVYLDVDML
	PGIQPDLFES			
	IEKPSSVTVD	FWEMVKLEAI	MKYKEYIPGY	TSEHFDMLDE
	EVQSSFESVL			
	ASKSDKSEIF	SSLGDMEASP	LEVKIAFNSK	GIINQGLISV
	KDSYCSNLIV			
	KQIENRYKIL	NNSLNPAISE	DNDFNTTTNA	FIDSIMAEAN
	ADNGRFMMEL			
	GKYLRVGFFP	DVKTTINLSG	PEAYAAAYQD	LLMFKEGSMN
	IHLIEADLRN			
2 <sup>b</sup>				

FEISKTNISQ STEQEMASLW SFDDARAKAQ FEEYKKNYFE  
 GSLGEDDNLD  
 FSQNTVVDKE YLLEKISSLA RSSERGYIHY IVQLQGDKIS  
 YEAACNLFAK  
 TPYDSVLFQK NIEDSEIAYY YNPGDGEIQE IDKYKIPSII SDRPKIKLTF  
 IGHGKDEFNT DIFAGLDVDS LSTEIETAID LAKEDISPXS IEINLLGCNM  
 FSYSVNVEET YPGKLLLRVK DKVSELMPSI SQDSIIVSAN  
 QYEVRLNSEG  
 RRELLDHSGE WINKEESIIK DISSKEYISF NPKENKIIVK SKNLPELSTL  
 LQEIRNNSNS SDIELEEKVM LAECEINVIS NIDTQVVEGR IEEAKSLTSD  
 SINYIKNEFK LIESISDALY DLKQQNELEE SHFISFEDIL ETDEGFSIRF  
 IDKETGESIF VETEKAFSE YANHITTEIS KIKGTIFDTV NGKLVKKVNL  
 DATHEVNTLN AAFFIQLIE YNSSKESLSN LSVAMKVQVY  
 AQLFSTGLNT  
 ITDAAKVVEL VSTALDETID LLPTLSEGLP VIATIIDGVS LGAAIKELSE  
 TSDPLLQEI EAKIGIMAVN LTAATTAIT SSLGIASGFS ILLVPLAGIS  
 AGIPSLVNE LILRDKATKV VDYFSHISLA ESEGAFSTLD  
 DKIMMPQDDL  
 VISEIDFNNN SITLGKCEIW RMEGGSGHTV TDDIDHFFSA PSITYREPHL  
 SIYDVLEVQK EELDLSKDLM VLPNAPNRVF AWETGWTPGL  
 RSLNDGTKL  
 LDRIRDNYEG EFYWRYFAFI ADALITTLKP RYEDTNIRIN LDSNTRSFIV  
 PVITTEYIRE KLSYSFYGSG GTYALSLSQY NMNINIELNE  
 NDTWVIDVDN  
 VVRDVTIESD KIKKGD LIEN ILSKLSIEDN KIILDNHEIN FSGTLNGGNG  
 FVSLTFSILE GINAVIEVDL LSYSYKVLIS GELKTLMANS NSVQQKIDYI  
 GLNSELQKNI PYSFMDDK GK ENGFINCSTK EGLFVSELSD  
 VVLISKVYMD  
 NSKPLFGYCS NDLKDVKVIT KDDVIILTGY YLKDDIKISL SFTIQDENTI  
 KLNGVYLDEN GVAEILKFMN KKGSTNTSDS LMSFLESMNI  
 KSIFINSLQS  
 NTKLILD TNF IISGTTSIGQ FEFICDKDNN IQPYFIKFNT LETKYTLYVG  
 NRQNMIVEPN YDLDDSGDIS STVINFSQKY LYGIDSCVNK  
 VIISPNIYTD  
 EINITPIYEA NNTYPEVIVL DTNYISEKIN ININDLSIRY VWSNDGSDFI

	LMSTDEENKV	SQVKIRFTNV	FKGNTISDKI	SFNFSKQDV
	SINKVISTFT			
	PSYYVEGLLN	YDLGLISLYN	EKFYINNFDM	MVSGLVYIND
	SLYYFKPPIK			
	NLITGFTTIG	DDKYYFNPDN	GGAASVGETI	IDGKNYYFSQ
	NGVLQTVFS			
	TEDGFKYFAP	ADTLDENLEG	EADFTGKLT	IDENVYYFGD
	NYRAAIEWQT			
	LDDEVYFST	DTGRAFKGLN	QIGDDKFYFN	SDGIMQKGFV
	NINDKTFYFD			
	DSGVMKSGYT	EIDGKYFYFA	ENGEMQIGVF	NTADGFKYFA
	HHDEDLGNEE			
	GEALSYSGIL	NFNKIYYFD	DSFTAVVGWK	DLEDGSKYYF
	DEDTAEAYIG			
	ISIINDGKYY	FNDGIMQIG	FVTINNEVFY	FSDSGIVESG
	MQNIDDNYFY			
	IDENGLVQIG	VFDTSQYKY	FAPANTVNDN	IYGQAVEYSG
	LVRVGEDVYY			
	FGETYTIETG	WIYDMENESD	KYYFDPETKK	AYKGINVIDD
	IKYYFDENGI			
	MRTGLITFED	NHYYFNEDGI	MQYGYLNIED	KTFYFSEDGI
	MQIGVFNTPD			
	GFKYFAHQNT	LDENFEGESI	NYTGWLDLDE	KRYYFTDEYI
	AATGSVIIDG			
	EEYYFDPDTA	QLVISE		
3°	NRQNMIVEPN	YDLDDSGDIS	STVINFSQKY	LYGIDSCVNK
	VIISPNIYTD			
	EINITPIYEA	NNTYPEVIVL	DTNYISEKIN	ININDLSIRY
	VWSNDGSDFI			
	LMSTDEENKV	SQVKIRFTNV	FKGNTISDKI	SFNFSKQDV
	SINKVISTFT			
	PSYYVEGLLN	YDLGLISLYN	EKFYINNFDM	MVSGLVYIND
	SLYYFKPPIK			
	NLITGFTTIG	DDKYYFNPDN	GGAASVGETI	IDGKNYYFSQ
	NGVLQTVFS			

	TEDGFKYFAP NYRAAIEWQT LDDEVYFFST NINDKTFYFD DSGVMKSGYT HHDEDLGNEE GEALSYSGIL DEDTAEAYIG ISIINDGKYY MQNIDDNYFY IDENGLVQIG LVRVGEDVYY FGETYTIETG IKYYFDENGI MRTGLITFED MQIGVFNTPD GFKYFAHQNT AATGSVIIDG EEYYFDPDTA QLVISE	ADTLDENLEG DTGRAFKGLN EIDGKYFYFA NFNNKIYYFD FNDSGIMQIG VFDTSDGYKY WIYDMENESD NHYYFNEDGI LDENFEGESI	EADFTGKLT QIGDDKFYFN ENGEMQIGVF DSFTA VVGWK FVTINNEVFY FAPANTVNDN KYYFDPETKK MQYGYLNIED NYTGWLDLDE	IDENVVYFFGD SDGIMQKGFV NTADGFKYFA DLEDGSKYYF FSDSGIVESG IYGQAVEYSG AYKGINVIDD KTFYFSEDGI KRYYFTDEYI
4 <sup>d</sup>	MSLISKEELI NENKYLQLKK L NESIDVFMN SPVEKNLHFV WIGGEVSDIA KKAIVESST EALQLLEEEI SQINKPTVPT IDDIKSHLV SEYNRDETVL LNIYSQELLN GIHSDLFKTI SRPSSIGLDR LKDNFKLIIE SKSEKSEIFS QVKNRYQFLN	KLAYSIRPRE KYKTSSRNRA LEYIKQWADI QNPQFDNMKF RGNLAAASDI WEMIKLEAIM KLENLNVSDL	NEYKTILTNL LSNLKKDILK NAEYNIKLWY YKKRMEFIYD VRLALKNFG KYKKYINNYT EIKIAFALGS NNFTDTTKIF	DEYNKLTTNN EVILIKNSNT DSEAFLVNTL RQKRFINYYK ANSLFTEQEL GVYLDVDMPL SENFDKLDQQ GSYLTNLVIE HDSL FNSATA

ENSMFLTKIA			
PYLQVGFMP	ARSTISLSGP	GAYASAYYDF	INLQENTIEK
TLKASDLIEF			
KFPENNSQL	TEQEINSLWS	FDQASAKYQF	EKYVRDYTGG
SLSEDNGVDF			
NKNTALDKNY	LLNNKIPSN	VEEAGSKNYV	HYIIQLQGDD
ISYEATCNLF			
SKNPKNSIII	QRNMNESAKS	YFLSDDGESI	LELNKYRIPE
RLKNKEKVKV			
TFIGHGKDEF	NTSEFARLSV	DSLNEISSF	LDTIKLDISP
KNVEVNLLGC			
NMFSYDFNVE	ETYPGKLLLS	IMDKITSTLP	DVNKNSITIG
ANQYEVRRINS			
EGRKELLAHS	GKWINKEEAI	MSDLSSKEYI	FFDSIDNKLK
AKSKNIPGLA			
SISEDIKTLL	LDASVSPDTK	FILNNLKLNI	ESSIGDYIYY
EKLEPVKNII			
HNSIDDLIDE	FNLLENVSDE	LYELKKNLNL	DEKYLISFED
ISKNNSTYSV			
RFINKSNGES	VYVETEKEIF	SKYSEHITKE	ISTIKNSIIT
DVNGNLLDNI			
QLDHTSQVNT	LNAAFFIQSL	IDYSSNKDVL	NDLSTSVKQV
LYAQLFSTGL			
NTIYDSIQLV	NLISNAVNDT	INVLPTITEG	IPIVSTILDG
INLGAAIKEL			
LDEHDPLLKK	ELEAKVGVLA	INMSLSIAAT	VASIVGIGAE
VTIFLLPIAG			
ISAGIPSLVN	NELILHDKAT	SVVNYFNHLS	ESKKYGPLKT
EDDKILVPID			
DLVISEIDFN	NNSIKLGTCN	ILAMEGGSGH	TVTGNIDHFF
SSPSSISHIP			
SLSIYSAIGI	ETENLDFSKK	IMMLPNAPSR	VFWWETGAVP
GLRSLENDGT			
RLLDSIRDLY	PGKFYWRFYA	FFDYAITTLK	PVYEDTNIKI
KLDKDTRNFI			
MPTITTNEIR	NKLSYSFDGA	GGTYSLLLSS	YPISTNINLS
KDDLWIFNID			
NEVREISIEN	GTIKKGKLIK	DVLSKIDINK	NKLIIGNQTI
DFSGDIDNKD			
RYIFLTCELD	DKISLIEIN	LVAKSYSLLL	SGDKNYLISN
LSNTIEKINT			
LGLDSKNIAY	NYTDESNNKY	FGAISKTSQK	SIIHYKKDSK
NILEFYNDST			

LEFNSKDFIA SISLVSKNQV KVNGLYLNES FWKLFGFENI NFVIDKYFTL SKSTIFSGNG RNVVVEPIYN INTNYYSDNEY TEGSDFILVR YLEESNKKIL NSENELDRDH FYFDPIEFNL VTGWQTINGK MQLGVFKGPD GFEYFAPANT KAVTGWRIIN NEKYYFNPNN VNGSRYYFDT DTAIAFNGYK PANTYNNNIE GQAIIVYQSKF NTNTAEAATG WQTIDGKKYY TGYTIINGKH FYFNTDGIMQ QNEFLTLNGK KYYFGSDSKA DKYYFSYDGI LQNGYITIER NTHNNNIEGQ AIVYQNKFLT NTAEAATGWQ TIDGKKYYFN YTSINGKHFY FNTDGIMQIG	EDINVMKDD VYSSYLDFVK VGKTNLGYVE YPEIIVLNP LGFKIIDNKT AIAAVGLQVI TIDGKHFYFD LTLNGKKYYF FNTNTAEAAT IGVFKGPNGF VTGWRIINNK NNFYFDANNE LNGKKYYFDN LNTAEAATGW VFKGPNGFEY	INTITGKYYV NSDGHHTSN FICDNNKNID TFHKKVNL YYYDEDSKLV ALTSYKIING VYQSKFLTLN DNNKYYFNP SDCVVKIGVF DNNSKAVTGW GWQTIDGKKY EYFAPANTDA KYYFNPNNAI SKMVTGVFKG DSKAVTGWQT QTIDGKKYYF FAPANTDANN	DNNTDKSIDF FMNLFLDNIS IYFGEWKTSS APDLYTSLIN DSSSFEYKWS GYIMSNFKSF KGLININNSL KHFYFNNDGV GKKYYFDNNS TAISKGWQT STSNGFEYFA QTIDSKKYYF YFNTNTAIAS NNIEGQAILY AAIHLCTINN PNGFEYFAPA IDGKKYYFNL NTNTFIASSTG IEGQAILYQN
--	--	--	--

	KFLTNGKKY YFGSDSKAVT YYFNTNTSIA STGYTIISGK ANNIEGQAIR YQNRFLYLHD MGANGYKTID NKNFYFRNGL RYQNRFLHLL GKIYYFGNNS IDGVIYFFGV DGVKAPGIYG	GLRTIDGKKY HFYFNTDGIM NIYYFGNNSK PQIGVFKGSN KAVTGWQTIN	YFNTNTAVAV QIGVFKGPDG AATGWVTIDG GFEYFAPANT GKVYYFMPDT	TGWQTINGKK FEYFAPANTD NRYYFEPNTA DANNIEGQAI AMAAAGGLFE
5 <sup>e</sup>	MSLISKEELI NENKYLQLKK L NESIDVFMN SPVEKNLHFV WIGGEVSDIA KKAIVESSTT EALQLLEEEI SQINKPTVPT IDDIKSHLV SEYNRDETLLESYRTNSLRK LNIYSQELLN GIHSDLFKTI PRPSSIGLDR LKD NFKLIIE SKSEKSEIFS QVKNRYQFLN ENSMFLTKIA PYLQVGFMPPE TLKASDLIEF KFPENNSQL SLSEDNGVDF NKNTALDKNY ISYEATCNLF	KLAYSIRPRE KYKNSSRNRA LEYIKQWADI QNPQFDNMKF RGNLAAASDI WEMIKLEAIM EIKIAFALGS QHLNPAIESD ARSTISLSGP TEQEINSLWS LLNNKIPSNN	NEYKTILTNL LSNLKKDILK NAEYNIKLWY YKKRMEFIYD VRLALKNFG KYKKYINNYT NNFTDTTKIF GAYASAYYDF FDQASAKYQF VEEAGSKNYV	DEYNKLTNN EVILIKNSNT DSEAFLVNTL RQKRFINYK ANSLFTEQEL GVYLDVDMPL SENFDKLDQQ GSYLTNLVIE HDSL FNSATA INLQENTIEK EKYVRDYTGG HYIIQLQGDD

SKNPKNSIII	QRNMNESAKS	YFLSDDGESI	LELNKYRIPE
RLKNKEKVKV			
TFIGHGKDEF	NTSEFARLSV	DSLSNEISSF	LDTIKLDISP
KNVEVNLLGC			
NMFSYDFNVE	ETYPGKLLLS	IMDKITSTLP	DVNBKDSITIG
ANQYEVRRNS			
EGRKELLAHS	GKWINKEEAI	MSDLSSKEYI	FFDSIDNKLK
AKSKNIPGLA			
SISEDIKTLL	LDASVSPDTK	FILNNLKLNI	ESSIGDYIYY
EKLEPVKNII			
HNSIDDLIDE	FNLENVSDE	LYELKKLNNL	DEKYLISFED
ISKNNSTYSV			
RFINKSNGES	VYVETEKEIF	SKYSEHITKE	ISTIKNSIIT
DVNGNLLDNI			
QLDHTSQVNT	LNAAFFIQSL	IDYSSNKDVL	NDLSTSVKQV
LYAQLFSTGL			
NTIYDSIQLV	NLISNAVNDT	INVLPTITEG	IPIVSTILDG
INLGAAIKEL			
LDEHDPLLKK	ELEAKVGVLA	INMSLSIAAT	VASIVGIGAE
VTIFLLPIAG			
ISAGIPSLVN	NELILHDKAT	SVVNYFNHLS	ESKEYGPLKT
EDDKILVPID			
DLVISEIDFN	NNSIKLGTCN	ILAMEGGSGH	TVTGNIDHFF
SSPYISSHIP			
SLSVYSAIGI	KTENLDFSKK	IMMLPNAPSR	VFWWETGAVP
GLRSLENNGT			
KLLDSIRDLY	PGKFYWRFYA	FFDYAITTLK	PVYEDTNTKI
KLDKDTRNFI			
MPTITTDEIR	NKLSYSFDGA	GGTYSLLLSS	YPISMNINLS
KDDLWIFNID			
NEVREISIEN	GTIKKNLIE	DVLSKIDINK	NKLIIGNQTI
DFSGDIDNKD			
RYIFLTCELD	DKISLIEIN	LVAKSYSLLL	SGDKNYLISN
LSNTIEKINT			
LGLDSKNIAY	NYTDESNNKY	FGAISKTSQK	SIIHYKKDSK
NILEFYNGST			
LEFNSKDFIA	EDINVMKDD	INTITGKYYV	DNNTDKSIDF
SISLVSKNQV			
KVNGLYLNES	VYSSYLDFVK	NSDGHHTSN	FMNLFLNNIS
FWKLFGFENI			
NFVIDKYFTL	VGKTNLGYVE	FICDNNKNID	IYFGEWKTSS
SKSTIFSGNG			
RNVVVEPIYN	PDTGEDISTS	LDFSYEPLYG	IDRYINKVLI
APDLYTSLIN			



INTNYYSNEY	YPEIIVLNPN	TFHKKVNINL	DSSSFYKWS
TEGSDFILVR			
YLEESNKKIL	QKIRIKGILS	NTQSFNKMSI	DFKDIKKLSL
GYIMSNFKSF			
NSENELDRDH	LGFKIIDNKT	YYYDEDSKLV	KGLININNSL
FYFDPIESNL			
VTGWQTINGK	KYYFDINTGA	ASTSYKIING	KHFYFNNNGV
MQLGVFKGPD			
GFEYFAPANT	QNNNIEGQAI	VYQSKFLTLN	GKKYYFDNDS
KAVTGWRIIN			
NEKYYFNPNN	AIAAVGLQVI	DNNKYYFNPD	TAISKGWQT
VNGSRYYFDT			
DTAIAFNGYK	TIDGKHFYFD	SDCVVKIGVF	SGSNGFEYFA
PANTYNNNIE			
GQAIVYQSKF	LTLNGKKYYF	DNNSKAVTGW	QTIDSKKYYF
NTNTAEAATG			
WQTIDGKKYY	FNTNTAEAAT	GWQTIDGKKY	YFNTNTSIAS
TGYTIINGKY			
FYFNTDGIMQ	IGVFKVPNGF	EYFAPANHTN	NNIEGQAILY
QNKFLTLNGK			
KYYFGSDSKA	ITGWQTIDGK	KYYFNPNNAI	AATHLCTINN
DKYYFSYDGI			
LQNGYITIER	NNFYFDANNE	SKMVTGVFKG	PNGFEYFAPA
NTHNNNIEGQ			
AIVYQNKFLT	LNGKKYYFDN	DSKAVTGWQT	IDSKKYYFNL
NTAVAVTGWQ			
TIDGEKYYFN	LNTAEAATGW	QTIDGKRYFF	NTNTYIASTG
YTIINGKHFY			
FNTDGIMQIG	VFKGPDGFEY	FAPANHTNNN	IEGQAILYQN
KFLTLNGKKY			
YFGSDSKAVT	GLRTIDGKKY	YFNTNTAVAV	TGWQTINGKK
YYFNTNTYIA			
STGYTIISGK	HFYFNTDGIM	QIGVFKGPDG	FEYFAPANTD
ANNIEGQAIR			
YQNRFLYLHD	NIYYFGNDSK	AATGWATIDG	NRYFEPNTA
MGANGYKTID			

	NKNFYFRNGL RYQNRFLHLL GKIYYFGNNS IDGVIYFFGV DGVKAPGIYG	PQIGVFKGPN KAVTGWQTIN	GFEYFAPANT SKVYYFMPDT	DANNIDGQAI AMAAAGGLFE
6 <sup>f</sup>	GLININNSLF STSYKIINGK HFYFNNNGVM YQSKFLTLNG KKYYFDNDSK NNKYYFNPDT AISKGWQTV DCVVKIGVFS GSNGFEYFAP NNSKAVTGWQ TIDSKKYYFN WQTIDGKKYY FNTNTSIAS YFAPANTHNN NIEGQAILYQ YYFNPNAIA ATHLCTINND KMVTGVFKGP NGFEYFAPAN SKAVTGWQTI DSKKYYFNLN TIDGKRYFFN TNTYIASTGY APANTHNNNI EGQAILYQNK FNTNTAVAVT GWQTINGKKY IGVFKGPDGF EYFAPANTDA	YFDPIESNLV QLGVFKGPDG AVTGWRIINN NGSRYYFDTD ANTYNNNIEG TNTAEAATGW GYTIINGKYF NKFLTLNGKK KYYFSYDGIL THNNNIEGQA TAVAVTGWQT TIINGKHFYF FLTLNGKKYY YFNTNTYIAS NNIEGQAIRY	TGWQTINGKK FEYFAPANTQ EKYYFNPNA TAIAFNGYKT QAIVYQSKFL QTIDGKKYYF YFNTDGIMQI YYFGSDSKAI QNGYITIERN IVYQNKFLTL IDGKYYFNL NTDGIMQIGV TGYTIISGKH QNRFLYLHDN	YYFDINTGAA NNNIEGQAIV IAAVGLQVID IDGKHFYFDS TLNGKKYYFD NTNTAEAATG GVFKVPNGFE TGWQTIDGKK NFYFDANNES NGKKYYFDND NTAEAATGWQ FKGPDGFEYF LRTIDGKKYY FYFNTDGIMQ IYYFGNDSKA

	ATGWATIDGN RYYFEPNTAM    GANGYKTIDN    KNFYFRNGLP    QIGVFKGPNG FEYFAPANTD ANNIDGQAIR    YQNRFLHLLG    KIYYFGNNSK    AVTGWQTINS KVYYFMPDTA MAAAGGLFEI DGVIYFFGVD GVKAPGIYG
7 <sup>a</sup>	SPNIYTDEIN ITPVYETN
8 <sup>a</sup>	YPEVIVLDAN YINEKI
9 <sup>a</sup>	TVGDDKYYFN PINGG
10 <sup>a</sup>	ASIGETIIDD KNYYFNQS
11 <sup>a</sup>	EDGFKYFAPA NTLDEN
12 <sup>a</sup>	PANTLDENLE GE
13 <sup>a</sup>	AIDFTGKLII DE
14 <sup>a</sup>	NIYYFDDNYR GAVE
15 <sup>a</sup>	HYFSPETGKA FK
16 <sup>a</sup>	IGDYKYFNSD GVM
17 <sup>a</sup>	HFYFAENGEM QIGVFNTEDG FK
18 <sup>a</sup>	INDGQYYFND DGIMQV
19 <sup>a</sup>	YKYFAPANTV NDNIYG
20 <sup>a</sup>	ESDKYYFNPE TKKA
21 <sup>a</sup>	NNNYFNENG EMQFGYINI
22 <sup>a</sup>	QNTLDENFEG ESINYT
23 <sup>b</sup>	SPNIYTDEIN ITPIYEAN
24 <sup>b</sup>	YPEVIVLDTN YISEKI
25 <sup>b</sup>	TIGDDKYYFN PDNGG
26 <sup>b</sup>	ASVGETIIDG KNYYFSQN
27 <sup>b</sup>	EDGFKYFAPA DTLDEN
28 <sup>b</sup>	PADTLDENLE GE
29 <sup>b</sup>	AIDFTGKLTI DE
30 <sup>b</sup>	NVYYFGDNYR AAIE

31 <sup>b</sup>	YYFSTDTGRA FK
32 <sup>b</sup>	IGDDKFYFNS DGIM
33 <sup>b</sup>	YFYFAENGEM QIGVFNTADG FK
34 <sup>b</sup>	INDGKYYFND SGIMQI
35 <sup>b</sup>	YKYFAPANTV NDNIY
36 <sup>b</sup>	ESDKYYFDPE TKKA
37 <sup>b</sup>	DNHYYFNEDG IMQYGYLNI
38 <sup>b</sup>	QNTLDENFEG ESINYT
39 <sup>g</sup>	DDNGIVQIGV FDTSDGYKYF APANTVNDNI YGQAVEYSGL VRVGEDVYYF GETYTIETGW IYDMENESDK YYFNPETKKA CKGINLIDDI KYFDEK GIM RTGLISFENN NYFNFENGEM QFGYINIEDK MFYFGEDGVM QIGVFNTPDG FKYFAHQNTL DENFEGESIN YTGWLDLDEK RYYFTDEYIA
40 <sup>h</sup>	DENGLVQIGV FDTSDGYKYF APANTVNDNI YGQAVEYSGL VRVGEDVYYF GETYTIETGW IYDMENESDK YYFDPETKKA YKGINVIDDI KYFDENGIM RTGLITFEDN HYYFNEDGIM QYGYLNIEDK TFYFSEDGIM QIGVFNTPDG FKYFAHQNTL DENFEGESIN YTGWLDLDEK RYYFTDEYIA
<sup>a</sup> Токсин В штамма VPI 10463 <i>C. difficile</i> <sup>b</sup> Токсин В штамма NAP1/027 <i>C. difficile</i> <sup>c</sup> TcdB <sub>21651-2366</sub> <i>C. difficile</i> <sup>d</sup> Токсин А штамма VPI 10463 <i>C. difficile</i> <sup>e</sup> Токсин А штамма NAP1/027 <i>C. difficile</i> <sup>f</sup> Область CROP токсина А из штамма NAP1/027 <i>C. difficile</i> <sup>g</sup> TcdB <sub>2152-2341</sub> штамма VPI 10463 <i>C. difficile</i> <sup>h</sup> TcdB <sub>2152-2341</sub> штамма BI/NAP1/027 <i>C. difficile</i>	

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать смесь двух или более полипептидов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 полипептидов *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать 2 полипептида *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать 3 полипептида *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать 4 полипептида *C. difficile*. В некоторых

вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать по меньшей мере один анатоксин токсина *A C. difficile*; анатоксин токсина *B C. difficile*; нетоксичный фрагмент токсина *A C. difficile*; нетоксичный фрагмент токсина *B C. difficile* или любое их сочетание.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина А или токсина *B C. difficile* может иметь по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина А или токсина *B C. difficile* имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мутаций. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой делецию. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой замену. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой вставку. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой укорочение.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина А или токсина *B C. difficile* имеет по меньшей мере одну мутацию в домене глюкозилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления мутация в домене глюкозилтрансферазы находится в аминокислотах 1-541 SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления мутация в домене глюкозилтрансферазы находится в аминокислотах 1-541 SEQ ID NO: 4. NO: 5. В некоторых вариантах осуществления мутация в домене глюкозилтрансферазы находится в аминокислотах 1-543 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутация в домене глюкозилтрансферазы находится в аминокислотах 1-543 SEQ ID NO: 2.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина *B C. difficile* может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 замен относительно последовательности антигена токсина В дикого типа SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина *B C. difficile* может иметь замены в 1, 2, 3, 4 или 5 положениях, соответствующих аминокислотам 270, 273, 284, 286 или 288 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина *A C. difficile* может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 замен относительно последовательности антигена токсина А дикого типа SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина *A C. difficile* может иметь замены в 1, 2 или 3 положениях, соответствующих аминокислотам 283, 285 или 287 в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина А или токсина *B C. difficile* имеет по меньшей мере одну мутацию в ферментативном домене разрезающей или цистеиновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления ферментативный домен разрезающей или цистеиновой протеазы находится в области аминокислот 542-769 SEQ ID NO: 4; аминокислот 542-769 SEQ ID NO: 5; аминокислот 544-767 SEQ ID NO: 1 или аминокислот 544-767 SEQ ID NO: 2. В некоторых

вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина А или токсина В *C. difficile* имеет по меньшей мере одну мутацию в домене транслокации. В некоторых вариантах осуществления домен транслокации находится в области аминокислот 770-1808 SEQ ID NO: 4; аминокислот 770-1808 SEQ ID NO: 5; аминокислот 768-1833 SEQ ID NO: 1 или аминокислот 768-1833 SEQ ID NO: 2.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида токсина А или токсина В *C. difficile* имеет минимальную длину примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600 или 2650 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент полипептида имеет минимальную длину примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600 или 2650 аминокислот из TcdA<sub>1649-2710</sub>, TcdB<sub>1651-2366</sub>, области CROP токсина А (TcdA<sub>1832-2710</sub>) или области CROP токсина В (TcdB<sub>1834-2366</sub>).

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать два или более токсинов А, токсинов В или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления два или более фрагментов токсина А или токсина В идентичны. В некоторых вариантах осуществления два или более фрагментов токсина А или токсина В различны. В некоторых вариантах осуществления два или более фрагментов токсина А или токсина В являются смежными. В некоторых вариантах осуществления два или более фрагментов токсина А или токсина В являются несмежными. В некоторых вариантах осуществления два или более фрагментов токсина А или токсина В связаны в любом порядке, например, А-А-В, А-В-А, В-А-А, В-В-А, В-А-В, А-В-А или А-В-В от N-конца к С-концу.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать TcdA и TcdB в соотношении TcdA:TcdB, составляющем примерно 90:10, примерно 80:20, примерно 70:30, примерно 60:40, примерно 50:50, примерно 40:60, примерно 30:70, примерно 20:80 или примерно 10:90. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать TcdA и TcdB в соотношении TcdA:TcdB, составляющем примерно 50:50 (то есть, равных количествах). В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать TcdA и TcdB в соотношении TcdA:TcdB, составляющем примерно 70:30. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать TcdA и TcdB в соотношении TcdA:TcdB, составляющем примерно 30:70. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению может содержать TcdA и TcdB в соотношении TcdA:TcdB, составляющем

примерно 80:20. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать TcdA и TcdB в соотношении TcdA:TcdB, составляющем примерно 20:80.

#### **Фармацевтические композиции**

[0109] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцинной композиции, направленной на бактерии *C. difficile* и по меньшей мере один энтеротоксин *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению направлена на бактерии *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению направлена на бактерии *C. difficile* и один энтеротоксин *C. difficile*, например, токсин А или токсин В. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению направлена на бактерии *C. difficile* и два энтеротоксина *C. difficile*, например, токсин А и токсин В.

[0110] Фармацевтическая композиция по изобретению может представлять собой сочетание любых соединений или фармацевтически приемлемых солей, описанных в настоящем документе, с другими химическими компонентами, такими как носители, стабилизаторы, разбавители, диспергирующие средства, суспендирующие средства, загустители, адъюванты и/или эксципиенты. Фармацевтические композиции по изобретению могут облегчать введение соединения в организм. Фармацевтические композиции можно вводить в терапевтически эффективных количествах в виде фармацевтических композиций различными способами и путями введения, включая, например, внутривенное, подкожное, внутримышечное, пероральное, парентеральное, офтальмическое, подкожное, чрескожное, назальное, вагинальное и местное введение.

[0111] Фармацевтическую композицию можно вводить локально, например, путем инъекции соединения непосредственно в орган, необязательно, в виде депо-препарата или препарата с пролонгированным высвобождением, или имплантата. Фармацевтические композиции могут быть предоставлены в форме препарата с быстрым высвобождением, в форме препарата с пролонгированным высвобождением или в форме препарата с промежуточным высвобождением. Форма с быстрым высвобождением может обеспечивать немедленное высвобождение. Препарат с пролонгированным высвобождением может обеспечивать контролируемое высвобождение или устойчивое замедленное высвобождение.

[0112] Для перорального введения фармацевтические композиции могут быть составлены путем объединения активных соединений с фармацевтически приемлемыми носителями или эксципиентами. Такие носители можно использовать для приготовления жидкостей, гелей, сиропов, эликсиров, густых суспензий или суспензий для перорального приема субъектом. Неограничивающие примеры растворителей, используемых в пероральном растворимом препарате, могут включать воду, этанол, изопропанол, солевой раствор, физиологический раствор, ДМСО, диметилформамид, калий-фосфатный буфер, фосфатно-солевой буфер (PBS), натрий-фосфатный буфер, буфер HEPES (4-2-гидроксиэтил-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), буфер MOPS (3-(N-

морфолино)пропансульфоновую кислоту), буфер PIPES (пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновую кислоту) и солевой натрий-цитратный буфер (SSC). Неограничивающие примеры соразработителей, используемых в пероральном растворимом препарате, могут включать сахарозу, мочевины, кремафор, ДМСО и калий-фосфатный буфер.

**[0113]** Соединения также могут быть составлены в виде ректальных композиций, таких как клизмы, ректальные гели, ректальные пены, ректальные аэрозоли, суппозитории, желеобразные суппозитории или удерживающие клизмы, содержащие обычные основы суппозитория, такие как масло какао или другие глицериды, а также синтетические полимеры, такие как поливинилпирролидон и ПЭГ. В композициях, имеющих форму суппозитория, легкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот, необязательно в сочетании с маслом какао, может быть расплавлен.

**[0114]** При использовании на практике способов лечения или вариантов применения, предложенных в настоящем документе, терапевтически эффективные количества соединений, описанных в настоящем документе, вводят в фармацевтических композициях субъекту, имеющему заболевание или состояние, подлежащее лечению. В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, такое как человек. Субъектами могут быть, например, пожилые люди, взрослые, подростки, люди детско-юношеского возраста, дети, дети раннего возраста, младенцы, новорожденные, а также животные, не являющиеся людьми. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент. Терапевтически эффективное количество может широко варьироваться в зависимости от тяжести заболевания, возраста и относительного здоровья субъекта, эффективности используемых соединений и других факторов. Соединения могут быть использованы отдельно или в сочетании с одним или более терапевтическими средствами в качестве компонентов смесей.

**[0115]** Фармацевтические композиции могут быть составлены с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, включая эксципиенты и вспомогательные вещества, облегчающие переработку активных соединений в препараты, которые можно использовать фармацевтически. Препараты могут быть модифицированы в зависимости от выбранного пути введения. Фармацевтические композиции, содержащие соединение, описанное в настоящем документе, могут быть изготовлены, например, путем смешивания, растворения, эмульгирования, инкапсулирования, захвата в носителе или прессования.

**[0116]** Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент и соединения, описанные в настоящем документе, в форме свободного основания или фармацевтически приемлемой соли. Фармацевтические композиции могут содержать солюбилизаторы, стабилизаторы, средства, повышающие тоничность, буферы и консерванты.

**[0117]** Способы получения композиций, содержащих соединения, описанные в настоящем документе, включают объединение соединений с одним или более инертными,



фармацевтически приемлемыми эксципиентами или носителями, с получением твердой, полутвердой или жидкой композиции. Твердые композиции включают, например, порошки, таблетки, диспергируемые гранулы, капсулы и облатки. Жидкие композиции включают, например, растворы, в которых растворено соединение, эмульсии, содержащие соединение, или раствор, содержащий липосомы, мицеллы или наночастицы, содержащие соединение, раскрытое в настоящем документе. Полутвердые композиции включают, например, гели, суспензии и кремы. Композиции могут находиться в жидких растворах или суспензиях, твердых формах, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед применением, или в виде эмульсий. Эти композиции могут также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные средства для регулирования pH и другие фармацевтически приемлемые добавки.

**[0118]** Неограничивающие примеры лекарственных форм, подходящих для применения по настоящему изобретению, включают жидкость, порошок, гель, наносуспензию, наночастицы, микрогель, водные или масляные суспензии, эмульсии и любое их сочетание.

**[0119]** Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов, подходящих для использования по изобретению, включают связывающие средства, разрыхлители, антиадгезивы, антистатики, сурфактанты, антиоксиданты, покрывающие средства, красители, пластификаторы, консерванты, суспендирующие средства, эмульгаторы, противомикробные средства, средства сферонизации и любое их сочетание.

**[0120]** Фармацевтическая композиция по изобретению может содержать адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант может ускорять, продлевать или усиливать антиген-специфический иммунный ответ при использовании в сочетании с антигеном или соединением по изобретению. В некоторых вариантах осуществления адъювант может стимулировать иммунную систему для более активного ответа на вакцину и обеспечивать повышенный иммунитет против инфекции. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганическое соединение, а также масло, бактериальный продукт, растительный продукт, цитокин, органическое вещество или сочетание средств.

**[0121]** В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганическое соединение. В некоторых вариантах осуществления неорганическое соединение представляет собой алюмокалиевые квасцы, сульфат алюминия-калия, гидроксид алюминия, фосфат алюминия или гидроксид фосфата кальция. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой масло. В некоторых вариантах осуществления масло представляет собой парафиновое масло, адъювант 65 или арахисовое масло. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой бактериальный продукт, например, убитые бактерии вида *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium bovis*, или анатоксин. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой растительный продукт, например, растительный сапонин из *Quillaja*,

сои или *polysaga senega*. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой цитокин, например, IL-1, IL-2 или IL-12. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой комбинированный адъювант. В некоторых вариантах осуществления комбинированный адъювант представляет собой полный адъювант Фрейнда или неполный адъювант Фрейнда. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой органическое вещество, например, сквален.

[0122] В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой квасцы, минеральное масло, растительное масло, гидроксид алюминия, неполный адъювант Фрейнда или агонист TLR (например, олигонуклеотид CpG). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой AS04 (то есть, монофосфориллипид А и соль алюминия). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой MF59 (то есть, эмульсию типа «масло в воде» со скваленом). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой AS01<sub>B</sub> (то есть, монофосфориллипид А и QS-21, объединенные в липосомальный препарат). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой CpG 1018 (то есть, цитозин фосфогуанин). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой AlPO<sub>4</sub>. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой AlOH. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой Advax™ или Advax-2™ (микрочастицы дельта-инулина).

[0123] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один адъювант. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит два адъюванта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит три адъюванта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит четыре адъюванта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит пять адъювантов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит адъюванта.

[0124] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), где полисахарид клеточной поверхности представляет собой антиген PSII, обогащенный из *C. difficile*, где композиция имеет общее процентное содержание по массе углеводов по меньшей мере примерно 40%, и где антиген PSII, обогащенный из *C. difficile*, составляет по меньшей мере 90% от общего процентного содержания углеводов.

[0125] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (а) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид, содержащий белок-носитель; где белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* присутствуют в композиции в соотношении от менее примерно 10:1 до примерно 1:3. В настоящем документе раскрыта композиция, содержащая: (а) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид, содержащий белок-носитель, полученный из организма, отличного от *C. difficile*; где белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности присутствуют в

композиции в соотношении от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0126]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (a) полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) первый полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где фармацевтическая композиция имеет общее процентное содержание углеводов, в котором по меньшей мере примерно 90% общего процентного содержания углеводов составляет PSII.

**[0127]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (a) полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) первый полипептид, содержащий первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид, содержащий второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, не конъюгирован с первым полипептидом или вторым полипептидом.

**[0128]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид или полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент, который представляет собой инактивированный токсин; где фармацевтическая композиция содержит менее примерно 5% по массе белка *C. difficile*, отличного от инактивированного токсина *C. difficile*.

**[0129]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (a) полисахарид клеточной поверхности из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) первый полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где первый анатоксин представляет собой полноразмерный анатоксин токсина А и второй анатоксин представляет собой полноразмерный анатоксин токсина В.

**[0130]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) первый полипептид или полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый инактивированный токсин *C. difficile* или его фрагмент, где фармацевтическая композиция содержит менее примерно 5% по массе белка *C. difficile*, отличного от инактивированного токсина *C. difficile*. В настоящем документе также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая полисахарид клеточной

поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), конъюгированный с белком-носителем; где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем химическим линкером, содержащим от 1 до 10 атомов углерода.

**[0131]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (а) полисахарид клеточной поверхности из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), конъюгированный с белком-носителем; (b) первый полипептид, содержащий первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второй полипептид, содержащий второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) фармацевтически приемлемый носитель; где полисахарид клеточной поверхности из *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем химическим линкером, выбранный из группы, состоящей из тиоэфира, дигидразида адипиновой кислоты, мочевины или амина.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, состоящей в основном из: (а) полисахарида клеточной поверхности из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), конъюгированного с фармацевтически приемлемым носителем; (b) первого полипептида или первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; (c) второго полипептида или второго полинуклеотида, кодирующего второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и (d) адьюванта.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам получения иммуногенной композиции путем смешивания антигена или полисахарида клеточной поверхности *C. difficile*, или конъюгата полисахарида клеточной поверхности с по меньшей мере одним из токсина А, токсина В или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления токсин А, токсин В или его фрагмент представляет собой нетоксичный иммуногенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция может вызывать защитный иммунный ответ, способствуя продуцированию антител, реагирующих с одним или более штаммами *C. difficile*, и антител, реагирующих с одним или более токсинами *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция может способствовать продуцированию антител, реагирующих с токсином А *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция может способствовать продуцированию антител, реагирующих с токсином В *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция может способствовать продуцированию антител, реагирующих с токсином А и токсином В *C. difficile*.

**[0134]** В некоторых вариантах осуществления нетоксичный полипептид или его фрагмент представляет собой полученный рекомбинантными методами полипептид.

**[0135]** Вакцинная композиция по изобретению может иметь соотношение полисахарид клеточной поверхности:полипептид, составляющее примерно 100:1, примерно 80:1, примерно 60:1, примерно 40:1, примерно 20:1, примерно 10:1, примерно 9:1, примерно 8:1, примерно 7:1, примерно 6:1, примерно 5:1, примерно 4:1, примерно 3:1,

примерно 2:1, примерно 1:1, примерно 1:2, примерно 1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1:6, примерно 1:7, примерно 1:8, примерно 1:9, примерно 1:10, примерно 1:20, примерно 1:40, примерно 1:60, примерно 1:80 или примерно 1:100. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может иметь соотношение полисахарид клеточной поверхности:полипептид, составляющее примерно 10:1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может иметь соотношение полисахарид клеточной поверхности:полипептид, составляющее примерно 5:1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может иметь соотношение полисахарид клеточной поверхности:полипептид, составляющее примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой анатоксин А или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой анатоксин В или его фрагмент.

**[0136]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10%, примерно 9%, примерно 8%, примерно 7%, примерно 6%, примерно 5%, примерно 4%, примерно 3%, примерно 2% или примерно 1% по массе полипептида из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может содержать менее примерно 20%, примерно 15%, примерно 10%, примерно 9%, примерно 8%, примерно 7%, примерно 6%, примерно 5%, примерно 4%, примерно 3%, примерно 2% или примерно 1% по массе полипептида из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может содержать менее примерно 20% по массе полипептида из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может содержать менее примерно 10% по массе полипептида из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может содержать менее примерно 5% по массе полипептида из *C. difficile*.

**[0137]** Фармацевтическая композиция по изобретению может иметь общее процентное содержание по массе углеводов, составляющее по меньшей мере примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80% или примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может иметь общее процентное содержание по массе углеводов, составляющее по меньшей мере примерно 40%. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может иметь общее процентное содержание по массе углеводов, составляющее по меньшей мере примерно 60%. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может иметь общее процентное содержание по массе углеводов, составляющее по меньшей мере примерно 80%.

**[0138]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95% сахаридов, присутствующих в фармацевтической композиции по изобретению, составляет полисахарид клеточной поверхности по изобретению, например,

антиген PSII. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере примерно 80% сахаридов, присутствующих в фармацевтической композиции, составляет антиген PSII. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере примерно 90% сахаридов, присутствующих в фармацевтической композиции, составляет антиген PSII. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере примерно 95% сахаридов, присутствующих в фармацевтической композиции, составляет антиген PSII.

**[0139]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать по меньшей мере примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45% или примерно 50% по массе полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может содержать по меньшей мере примерно 5% по массе полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может содержать по меньшей мере примерно 15% по массе полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может содержать по меньшей мере примерно 25% по массе полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile*.

**[0140]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать по меньшей мере примерно 75% полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile* или его конъюгата; по меньшей мере примерно 5% полипептида первого анатоксина *C. difficile* или его фрагмента; и по меньшей мере примерно 5% полипептида второго анатоксина *C. difficile* или его фрагмента. Вакцинная композиция по изобретению может содержать примерно 82% полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile* или его конъюгата; по меньшей мере примерно 9% полипептида первого анатоксина *C. difficile* или его фрагмента; и по меньшей мере примерно 9% полипептида второго анатоксина *C. difficile* или его фрагмента. Вакцинная композиция по изобретению может содержать примерно 82% конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> по изобретению; по меньшей мере примерно 9% TcdA *C. difficile* или его фрагмента; и по меньшей мере примерно 9% TcdB *C. difficile* или его фрагмента.

**[0141]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 5%, примерно 4,5%, примерно 4%, примерно 3,5%, примерно 3%, примерно 2,5%, примерно 2%, примерно 1,5% или примерно 1% примеси. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0142]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 5%, примерно 4,5%, примерно 4%, примерно 3,5%, примерно 3%, примерно 2,5%, примерно 2%, примерно 1,5% или примерно 1% примеси пептидогликана. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1%, примерно 0,9%, примерно 0,8%, примерно 0,7%, примерно 0,6%, примерно 0,5%, примерно 0,4%, примерно 0,3%, примерно 0,2% или примерно 0,1% примеси пептидогликана. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по

изобретению может содержать менее примерно 5% примеси пептидогликана. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1% примеси пептидогликана. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,5% примеси пептидогликана. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,3% примеси пептидогликана. В некоторых вариантах осуществления примесь пептидогликана рассчитана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности в композиции.

**[0143]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 5%, примерно 4,5%, примерно 4%, примерно 3,5%, примерно 3%, примерно 2,5%, примерно 2%, примерно 1,5% или примерно 1% примеси белка. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1%, примерно 0,9%, примерно 0,8%, примерно 0,7%, примерно 0,6%, примерно 0,5%, примерно 0,4%, примерно 0,3%, примерно 0,2% или примерно 0,1% примеси белка. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 5% примеси белка. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1% примеси белка. В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,5% примеси белка. В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,3% примеси белка. В некоторых вариантах осуществления примесь белка представляет собой белок *C. difficile*, отличный от инактивированного токсина *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления примесь белка рассчитана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности в композиции.

**[0144]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 5%, примерно 4,5%, примерно 4%, примерно 3,5%, примерно 3%, примерно 2,5%, примерно 2%, примерно 1,5% или примерно 1% примеси нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1%, примерно 0,9%, примерно 0,8%, примерно 0,7%, примерно 0,6%, примерно 0,5%, примерно 0,4%, примерно 0,3%, примерно 0,2% или примерно 0,1% примеси нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1% примеси нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,5% примеси нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,3% примеси нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления примесь нуклеиновой кислоты рассчитана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности в композиции.

**[0145]** Вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 5%, примерно 4,5%, примерно 4%, примерно 3,5%, примерно 3%, примерно 2,5%, примерно

2%, примерно 1,5% или примерно 1% примеси сахара. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1%, примерно 0,9%, примерно 0,8%, примерно 0,7%, примерно 0,6%, примерно 0,5%, примерно 0,4%, примерно 0,3%, примерно 0,2% или примерно 0,1% примеси сахара. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 1% примеси сахара. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,5% примеси сахара. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может содержать менее примерно 0,3% примеси сахара. В некоторых вариантах осуществления примесь сахара рассчитана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности в композиции.

[0146] Вакцинная композиция по изобретению может иметь уровень эндотоксина менее примерно 50 ЕЭ/мг, примерно 40 ЕЭ/мг, примерно 30 ЕЭ/мг, примерно 20 ЕЭ/мг или примерно 10 ЕЭ/мг очищенного PSII. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может иметь уровень эндотоксина менее примерно 10 ЕЭ/мг, примерно 9 ЕЭ/мг, примерно 8 ЕЭ/мг, примерно 7 ЕЭ/мг, примерно 6 ЕЭ/мг, примерно 5 ЕЭ/мг, примерно 4 ЕЭ/мг, примерно 3 ЕЭ/мг, примерно 2 ЕЭ/мг или примерно 1 ЕЭ/мг очищенного PSII. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может иметь уровень эндотоксина менее 10 ЕЭ/мг очищенного PSII. В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может иметь уровень эндотоксина менее 5 ЕЭ/мг очищенного PSII.

#### **Способ введения и дозы**

[0147] Компоненты вакцинной композиции можно вводить совместно или в отдельности. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию, содержащую полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности и по меньшей мере один токсин *C. difficile*, готовят в стандартной лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности и по меньшей мере один токсин *C. difficile* вводят одним и тем же путем введения. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности и по меньшей мере один токсин *C. difficile* вводят раздельно. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности и по меньшей мере один токсин *C. difficile* вводят разными путями введения. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности и по меньшей мере один токсин *C. difficile* вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности и по меньшей мере один токсин *C. difficile* вводят последовательно.

[0148] В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению вводят парентеральным (например, внутривенной (в/в),



внутримышечной (в/м) или подкожной (п/к) инъекцией), пероральным или трансмукозальным (например, интраназальным (и/н), внутрижелудочным (в/ж), интравагинальным, ректальным) путем введения. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению вводят внутримышечно.

**[0149]** Вакцинную композицию по изобретению можно вводить по схеме с однократной дозой или по схеме с многократными дозами. В некоторых вариантах осуществления несколько доз компонентов или вакцинной композиции можно вводить по схеме первичной иммунизации и схеме бустерной иммунизации. В некоторых вариантах осуществления несколько доз компонентов можно вводить совместно. В некоторых вариантах осуществления несколько доз компонентов можно вводить отдельно, например, в разное время или с использованием разных путей введения. В некоторых вариантах осуществления несколько доз компонентов можно вводить с использованием различных путей введения, например, парентерального первичного введения и трансмукозального бустерного введения, или трансмукозального первичного введения и парентерального бустерного введения.

**[0150]** В некоторых вариантах осуществления первичную иммунизацию проводят путем внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления вторичную или бустерную иммунизацию проводят путем внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления вторичную или бустерную иммунизацию проводят путем перорального введения.

**[0151]** В некоторых вариантах осуществления несколько доз вводят с интервалом по меньшей мере примерно 1 неделю, примерно 2 недели, примерно 3 недели, примерно 4 недели, примерно 5 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель, примерно 11 недель, примерно 12 недель, примерно 13 недель, примерно 14 недель, примерно 15 недель или примерно 16 недель. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован одной дозой. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован двумя дозами с интервалом примерно 2 недели. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован двумя дозами с интервалом примерно 3 недели. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован двумя дозами с интервалом примерно 4 недели. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован двумя дозами с интервалом примерно 6 недель. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован тремя дозами, при этом каждый интервал между дозами составляет примерно 2 недели. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован тремя дозами, при этом каждый интервал между дозами составляет примерно 3 недели. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть иммунизирован тремя дозами, при этом каждый интервал между дозами составляет

примерно 4 недели.

**[0152]** В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению можно вводить для подготовки иммунной системы субъекта при первой иммунизации. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению можно вводить второй раз в качестве ревакцинации в «подготовленную» иммунную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления бустерная доза может быть введена в любой момент во время инфекции, например, через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней или 21 день после обнаружения или наблюдения симптомов ИКД.

**[0153]** В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению можно вводить субъекту для восстановления иммунитета до защитного уровня, например, субъекту, который ранее был иммунизирован посредством вакцинации или который выздоровел от ИКД после лечения. В некоторых вариантах осуществления бустерную иммунизацию можно проводить через примерно 1 год, примерно 2 года, примерно 3 года, примерно 4 года, примерно 5 лет, примерно 6 лет, примерно 7 лет, примерно 8 лет, примерно 9 лет, примерно 10 лет, примерно 11 лет, примерно 12 лет, примерно 13 лет, примерно 14 лет, примерно 15 лет, примерно 16 лет, примерно 17 лет, примерно 18 лет, примерно 19 лет или примерно 20 лет после первоначальной иммунизации или лечения ИКД. В некоторых вариантах осуществления повторную иммунизацию можно проводить через примерно 3 года после первоначальной иммунизации или лечения ИКД. В некоторых вариантах осуществления повторную иммунизацию можно проводить через примерно 5 лет после первоначальной иммунизации или лечения ИКД. В некоторых вариантах осуществления повторную иммунизацию можно проводить через примерно 7 лет после первоначальной иммунизации или лечения ИКД. В некоторых вариантах осуществления повторную иммунизацию можно проводить через примерно 10 лет после первоначальной иммунизации или лечения ИКД. В некоторых вариантах осуществления повторную иммунизацию можно проводить через примерно 15 лет после первоначальной иммунизации или лечения ИКД. В некоторых вариантах осуществления повторную иммунизацию можно проводить через примерно 20 лет после первоначальной иммунизации или лечения ИКД.

**[0154]** Вакцинные композиции по изобретению можно профилактически вводить пациентам практически одновременно со второй вакциной. В некоторых вариантах осуществления вакцинные композиции по изобретению можно вводить практически одновременно с вакциной против пневмонии, кори, эпидемического паротита, краснухи, комбинированной вакциной MMR, вакциной против ветряной оспы, комбинированной вакциной MMRV, вакциной против дифтерии, столбняка, коклюша, комбинированной вакциной DTP, конъюгированным *H. influenzae* типа В, инактивированным полиовирусом, вакциной против вируса гепатита В, менингококковым конъюгатом (например, четырехвалентной вакциной А-С-W135-У) или вакциной против респираторно-

синцитиального вируса.

**[0155]** Фармацевтические композиции, полипептиды или антигены по изобретению могут находиться в стандартных лекарственных формах, подходящих для однократного введения точных доз. В стандартной лекарственной форме фармацевтические композиции, полипептиды или антигены по изобретению могут быть разделены на единичные дозы, содержащие соответствующие количества одного или более соединений. Стандартная лекарственная форма может находиться в упаковке, содержащей дискретные количества препарата. Неограничивающими примерами являются жидкости во флаконах или ампулах. Водные суспензионные композиции могут быть упакованы в однодозовые повторно не закрывающиеся контейнеры. Многодозовые повторно закрывающиеся контейнеры можно использовать, например, в сочетании с консервантом. Препараты для парентерального введения могут быть предоставлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или многодозовых контейнерах с консервантом.

**[0156]** В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или PSIII) можно вводить субъекту в диапазоне количеств от примерно 5 мкг до примерно 50 мкг, от примерно 50 мкг до примерно 100 мкг, от примерно 100 мкг до примерно 150 мкг, от примерно 150 мкг до примерно 200 мкг, от примерно 200 мкг до примерно 250 мкг, от примерно 250 мкг до примерно 300 мкг, от примерно 300 мкг до примерно 350 мкг, от примерно 350 мкг до примерно 400 мкг, от примерно 400 мкг до примерно 450 мкг, от примерно 450 мкг до примерно 500 мкг, от примерно 500 мкг до примерно 600 мкг или от примерно 600 мкг до примерно 750 мкг. В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или PSIII) можно вводить субъекту в диапазоне количеств от примерно 5 мкг до примерно 250 мкг. В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или PSIII) можно вводить субъекту в диапазоне количеств от примерно 5 мкг до примерно 50 мкг. В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или PSIII) можно вводить субъекту в диапазоне количеств от примерно 100 мкг до примерно 250 мкг. В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или PSIII) можно вводить субъекту в диапазоне количеств от примерно 250 мкг до примерно 500 мкг.

**[0157]** В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или PSIII) можно вводить субъекту в количестве примерно 10 мкг, примерно 20 мкг, примерно 30 мкг, примерно 40 мкг, примерно 50 мкг, примерно 60 мкг, примерно 70 мкг, примерно 80 мкг, примерно 90 мкг, примерно 100 мкг, примерно 120 мкг, примерно 140 мкг, примерно 160 мкг, примерно 180 мкг или примерно 200 мкг. В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или PSIII) можно вводить субъекту в количестве примерно 200 мкг, примерно 250 мкг, примерно 300 мкг, примерно 350 мкг, примерно 400 мкг, примерно 450 мкг, примерно 500 мкг, примерно 550 мкг, примерно 600 мкг, примерно 650 мкг, примерно 700 мкг или примерно 750 мкг. В некоторых вариантах осуществления антиген по изобретению (например, PSI, PSII или



[0161] В некоторых вариантах осуществления анатоксин В по изобретению или его фрагмент можно вводить субъекту в количестве примерно 10 мкг, примерно 20 мкг, примерно 30 мкг, примерно 40 мкг, примерно 50 мкг, примерно 60 мкг, примерно 70 мкг, примерно 80 мкг, примерно 90 мкг, примерно 100 мкг, примерно 120 мкг, примерно 140 мкг, примерно 160 мкг, примерно 180 мкг или примерно 200 мкг. В некоторых вариантах осуществления анатоксин В по изобретению или его фрагмент можно вводить субъекту в количестве примерно 40 мкг. В некоторых вариантах осуществления анатоксин В по изобретению или его фрагмент можно вводить субъекту в количестве примерно 40 мкг. В некоторых вариантах осуществления анатоксин В по изобретению или его фрагмент можно вводить субъекту в количестве примерно 60 мкг.

[0162] В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению, вводимая субъекту, может содержать по меньшей мере примерно 5-200 мкг полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile* или его конъюгата; по меньшей мере примерно 1-100 мкг полипептида первого анатоксина *C. difficile* или его фрагмента и по меньшей мере примерно 1-100 мкг полипептида второго анатоксина *C. difficile* или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению, вводимая субъекту, может содержать по меньшей мере примерно 50 мкг полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile* или его конъюгата; по меньшей мере примерно 5 мкг полипептида первого анатоксина *C. difficile* или его фрагмента и по меньшей мере примерно 5 мкг полипептида второго анатоксина *C. difficile* или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению, вводимая субъекту, может содержать по меньшей мере примерно 100 мкг полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile* или его конъюгата; по меньшей мере примерно 10 мкг полипептида первого анатоксина *C. difficile* или его фрагмента и по меньшей мере примерно 10 мкг полипептида второго анатоксина *C. difficile* или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция по изобретению, вводимая субъекту, может содержать по меньшей мере примерно 200 мкг полисахарида клеточной поверхности из *C. difficile* или его конъюгата; по меньшей мере примерно 20 мкг полипептида первого анатоксина *C. difficile* или его фрагмента; и по меньшей мере примерно 20 мкг полипептида второго анатоксина *C. difficile* или его фрагмента.

#### **Способы применения**

[0163] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложены способы профилактического снижения патологических эффектов или предотвращения ИКД у субъекта, где способ включает введение субъекту очищенного полисахарида клеточной поверхности PSII или очищенного конъюгата полисахарида клеточной поверхности PSII и по меньшей мере одного полипептида, содержащего токсин А, токсин В или их нетоксичный иммуногенный полипептидный фрагмент. Композиции по изобретению направлены как на бактериальные поверхностные антигены, представленные на клетках *C. difficile*, так и на бактериальные токсины, продуцируемые клетками *C. difficile*. Вакцинальные композиции по изобретению можно использовать для предотвращения ИКД

или предотвращения рецидива ИКД. Сывороточные антитела против поверхностных компонентов *C. difficile* обнаруживают у пациентов с симптоматической ИКД или у бессимптомных носителей *C. difficile*.

**[0164]** В некоторых вариантах осуществления вакцинные композиции по изобретению можно использовать для иммунизации субъекта, который иммунологически не контактировал с *C. difficile*, то есть, человека, который ранее не подвергался воздействию *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления вакцинные композиции по изобретению можно использовать для терапевтической иммунизации, например, для предотвращения последующей ИКД или рецидива ИКД.

**[0165]** В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложены способы индукции иммунного ответа у субъекта против *C. difficile*, где способ включает введение субъекту определенного количества иммуногенной композиции, содержащей очищенный полисахарид клеточной поверхности PSII или очищенный конъюгат полисахарида клеточной поверхности PSII и по меньшей мере один из токсина А, токсина В или их фрагмента.

**[0166]** В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению могут вызывать клеточно-опосредованный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению могут вызывать гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению могут вызывать системный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению могут вызывать иммунный ответ слизистой оболочки. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению могут вызывать усиленный системный иммунный ответ и усиленный иммунный ответ слизистой оболочки.

**[0167]** В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения, предотвращения или подавления проявлений или симптомов инфекции, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, который нуждается в этом.

**[0168]** В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения инфекции, включающий: (а) введение терапевтически эффективного количества композиции или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, который нуждается в этом; где инфекция представляет собой инфекцию *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); (b) после введения фармацевтической композиции сбор образца фекалий у субъекта; и (c) анализ образца фекалий и определение изменения количества колониеобразующих единиц (КОЕ)/мг *C. difficile* в фекалиях в качестве маркера инфекции.

**[0169]** В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения инфекции, включающий введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (а) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и

(b) полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, где полипептид содержит анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; где введение выполняют еженедельно или раз в две недели, и где инфекция вызвана *C. difficile*.

[0170] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ, включающий: (a) выбор субъекта из группы, состоящей из: (i) первого субъекта, который старше 55 лет; (ii) второго субъекта, который в анамнезе перенес инфекцию *C. difficile* в пределах 6-месячного периода; и (iii) третьего субъекта, который имеет положительное количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мг *C. difficile*; и (b) введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* и полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, где полипептид содержит анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

[0171] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения инфекции, включающий: (a) получение информации о генетической последовательности биологического образца, полученного от субъекта, для определения наличия инфекции, где инфекция представляет собой инфекцию *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

[0172] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения инфекции, включающий введение субъекту, который нуждается в этом: (a) терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению; и (b) терапевтического средства; где инфекция вызвана *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*).

[0173] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения инфекции, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), где введение вызывает увеличение количества иммуноглобулина М (IgM), специфичного к полисахариду клеточной поверхности, по меньшей мере примерно в 250 раз в сравнении с отсутствием фармацевтической композиции.

[0174] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению могут вызывать усиленный иммунный ответ  $T_H1$  или иммунный ответ  $T_H2$ . В некоторых вариантах осуществления усиленный ответ  $T_H1$  может включать увеличение количества CTL, увеличение количества цитокинов, связанных с иммунным ответом  $T_H1$ , увеличение количества активированных макрофагов, увеличение активности NK или увеличение продуцирования IgG2a. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ  $T_H1$  приводит к увеличению уровней цитокинов, например, IL-2, IFN $\gamma$  и TNF $\beta$ .

[0175] В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ  $T_H1$  вызывают с использованием адьюванта  $T_H1$ . В некоторых вариантах осуществления адьювант  $T_H1$

может вызывать продуцирование IgG2a на повышенных уровнях в сравнении с иммунизацией антигеном без адьюванта T<sub>H1</sub>. В некоторых вариантах осуществления адьювант T<sub>H1</sub> представляет собой препарат сапонина, виросому, вирусоподобную частицу, нетоксичные производные энтеробактериального липополисахарида (LPS) или иммуностимулирующие олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG).

**[0176]** В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ T<sub>H2</sub> включает увеличение уровней цитокина, связанного с иммунным ответом T<sub>H2</sub>; или увеличение продуцирования IgG1, IgE, IgA и В-клеток памяти. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-4, IL-5, IL-6 или IL-10. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ T<sub>H2</sub> включает увеличение продуцирования IgG1.

**[0177]** В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ T<sub>H2</sub> можно вызывать с использованием адьюванта T<sub>H2</sub>. Адьювант T<sub>H2</sub> может вызывать продуцирование IgG1 на повышенных уровнях в сравнении с иммунизацией антигеном без адьюванта. В некоторых вариантах осуществления адьюванты T<sub>H2</sub> представляют собой содержащую минералы композицию, масляную эмульсию, либо АДФ-рибозилирующий токсин или его обезвреженные производные. В некоторых вариантах осуществления содержащая минералы композиция представляет собой соль алюминия.

**[0178]** В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат адьювант T<sub>H1</sub> и адьювант T<sub>H2</sub>, которые вызывают усиленный ответ T<sub>H1</sub> и усиленный ответ T<sub>H2</sub>. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая адьювант T<sub>H1</sub> и адьювант T<sub>H2</sub>, вызывает увеличение продуцирования IgG1 и IgG2a. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению, содержащие адьювант T<sub>H1</sub> и адьювант T<sub>H2</sub>, могут вызывать повышенный иммунный ответ T<sub>H1</sub> или повышенный иммунный ответ T<sub>H2</sub> в сравнении с иммунизацией одним адьювантом, например, в сравнении с иммунизацией только адьювантом T<sub>H1</sub> или иммунизацией только адьювантом T<sub>H2</sub>.

**[0179]** В некоторых вариантах осуществления способы и композиции по изобретению могут усиливать иммунный ответ (например, анти-PSII IgG) у субъекта примерно в 2 раза, примерно в 3 раза, примерно в 4 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз, примерно в 10 раз, примерно в 11 раз, примерно в 12 раз, примерно в 13 раз, примерно в 14 раз, примерно в 15 раз, примерно в 16 раз, примерно в 17 раз, примерно в 18 раз, примерно в 19 раз, примерно в 20 раз, примерно в 21 раз, примерно в 22 раза, примерно в 23 раза, примерно в 24 раза, примерно в 25 раз, примерно в 26 раз, примерно в 27 раз, примерно в 28 раз, примерно в 29 раз, примерно в 30 раз, примерно в 31 раз, примерно в 32 раза, примерно в 33 раза, примерно в 34 раза, примерно в 35 раз, примерно в 36 раз, примерно в 37 раз, примерно в 38 раз, примерно в 39 раз, примерно в 40 раз, примерно в 41 раз, примерно в 42 раза, примерно в 43 раза, примерно в 44 раза, примерно в 45 раз, примерно в 46 раз, примерно в 47 раз,



примерно в 48 раз, примерно в 49 раз или примерно в 50 раз.

[0180] Вакцинные композиции по изобретению можно применять терапевтически. Первичная профилактика представляет собой предотвращение заболевания или повышение устойчивости к заболеванию, которое еще не возникло. Вторичная профилактика представляет собой меры, принимаемые для предотвращения рецидива уже возникшего заболевания. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению можно вводить субъекту для первичной профилактики, например, для предотвращения ИКД или повышения устойчивости к ИКД. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по изобретению можно вводить субъекту для вторичной профилактики, например, для предотвращения рецидива ИКД.

[0181] В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может предотвращать симптомы ИКД. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может облегчать симптомы ИКД. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по изобретению может снижать частоту или тяжесть характерных симптомов ИКД, например, диареи, воспаления кишечника, некроза тканей желудочно-кишечного тракта, снижения массы тела или накопления жидкости в кишечнике, в сравнении с не иммунизированным субъектом.

#### **Выбор пациентов**

[0182] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения инфекции, включающий: (а) выбор субъекта из группы, состоящей из: (i) первого субъекта, который старше 55 лет; (ii) второго субъекта, который в анамнезе перенес инфекцию *C. difficile* в пределах 6-месячного периода; и (iii) третьего субъекта, который имеет положительное количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мг *C. difficile*; и (b) введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и полипептид, содержащий анатоксин *C. difficile* или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления субъект подвергается высокому риску заражения ИКД, такие субъекты включают пожилых людей, взрослых с плановой госпитализацией, жителей домов для престарелых и пациентов с сопутствующими заболеваниями, требующими длительного применения антибиотиков.

#### **Комбинированная терапия**

[0183] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению можно применять для профилактики или лечения ИКД в сочетании с по меньшей мере одним дополнительным средством. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное средство можно вводить одновременно с композицией или вакциной. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное средство можно вводить последовательно с композицией или вакциной. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антибиотик, например, ванкомицин, фидаксомицин, метронидазол или рифаксимин. В некоторых вариантах осуществления антибиотик представляет собой ванкомицин. В

некоторых вариантах осуществления антибиотик представляет собой фидаксомицин. В некоторых вариантах осуществления антибиотик представляет собой метронидазол. В некоторых вариантах осуществления антибиотик представляет собой рифаксимин.

#### **Сопутствующее диагностическое средство**

[0184] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, предложен способ лечения инфекции, включающий: (а) проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) или теста амплификации нуклеиновой кислоты (ТАНК) на биологическом образце для определения наличия инфекции, где инфекция представляет собой инфекцию *C. difficile*; и (б) введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности или конъюгат полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и полипептид, содержащий анатоксин *C. difficile*.

[0185] Для использования по настоящему изобретению подходят различные способы и анализы для определения наличия ИКД. Неограничивающие примеры анализов включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР), количественную ПЦР (кПЦР), ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), секвенирование по Сэнгеру, определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), микрочипы, саузэрн-блоттинг, нозерн-блоттинг, вестерн-блоттинг, истерн-блоттинг, окрашивание ГЭ, микроскопическую оценку опухолей, массовое параллельное секвенирование (MPS), секвенирование ДНК следующего поколения (NGS) (например, экстракцию, очистку, количественную оценку и амплификацию ДНК, создание библиотеки), иммуногистохимические (ИГХ) методы, количественное определение белка, хромогенную гибридизацию *in situ* (CISH) и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH).

#### **Наборы**

[0186] Настоящее изобретение также относится к наборам. Наборы включают вакцинную композицию по изобретению в упаковке и письменный материал, который может включать инструкции по применению, описание клинических исследований, перечень побочных эффектов и тому подобное. Такие наборы также могут включать информацию, такую как ссылки на научную литературу, вкладыши в упаковку, результаты клинических испытаний и/или их краткое изложение и тому подобное, которая указывает или устанавливает активность и/или преимущества композиции, и/или которая описывает дозировку, способ введения, побочные эффекты, взаимодействие лекарственных средств, или другую информацию, полезную для поставщика медицинских услуг. Такая информация может быть основана на результатах различных исследований, например исследований с использованием экспериментальных животных в моделях *in vivo* и исследований, основанных на клинических испытаниях с участием людей. Набор может дополнительно включать другое средство. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по настоящему изобретению и средство предоставляют в виде отдельных композиций в отдельных контейнерах в составе набора. В некоторых вариантах осуществления вакцинную композицию по настоящему изобретению и средство

предоставляют в виде одной композиции в контейнере набора. Подходящая упаковка и дополнительные предметы для использования (например, мерный стаканчик для жидких препаратов, упаковка из фольги для минимизации воздействия воздуха и тому подобное) известны в данной области и могут быть включены в набор. Описанные в настоящем документе наборы можно предоставлять, продавать и/или рекламировать поставщикам медицинских услуг, включая врачей, медсестер, фармацевтов, составителей справочников и так далее. В некоторых вариантах осуществления наборы также можно продавать непосредственно потребителю.

#### ПРИМЕРЫ

##### **Пример 1. Очистка полисахарида PSII**

[0187] *Стадия 1. Посевная культура.* 2 мл замороженной с глицерином маточной суспензии штамма 8271 *C. difficile* размораживали и использовали для инокуляции 100 мл среды PSII в колбу с перегородками емкостью 500 мл. Инокулированную культуру инкубировали при 37°C в анаэробной среде в течение 16-18 часов до достижения культурой OD<sub>600</sub> 3,5-4,5.

[0188] *Стадия 2. Ферментер (инокуляция).* 30 мл посевной культуры использовали для инокуляции ферментера, содержащего 10 л среды PSII, которую барботировали азотом до достижения уровня растворенного кислорода, составляющего 0%.

[0189] *Стадия 3. Ферментация (рост).* Культуру объемом 10 л выращивали при температуре 37°C ± 1,0°C в течение 16-18 часов, перемешивая со скоростью 225 об/мин при постоянном барботировании азотом. Клетки собирали по достижении OD<sub>600</sub> 4,0 ± 0,5.

[0190] *Стадия 4. Сбор клеток.* Клетки центрифугировали в центрифуге с бакет-ротором при 8000 g в течение 15 минут при 22°C. Клетки промывали 1X PBS и вновь центрифугировали в тех же условиях. Полученную клеточную пасту затем замораживали при температуре менее -20°C.

[0191] *Стадия 5. Снятие поверхностного слоя клеток.* Клеточную пасту размораживали при температуре окружающей среды и ресуспендировали 4 мл/г влажной клеточной пасты в 0,5% растворе дезоксихолата натрия, приготовленном в фосфатно-солевом буфере (PBS). Ресуспендированный материал инкубировали при 60±2°C в течение 24 часов, встряхивая при 225 об/мин. После инкубации нерастворимый материал удаляли центрифугированием при 13851 g в течение 15 минут при 37°C и собирали супернатант.

[0192] *Стадия 6. Осаждение этанолом.* К супернатанту клеток после стадии снятия поверхностного слоя добавляли абсолютный (100%) этанол до конечной концентрации 20%. Раствор инкубировали при 4°C в течение 60 минут, а затем центрифугировали при 15000 g в условиях 4°C и собирали супернатант.

[0193] *Стадия 7. Осаждение трихлоруксусной кислотой (ТХУ) 1.* К 4 объемам супернатанта после осаждения этанолом добавляли 1 объем ТХУ (6,12 M). Раствор инкубировали при 4°C в течение 10 мин. После инкубации раствор центрифугировали при 20000 g в течение 15 минут при 4°C и собирали супернатант. Супернатант фильтровали через 0,45-мкм фильтр.

**[0194]** *Стадия 8. Ультрафильтрация/диафильтрация (УФ/ДФ) 1.* Супернатант после осаждения ТХУ подвергали диафильтрации методом тангенциальной проточной фильтрации (ТПФ), используя фильтр с отсечкой по молекулярной массе (MW) 1 кДа и 10 объемов 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,0).

**[0195]** *Стадия 9. Хроматография гидрофобного взаимодействия на фенил-сефарозе.*

Колонка: Твердый сульфат аммония добавляли к PSII после УФ/ДФ 1 до конечной концентрации 2 М. рН раствора доводили до 7,0, и полученный раствор фильтровали через 0,45-мкм фильтр. Затем материал наносили на колонку Fast Flow с фенил-сефарозой, уравновешенную 10 мМ натрий-фосфатным буфером и 2 М сульфатом аммония (рН 7,0). Колонку промывали 3 объемами колонки уравнивающего буфера. Проточную и промывочную фракции с колонки объединяли.

**[0196]** *Стадия 10. УФ/ДФ 2.* Объединенные проточную и промывочную фракции со стадии 9 подвергали диафильтрации методом ТПФ с использованием фильтра с отсечкой по молекулярной массе 1 кДа и 10 объемов 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 8,0).

**[0197]** *Стадия 11. Анионообменная хроматография на колонке с Q-сефарозой.* PSII после диафильтрации со стадии 10 наносили на колонку с Q-сефарозой, уравновешенную 10 мМ натрий-фосфатным буфером (рН 8,0). Колонку промывали 5 объемами колонки уравнивающего буфера и затем элюировали 2,5 объемами колонки 10 мМ натрий-фосфатного буфера с 300 мМ NaCl (рН 8,0).

**[0198]** *Стадия 12. Осаждение ТХУ 2.* К 4 объемам элюата с колонки Q-сефарозы добавляли 1 объем ТХУ (6,12 М). Раствор инкубировали при 4°C в течение 10 мин. После инкубации раствор центрифугировали при 20000 g в течение 15 минут при 4°C и собирали супернатант. Супернатант фильтровали через 0,45-мкм фильтр.

**[0199]** *Стадия 13. УФ/ДФ 3.* Отфильтрованный супернатант со стадии 12 подвергали диафильтрации методом ТПФ, используя фильтр с отсечкой по молекулярной массе 1 кДа и 10 объемов воды.

**[0200]** *Стадия 14. Окончательное концентрирование на 3-кДа фильтре.* PSII, полученный на стадии 13, наносили на центробежные фильтры с отсечкой по MW 3 кДа и концентрировали центрифугированием при 8000 g в течение 30 минут при 4°C. Оставшийся PSII промывали 3 раза водой, повторяя стадию центрифугирования. Конечный материал разделяли на аликвоты и хранили при -20°C.

**[0201]** *Анализ содержания полисахаридов в очищенном PSII.* Содержание полисахаридов в PSII определяли колориметрическим анализом (с антроном или резорцином).

**[0202]** *Определение MW методами эксклюзионной хроматографии и многоуглового лазерного светорассеяния (ЭХ-МУЛС):* MW и полидисперсность PSII анализировали методом эксклюзионной хроматографии и многоуглового лазерного светорассеяния (ЭХ-МУЛС). При использовании dn/dc 0,137 определяемая средняя MW PSII составляла 8,8 кДа с чрезвычайно низкой полидисперсностью. MW округляли до 10 кДа для расчета молярного

соотношения PSII:CRM. На Фиг. 1 показаны результаты анализа PSII методом ЭХ-МУЛС и соответствующие параметры.

[0203] Моносахаридный состав очищенного PSII после кислотного гидролиза определяли с использованием высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектором (ВЭАОХ-ИАД). Результаты показали наличие глюкозы, N-ацетилгалактозамина и маннозы в соотношении 3:2:1, что соответствует известному составу PSII. При анализе наблюдали лишь незначительные количества N-ацетилглюкозамина.

[0204] На **ФИГ. 6** показаны стадии снятия поверхностного слоя с клеток *C. difficile* с использованием дезоксихолата натрия (DOC) для очистки PSII. На **ФИГ. 7** показана процедура стадии экстракции 20% этанолом и осаждения при очистке PSII. На **ФИГ. 8** показана процедура первого осаждения ТХУ экстрагированного 20% этанолом материала при очистке PSII. На **ФИГ. 9** показана процедура ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ 1) PSII после первого осаждения ТХУ и добавления сульфата аммония в препарат для стадии хроматографии гидрофобного взаимодействия на колонке с фенил-сефарозой. На **ФИГ. 10** показана процедура нанесения материала после УФ/ДФ 1 на колонку с фенил-сефарозой и сбора проточной и промывочной фракций. На **ФИГ. 11** показана процедура второй стадии УФ/ДФ (УФ/ДФ-2) объединенных фракций с колонки с фенил-сефарозой при подготовке для разделения методом анионообменной хроматографии на колонке с Q-сефарозой. На **ФИГ. 12** показана процедура нанесения материала после УФ/ДФ-2 на колонку с Q-сефарозой и элюирования PSII с использованием 10 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 300 мМ NaCl (15% буфера В). На **ФИГ. 13** показана процедура второго осаждения ТХУ элюата с колонки с Q-сефарозой. На **ФИГ. 14** показана процедура ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ-3) PSII после второго осаждения ТХУ в воде. На **ФИГ. 15** показана процедура концентрирования материала после УФ/ДФ-3 на центробежном фильтре с порогом отсечения по MW 3 кДа. В Таблице 3 приведено описание процедуры очистки PSII.

**ТАБЛИЦА 3**

Номер стадии	Процедура
1	Снятие поверхностного слоя клеток
2	Центрифугирование
3	Осаждение этанолом
4	Центрифугирование
5	Осаждение ТХУ 1
6	Центрифугирование
7	УФ/ДФ 1
8	Фенил-сефароза-6 FF (высокое значение sb)
9	УФ/ДФ 2

10	Q-сефароза HP
11	Осаждение ТХУ 2
12	УФ/ДФ 3
13	Центробежный фильтр 3 кДа
14	Хранение: -20°C; 20 мг/мл

### Пример 2. Химическая конъюгация для получения конъюгатов PSII

**[0205]** Были получены четыре различных конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> с использованием химии восстановительного аминирования, опосредованного периодатом (RedAm), химии цианилирования (CDAP), химии окисления-аминирования TEMPO (TEMPO) и клик-химии аминокси-тиольного концевое связывания (концевое связывание). С помощью химических реакций RedAm, CDAP и TEMPO можно было создавать несколько точек присоединения между PSII и CRM<sub>197</sub>, что приводило к образованию высокомолекулярных конъюгатов, образующих «решетчатые» структуры (Фиг. 2). При использовании клик-химии концевое связывание между цепью PSII и CRM<sub>197</sub> была создана только одна точка присоединения, что приводило к образованию конъюгата со «звездчатой» структурой (Фиг. 2).

**[0206]** *Получение дериватизированного CRM<sub>197</sub>.* EcoCRM<sup>®</sup> CRM<sub>197</sub> использовали для всех способов конъюгации. Использовали гидразид- или малеимид-дериватизированный CRM<sub>197</sub> в зависимости от метода конъюгации.

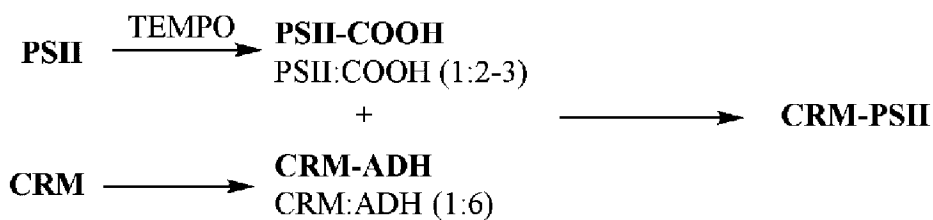
**[0207]** *Получение CRM<sub>197</sub>-ADH.* Раствор EcoCRM<sup>®</sup> с концентрацией 10 мг/мл разводили до концентрации 4 мг/мл в 0,1 М буфере MES с pH 6,0 и объединяли с равным объемом 0,5 М дигидрида адипиновой кислоты (ADH) в 0,1 М буфере MES, pH 6. Затем готовили раствор EDAC в концентрации 5 мг/мл из исходного раствора с концентрацией 100 мг/мл. Через 2 часа pH раствора повышали до 8 и реагенты удаляли диализом. С использованием анализа TNBS определяли гидразидное соотношение, которое составляло 6 ADH/CRM. Желаемый продукт получали с выходом около 70%. CRM-ADH, как и другие ADH-дериватизированные белки, прилипал к колонкам ВЭЖХ-ЭХ, не давая возможности получения чистых хроматограмм. В анализе методом SDS-ПААГ наблюдали одну полосу для CRM-ADH (данные не представлены).

**[0208]** *Получение CRM-малеимида.* EcoCRM<sup>®</sup> в концентрации 5 мг/мл метили 25х N-γ-малеимидобутирил оксисукцинимидным эфиром (GMBS) при pH 7,2 в течение 1 часа, обессоливали с использованием устройства для тангенциальной проточной фильтрации Vivaflow 10 кДа и заменяли буфер на 10 mM фосфат натрия/10 mM ЭДТА, pH 6,8, + 5% сахара. Продукт CRM-малеимид разделяли на аликвоты и хранили при -80°C до использования. Относительное содержание малеимида количественно определяли путем реакции тиолов цистеина, оно составляло в среднем 15 фрагментов малеимида/CRM. Типичный выход реакции превышал 80%.

**[0209]** *Получение полисахарида PSII.* Сырой PSII растворяли в ДИ воде, получая раствор с концентрацией 50 мг/мл. Объем раствора PSII уменьшали вдвое, используя

центрибежный прибор Amicon Ultra 4 с отсечкой по MW 3 кДа. Раствор доводили до исходного объема ДИ водой, и объем вновь уменьшали до половины путем центрифугирования со скоростью 4000 об/мин. Процесс повторяли 4-5 раз, полученный раствор лиофилизировали, с получением чистого PSII. Альтернативно, готовили раствор неочищенного PSII с концентрацией 100 мг/мл в ДИ H<sub>2</sub>O. Солюбилизованный материал PSII очищали и лиофилизировали, используя метод с колонкой Zeba 7 кДа, получая чистый продукт. Количество чистого PSII, собранного данным методом, варьировалось в пределах 50-75% от исходной сырой массы.

**[0210]** *Синтез конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub>*. Были получены конъюгаты капсульного полисахарида PSII *C. difficile* с белком-носителем CRM<sub>197</sub>. (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (TEMPO)-опосредованное окисление и химия тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) были использованы для функционализации повторяющихся звеньев вдоль полимерной цепи. Окисление PSII за счет TEMPO приводило к образованию карбоксильных групп, которые впоследствии были конъюгированы с гидразид-derivатизированным CRM<sub>197</sub> при помощи 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC). CDAP-активированный PSII был derivатизирован аминами, тиолирован и связан с малеимид-derivатизированным CRM<sub>197</sub>. В третьем методе была использована химия восстановительного аминирования для derivатизации конца полимера одной тиоловой группой. Затем тиолированный PSII конъюгировали с малеимид-derivатизированным CRM<sub>197</sub>. TEMPO и CDAP активировали несколько гидроксильных групп и приводили к образованию «решетчатых» конъюгатов. Третий метод конъюгации через концевой редуцирующий сахар не вызывал сшивания, что приводило к получению конъюгата с более низкой молекулярной массой. На Фиг. 2 приведен обзор химических схем TEMPO, CDAP и аминокси-конъюгации.

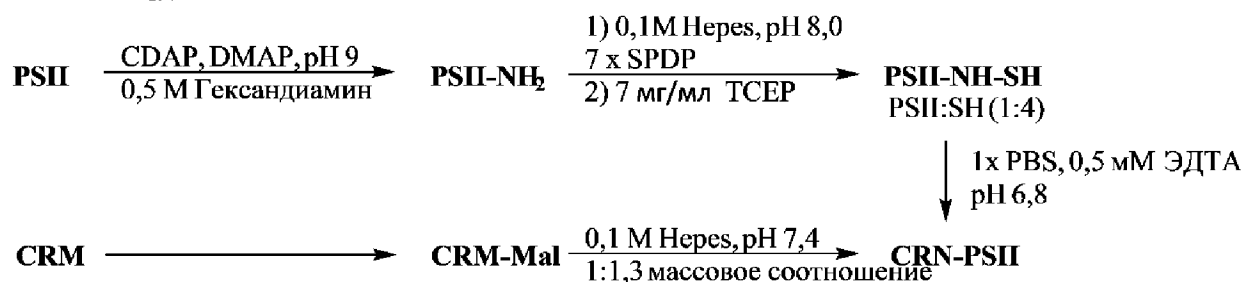


### Схема 1

**[0211]** *А) Окисление TEMPO/конъюгация EDC PSII*. На схеме 1 показан метод TEMPO для конъюгации PSII-CRM<sub>197</sub>. PSII растворяли в воде до концентрации 10 мг/мл. К раствору добавляли 30 мкл TEMPO (10 мг/мл в воде) на мл раствора PSII, с последующим добавлением 6,25 мкл NaBr (100 мг/мл в воде). Затем pH смеси повышали до 9,0 с помощью 0,1 М NaOH. Полученный раствор охлаждали и добавляли 2,5 мкл 14,5% раствора гипохлорита натрия на мл раствора. pH раствора поддерживали на уровне 9 в течение 1,5 часов и добавляли 25 мкл этанола на мл раствора. Полученную смесь перемешивали в течение 15 мин. Раствор разбавляли водой, обессоливали в воду на центрифуге Amicon Ultra 4 (порог отсечения 3 кДа) и лиофилизировали. Степень окисления оценивали путем аминирования EDAC, с получением соотношения амин:PSII, составляющего 3-4 на PSII.

**[0212]** EDAC-конъюгация PSII с CRM-ADH. PSII-COOH (10 мг/мл) и CRM-ADH (~8,2 мг/мл) смешивали в соотношении 1,6:1. Добавляли 1 М буфер MES с pH 6 для получения конечной концентрации 0,1 М буфер MES и pH 6. К раствору добавляли EDC, растворенный в минимальном количестве воды, для получения конечной концентрации 10 мг/мл в реакционной смеси. Проводили реакцию реакционной смеси в течение 2 час при комнатной температуре и далее в течение ночи (15 часов) при 4°C. Конъюгат очищали, используя колонку Superdex 200 (диаметр 1,6, высота 60 см). Начальные элюируемые фракции объединяли и концентрировали с использованием ячейки Amicon высокого давления с мембраной, имеющей порог отсеивания 30 кДа. Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм, и количество PSII оценивали методом с резорцином. Конечная концентрация PSII составляла ~1,2 мг/мл; CRM<sub>197</sub> 2,1 мг/мл; 0,57 мг PSII/мг CRM; соотношение PSII:CRM<sub>197</sub> от 3:1 до 4:1. Полученный конъюгат анализировали методом ЭХ-МУЛС, но извлечение с колонки ВЭЖХ было неудовлетворительным. На Фиг. 3, верхней панели, представлена кривая ЭХ-МУЛС для конъюгата TEMPO/EDC/CRM<sub>197</sub>. На нижней панели представлена сводка аналитических параметров конъюгата TEMPO/EDC/CRM<sub>197</sub>.

**[0213]** В) Тиоэфирная CDAP-конъюгация PSII. На схеме 2 показан метод конъюгации PSII-CRM<sub>197</sub> с использованием CDAP-конъюгации.



### Схема 2

**[0214]** Аминирование PSII. PSII растворяли в солевом растворе в концентрации 20 мг/мл. К раствору добавляли 200 мкл/мл 2,5 М DMAP, и pH раствора доводили до pH 9 на ледяной бане. Активацию начинали добавлением 100 мкл CDAP на мл раствора с использованием маточного раствора 100 мг/мл в ацетонитриле. pH раствора поддерживали на уровне 9, используя 0,1 М NaOH. Через 10 мин добавляли 500 мкл 0,5 М 1,6-гександиамина на мл раствора. Через 1 час при 4°C раствор PSII обессоливали на колонке Zeba, и элюент лиофилизировали. Степень аминирования определяли с использованием TNBS, и результаты показали 3-4 амина на PSII.

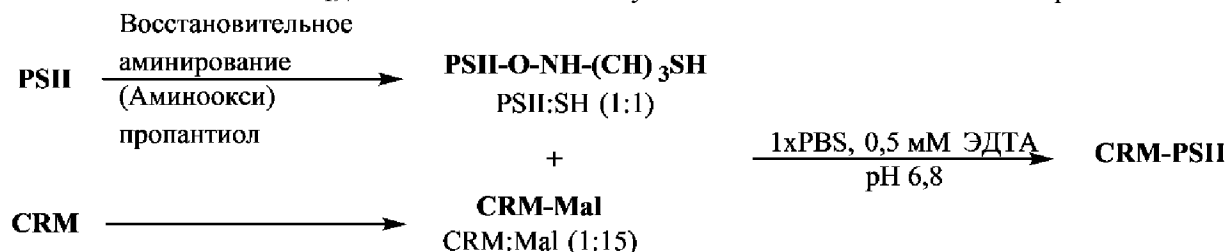
**[0215]** Тиолирование PSII-NH<sub>2</sub>. PSII-NH<sub>2</sub> растворяли до концентрации 3,5 мг/мл в 0,1 М NEPES, pH 8. SPDP добавляли в избытке из 0,1 М маточного раствора, приготовленного в ДМСО. Через 1,5 часа с продукта снимали защиту с помощью ТСЕР и обессоливали в PBS+5 мМ ЭДТА, pH 6,8. Анализ DTNB показал наличие ~3-4 тиолов на PSII. Эффективность выхода реакции составляла 80%.

**[0216]** Конъюгация PSII-SH с CRM-малеимидом. PSII-SH и CRM-малеимид объединяли в соотношении 1,3:1 по массе. Конъюгат очищали на колонке Superdex 200



(диаметр 1,6, высота 60 см), уравновешенной PBS. Очищенный материал концентрировали, используя ячейку Amicon высокого давления с мешалкой и мембраной с порогом отсечения 30 кДа. Конъюгат анализировали методами ЭХ, ЭХ-МУЛС, методом с резорцином и определением OD<sub>280</sub>. Выход конъюгата, рассчитанный по массе PSII в конъюгате, составлял 33%. На Фиг. 4, верхних панелях, представлены полученные методом ЭХ-МУЛС кривые для CRM-малеимида и PSII-CRM<sub>197</sub>. На средней панели представлена кривая ЭХ конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, полученного методом CDAP. На нижней панели представлены аналитические параметры, использованные для анализа конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, полученного методом CDAP.

[0217] *С) Связанный концами PSII.* На схеме 3 представлен обзор метода конъюгации PSII-CRM<sub>197</sub> с использованием пути восстановительного аминирования.



### Схема 3

[0218] *Реакция восстановительного аминирования/концевого тиолирования PSII.* PSII растворяли в ДМСО до концентрации 5 мг/мл. Добавляли 5 эквивалентов 1-аминоокси-3-тиолпропана. После перемешивания полученного раствора в течение 30 минут добавляли 6 эквивалентов триацетоксиборгидрида натрия. Реакционную смесь дополнительно перемешивали в течение 18 часов при 50°C. Затем полученную смесь охлаждали и осаждали PSII этанолом. Осадок собирали центрифугированием. Осадок повторно растворяли в воде, дополнительно очищали с помощью центрифужного устройства Amicon Ultra-4 с отсечкой 3 кДа и лиофилизировали. Выход реакции составлял 85%.

[0219] *Конъюгация тиолированного на конце PSII с малеимид-CRM<sub>197</sub>.* PSII-тиол растворяли до концентрации примерно 10 мг/мл в ДИ воде и добавляли ТСЕР до достижения конечной концентрации 6 мг/мл. После инкубации в течение 1 часа продукт очищали с помощью центрифужного устройства Amicon Ultra-4 с отсечкой 3 кДа, с последующим обессоливанием на спин-колонке Zeba (порог отсечения 7 кДа) в конечный буфер PBS+ЭДТА, pH 6,8. Тиол анализировали с использованием DTNB, результаты показали соотношение примерно 1 тиол/полимер PSII. CRM-малеимид (15 фрагментов малеимида/CRM) в концентрации 5 мг/мл объединяли примерно с 8 тиолами на CRM. После реакции в течение ночи конъюгат очищали на колонке Superdex 200, уравновешенной PBS. Очищенный конъюгат концентрировали, используя ячейку Amicon высокого давления с мешалкой и мембраной с порогом отсечения 10 кДа. Конъюгат анализировали методами ЭХ, ЭХ-МУЛС, методом с резорцином и определением OD<sub>280</sub>. На Фиг. 5, панели А, представлены полученные методом ЭХ-МУЛС кривые для PSII-CRM<sub>197</sub> и CRM-малеимида. На панели В представлена полученная методом ЭХ кривая для PSII-

CRM. На панели С представлены аналитические параметры анализа методом ЭХ-МУЛС,  $OD_{280}$  ( $A_{280}$ ) и анализа с резорцином.

[0220] В Таблице 4 приведены сводные характеристики конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>.

**ТАБЛИЦА 4**

Химический метод	Активированная группа	Кол-во активных групп/PSII	Форма конъюгата
TEMPO/EDC	Первичный гидроксил	3-5 карбоксилов	Решетка
CDAP/ Тиоэфир	Гидроксилы	3-5 тиолов	Решетка
Восстановительное окисление/тиоэфир	Редуцирующий конец	1 тиол	Звезда

[0221] *Анализ углеводов.* Для анализа углеводных фрагментов использовали метод с резорцином/серной кислотой. Первоначально для анализа использовали очищенный PSII со стандартным раствором, приготовленным по сухой массе. Из-за неопределенности приготовления точного раствора стандарта PSII оценивали смесь N-Ас-Gal:Glu:Man 2:2:1 (пропорция, обнаруженная в повторяющейся группе PSII) и только глюкозу. И смесь N-Ас-Gal:Glu:Man 2:2:1, и только глюкоза приводили к получению сходных стандартных кривых. Глюкозу использовали в качестве стандарта при анализе углеводов.

[0222] *Анализ аминов и гидразидов.* Для количественного определения аминов и гидразидов использовали 2,4,6-тринитробензолсульфоновую кислоту (TNBS), используя глицин или дигидразид адипиновой кислоты, соответственно.

[0223] *Анализ тиолов.* Тиолы количественно определяли с использованием '5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (DTNB).

[0224] В Таблице 5 приведены конъюгаты PSII, полученные с использованием трех разных химических методов.

**ТАБЛИЦА 5**

Химический метод	PSII (мг)	CRM <sub>197</sub> (мг)	Мг/Мг	Моль/Мо ль	Объем	Мг PSII	MW (кДа)
TEMPO EDC	1,2*	2,1	0,57	3,3	5 мл	6 мг	328,7
	1,5**		0,7			7,5 мг	
CDAP тиоэфир	2***	4,5	0,44	2,6	7,5 мл	15 мг	837,5
Оксим/тиоэфир	1,7***	1,9	0,89	5,2	7,5 мл	12,75 мг	111,8

\* анализ с резорцином, стандарт - глюкоза

\*\* 1,25-кратная поправка на занижение оценки уровня глюкозы

\*\*\* Определение методом ЭХ-МУЛС

### **Пример 3. Профилактическая иммунизация и заражение *C. difficile***

[0225] Конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub> были получены химическими методами

конъюгации: методом восстановительного аминирования (RedAM), TEMPO или CDAP с использованием методов примера 1. Конъюгаты использовали для иммунизации мышей дозой 20 мкг в режиме 3-кратного введения с периодичностью раз в две недели, с последующим внутривенным (в/в) введением  $10^4$  колониеобразующих единиц (КОЕ) спор *C. difficile*. В модели профилактической иммунизации и заражения 3 из 5 мышей, иммунизированных конъюгатом CDAP, погибли от инфекции *C. difficile*. Ни одна мышь не погибла в группах, иммунизированных конъюгатами TEMPO и RedAM, но заметной защиты от заражения *C. difficile* не наблюдалось.

[0226] *Сбор образцов сыворотки.* Кровь у мышей собирали в пробирки для отделения сыворотки путем пункции подчелюстной вены с использованием стерильных ланцетов Goldenrod для животных перед первой иммунизацией (до иммунизации), в день 14 (~2 недели после первой иммунизации), в день 28 (~2 недели после второй иммунизации) и день 42 (~2 недели после третьей иммунизации). Пробирки с кровью хранили до 16-18 часов при температуре 2-8°C перед сбором сыворотки. После хранения кровь нагревали до температуры окружающей среды, а затем центрифугировали в микроцентрифуге при 10000 об/мин в течение 10 минут. Сыворотку над желеобразным сгустком собирали в маркированные микроцентрифужные пробирки. Объединенные и отдельные образцы сыворотки хранили при -20°C до использования в анализе.

[0227] *Сбор фекальных гранул.* Фекальные гранулы (1 гранула≈~25 мг) собирали в определенные моменты времени в предварительно взвешенные стерильные пробирки Эппендорф. Перед гомогенизацией к каждому образцу фекалий добавляли 500 мкл стерильного PBS+20% глицерина. После гомогенизации 60 мкл фекальной суспензии разливали в 2 стерильные пробирки Эппендорф и замораживали до готовности к посеву. Оставшуюся часть фекальной суспензии хранили замороженной до готовности образца для экстракции фекальной ДНК.

[0228] *Профилактическая иммунизация и заражение C. difficile в мышинной модели ИКД.* Мышей иммунизировали тестируемыми образцами внутримышечно 3 раза с интервалом в две недели. Образцы сыворотки собирали для оценки иммунных ответов перед каждой иммунизацией. После завершения 3-кратного введения доз с периодичностью раз в две недели мышам вводили коктейль антибиотиков, состоящий из канамицина (0,4 мг/мл), гентамицина (0,035 мг/мл), колистина (850 ед/мл), метронидазола (0,215 мг/мл) и ванкомицина (0,045 мг/мл), в питьевой воде в течение 5 дней. Коктейль антибиотиков в разведении 1:5 также вводили животным в/ж 3 раза в течение периода лечения для гарантии того, что каждое животное получало антибиотики до заражения. На пятый день мышам давали обычную питьевую воду. За день до заражения *C. difficile* мышей взвешивали, и массу тела усредняли для приготовления раствора клиндамицина, так что каждой мышке в/б вводили 10 мг/кг клиндамицина. На следующий день (день заражения 0) каждую мышку взвешивали, фекальные гранулы собирали, и мышам вводили в/ж  $\sim 10^4$  КОЕ спор *C. difficile* в 100 мкл PBS. Мышей наблюдали в отношении наличия симптомов и снижения массы тела после заражения. Периодически собирали фекальные гранулы для оценки увеличения

количества КОЕ с течением времени. Терминальный сбор крови проводили у всех оставшихся животных в последний день исследования. На ФИГ. 16 показана общая схема профилактической иммунизации и заражения в мышинной модели ИКД. В Таблице 6 показан ответ в виде анти-PSII IgG в день 42. Данные показывают, что конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub> вызывали продуцирование анти-PSII IgG антител у зараженных *C. difficile* и интактных мышей.

**ТАБЛИЦА 6**

Тестируемый препарат	Титры анти-PSII IgG антител в день 42	
	Незараженные (интактные мыши)	Зараженные <i>C. difficile</i> мыши
CDAP-конъюгат PSII	6400	32000
RedAm-конъюгат PSII	800	1600

**Пример 4. Вторичная профилактика, определяемая по колонизации фекалий и гуморальному ответу**

[0229] Модель вторичной профилактики ИКД использовали для определения того, имели ли мыши, которые были иммунологически примированы от первичной ИКД, усиление иммунного ответа после вакцинации вакцинным конъюгатом PSII. Группам мышей перед заражением *C. difficile* вводили коктейль из антибиотиков через зонд. Мышей наблюдали в отношении заболеваемости, смертности, снижения массы тела и других симптомов ИКД в течение 2-3 недель. Инфицированным мышам, или мышам, зараженным *C. difficile*, давали возможность выздороветь до достижения мышами нормальной массы тела. Затем для каждой мыши проводили исходный сбор крови, показателей массы тела и образцов фекалий перед началом 3-кратного дозирования с периодичностью раз в две недели.

[0230] Конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub>, полученные методами RedAM или CDAP, использовали для иммунизации мышей дозой 20 мкг в режиме 3-кратного дозирования с периодичностью раз в две недели. Образцы фекалий собирали еженедельно, а образцы крови собирали перед каждой иммунизацией в режиме 3-кратного дозирования с периодичностью раз в две недели. Первичными конечными точками исследования были: 1) КОЕ фекалий в дни 0, 14, 28, 56 и далее; и 2) ответы в виде анти-PSII IgG в дни 0, 14, 28, 42, 56 и далее. Образцы сыворотки и фекальные гранулы собирали, как описано в примере 3, приведенном выше.

[0231] Мышам вводили коктейль антибиотиков, состоящий из канамицина (0,4 мг/мл), гентамицина (0,035 мг/мл), колистина (850 ед/мл), метронидазола (0,215 мг/мл) и ванкомицина (0,045 мг/мл), в питьевой воде в течение 5 дней. Этот коктейль антибиотиков в разведении 1:5 вводили животным в/ж 3 раза в течение периода лечения для гарантии того, что каждое животное получало антибиотики до заражения. На пятый день мышам возвращали обычную питьевую воду. За день до заражения *C. difficile* мышей взвешивали. Массу тела усредняли для приготовления раствора клиндамицина, так что каждой мыши

в/б вводили 10 мг/кг клиндамицина. На следующий день (день заражения 0) каждую мышь взвешивали, фекальные гранулы собирали, и мышам вводили в/ж  $\sim 10^4$  КОЕ спор *C. difficile* в 100 мкл PBS. Мышей наблюдали в отношении заболеваемости, смертности, симптомов и снижения массы тела после заражения. Периодически собирали фекальные гранулы для оценки колонизации по КОЕ. Когда у мышей восстанавливалась масса тела после первичной инфекции, начинали режим 3-кратного введения с периодичностью раз в две недели, при котором мышей иммунизировали в/м тестируемыми препаратами 3 раза с интервалом в две недели. Образцы сыворотки собирали перед каждой иммунизацией для оценки иммунных ответов, а фекальные гранулы собирали перед каждой иммунизацией для оценки колонизации фекалий.

[0232] На Фиг. 17, панели А, показана временная шкала заражения спорами, график иммунизации и моменты времени сбора фекалий для отдельных образцов фекалий. На панели В показано среднее геометрическое значение в % прироста *C. difficile* после терапевтической иммунизации, нормализованное на исходный уровень КОЕ в день 0 до иммунизации. На Фиг. 18 показано среднее геометрическое значение в % прироста *C. difficile* от исходного значения КОЕ в день 0. Данные показывают, что вакцинация обоими конъюгатами PSII-CRM<sub>197</sub> контролировала рост *C. difficile* в сравнении с введением контрольного носителя мышам, зараженным *C. difficile*.

[0233] Конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub> тестировали на их способность усиливать гуморальный ответ у мышей, зараженных *C. difficile*. Конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub> использовали для иммунизации интактных мышей и мышей, зараженных спорами *C. difficile*. Мышам проводили внутримышечную 3-кратную иммунизацию с периодичностью раз в две недели. Уровни анти-PSII IgG антител в сыворотке определяли через 2 недели после второй иммунизации (день 28) и третьей иммунизации (день 42). Данные показывают, что конъюгат PSII-CRM<sub>197</sub> вызывал 8-кратное увеличение титра анти-PSII IgG антител у мышей, зараженных *C. difficile*, через 2 недели после второй иммунизации (день 28) в сравнении с ответом у интактных мышей. Интактные мыши, которым вводили дозу 10 мкг конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, имели в 4 раза более низкий ответ в день 42 (через 2 недели после завершения режима 3-кратного дозирования с периодичностью раз в две недели), чем мыши, зараженные *C. difficile*, которым вводили такую же дозу. Однако ответ в виде продуцирования анти-PSII IgG антител в день 42 у интактных мышей, которым вводили уровень дозы 25 мкг конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, был сопоставим с ответом в виде анти-PSII IgG, вызванным введением дозы 10 мкг или 25 мкг зараженным *C. difficile* мышам.

**ТАБЛИЦА 7**

Мыши	Вакцина	Доза	СГТ анти-PSII IgG	
			День 28	День 42
Интактные	PBS	Нет	<50	<50
	PSII	25 мкг	<50	<50
	PSII-CRM <sub>197</sub>	25 мкг	1600	25600

		10 мкг	800	6400
Зараженные <i>C. difficile</i>	PBS	Нет	<50	<50
	PSII	25 мкг	<50	<50
	PSII-CRM <sub>197</sub>	25 мкг	12800	51200
		10 мкг	6400	25600

**[0234]** На Фиг. 19, панели А, представлен график иммунизации, используемый для получения анти-PSII IgG. На панели В показана колонизация фекалий (КОЕ/мг фекалий), определенная через 2 недели после первой иммунизации в день 14. Показано, что профилактическая иммунизация конъюгатом PSII-CRM<sub>197</sub> защищает мышей от снижения массы тела и симптомов. Статистически значимое снижение массы тела наблюдали с момента времени T=0 у мышей, иммунизированных PSII и PBS. Никаких существенных изменений массы тела не наблюдали у мышей, иммунизированных конъюгатом PSII-CRM<sub>197</sub>.

#### **Пример 5. Иммуногенность конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub> у мышей**

**[0235]** Конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub>, полученные различными химическими методами, оценивали в мышинных моделях инфекции *C. difficile* (ИКД) с точки зрения как иммуногенности, так и защиты. Была проведена серия исследований на мышах, в которых сравнивали иммуногенность и защиту конъюгатов, полученных химическими методами CDAP, TEMPO и концевое связывания. Исходя из данных по иммуногенности и защите в мышинной модели ИКД, а также простоты производства, для дальнейшей разработки был выбран химический метод концевое связывания.

**[0236]** Проведение иммунизаций 45 мкг связанного концами PSII-CRM<sub>197</sub> (с адьювантом AlPO<sub>4</sub> в концентрации 1 мг/мл в стерильном солевом растворе) защищало мышей от значительного снижения массы тела при заражении спорами *C. difficile*. Напротив, иммунизация 20 мкг CDAP PSII-CRM<sub>197</sub> обеспечивала частичную защиту от заражения спорами *C. difficile*. На Фиг. 26 показано среднее геометрическое значение снижения массы тела после профилактической иммунизации и заражения спорами. # указывает на значительное снижение массы тела ко дню 2 в сравнении с днем 0 в группе животных, иммунизированных препаратом CDAP. \* указывает на значительное снижение массы тела ко дню 3 и 6 в контрольной группе.

**[0237]** В Таблице 8 показано снижение массы тела в % по дням после дня 0 при иммунизации тестируемыми препаратами. В Таблице 9 приведены титры анти-PSII IgG в анализе ELISA в дни 0, 14, 28 и 42 после иммунизации.

**ТАБЛИЦА 8**

Тестируемые препараты	День 0	День 1	День 2	День 3	День 6	День 9	День 14	День 23
PSII-CRM <sub>197</sub> : связанный концами	0%	0,02%	-12,44%	-10,35%	-5,90%	-2,26%	0,16%	3,82%

(20 мкг)									
PSII-CRM <sub>197</sub> : связанный концами (45 мкг)	0%	-2,74%	-7,10%	-5,74%	-1,86%	-1,45%	0,59%	7,46%	
PSII-CRM <sub>197</sub> : связанный концами (90 мкг)	0%	-2,57%	-8,73%	-8,78%	-7,89%	-2,62%	1,37%	4,47%	
PSII-CRM <sub>197</sub> : CDAP (20 мкг)	0%	-6,01%	-8,48%	-6,91%	-1,69%	-0,23%	3,21%	4,25%	
PSII-CRM <sub>197</sub> : CDAP (45 мкг)	0%	0,61%	-5,60%	-7,27%	-5,75%	-2,85%	-0,15%	3,74%	
PSII-CRM <sub>197</sub> : CDAP (90 мкг)	0%	0,30%	-9,10%	-10,35%	-3,17%	0,04%	-0,44%	4,38%	
PSII-CRM <sub>197</sub> : TEMPO (20 мкг)	0%	-0,11%	-3,89%	-7,06%	-6,25%	-0,24%	0,15%	3,08%	
PSII-CRM <sub>197</sub> : TEMPO (45 мкг)	0%	-1,36%	-9,74%	-11,13%	-7,36%	-2,22%	-0,16%	2,90%	
PSII-CRM <sub>197</sub> : TEMPO (90 мкг)	0%	-1,73%	-13,46%	-10,65%	-9,88%	-5,75%	-2,07%	1,03%	
Солевой раствор/Споры	0%	-1,56%	-6,43%	-8,64%	-6,32%	0,14%	1,46%	9,82%	
Солевой раствор/Без спор	0%	0,44%	0,41%	0,11%	2,73%	2,42%	2,88%	8,22%	

ТАБЛИЦА 9

Титры анти-PSII IgG в анализе ELISA (TEMPO PSII, биотинилированный, ELISA)			День 0	День 14	День 28	День 42			
Группа	Описание	Доза (мкг)	Объединенный титр	СГТ* (n=8)	Сероконверсия	СГТ (n=8)	Сероконверсия	СГТ (n=8)	Сероконверсия
1	PSII-CRM <sub>197</sub> :Re dAm	20	25	25	пул	30	14%(1)	28	0%

2	PSII- CRM <sub>197</sub> :RedAm	45	25	25	пул	25	0%	25	0%
3	PSII- CRM <sub>197</sub> :RedAm	90 (45*2)	25	25	пул	27	0%	25	0%
4	PSII- CRM <sub>197</sub> :CDAP	20	25	25	пул	27	0%	25	0%
5	PSII- CRM <sub>197</sub> :CDAP	45	25	25	пул	25	0%	25	0%
6	PSII- CRM <sub>197</sub> :CDAP	90 (45*2)	25	25	пул	25	0%	25	0%
7	PSII- CRM <sub>197</sub> :TEMPO	20	25	65	25%	336	88%	436	75%
8	PSII- CRM <sub>197</sub> :TEMPO	45	25	27	0%	183	75%	100	63%
9	PSII- CRM <sub>197</sub> :TEMPO	90 (45*2)	25	130	75%	1,467	100%	2,263	100%
10	Носитель, споры	Н/П	25	25	пул	25	0%	25	0%
11	Носитель, без спор	Н/П	25	25	пул	25	0%	25	0%

[0238] В Таблице 10 показана иммуногенность конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub> у мышей с использованием титров объединенных сывороток в анализе ELISA с биотинилированным PSII в день 42.

**ТАБЛИЦА 10**

Группа	Описание тестируемых конъюгатов <sup>1</sup>	Доза (мкг)	ELISA-титры анти-PSII IgG в анализе ELISA с покрывающим антигеном			
			День 42 <sup>2</sup>	CDAP1	CDAP2	RedAm



			<b>Связанный концами</b>			<b>моно PSII)</b>
1	Конъюгат PSII-	20	3,200	800	400	400
2*	CRM <sub>197</sub> ,	45	200	200	25	50
3	связанный концами, RedAm	90	400	200	25	200
4*	Конъюгат PSII-	20	25	>6400	800	25
5	CRM <sub>197</sub> , CDAP	45	25	400	800	25
6		90	200	3,200	800	25
7	Конъюгат PSII-	20	>6400	1,600	1,600	3,200
8	CRM <sub>197</sub> ,	45	800	3,200	800	800
9	TEMPO	90	50	3,200	3,200	3,200

<sup>1</sup> Конъюгаты использовали с адьювантом в количестве 50 мкг гидрогеля Al на дозу

<sup>2</sup> Проводили всего 3 иммунизации внутримышечным (в/м) введением в дни 0, 14 и 28. Образцы сыворотки собирали через 2 недели после последней иммунизации (в день 42) и анализировали методом PSII-специфической ELISA. Титры для каждой группы приведены выше.

\* указывает на группы, в которых наблюдалась защита *in vivo* от заражения спорами.

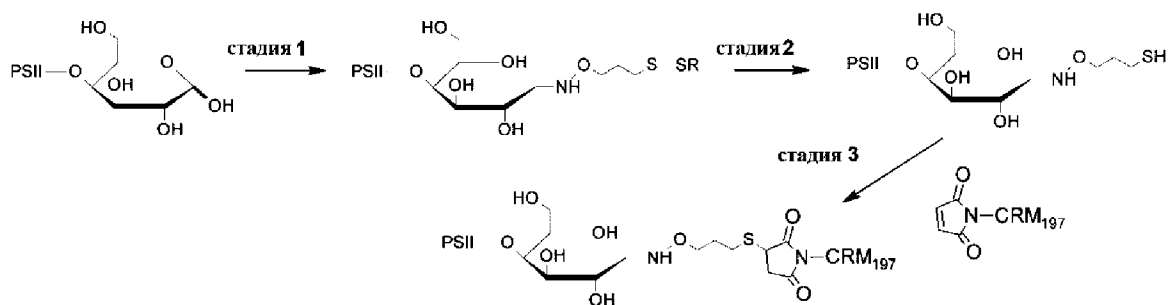
#### **Пример 6. Исследования диапазона доз конъюгатов PSII**

[0239] Проводят исследования эффекта повышенных доз конъюгатов PSII. Самок мышей C57/BL6 в возрасте 6 недель (n=105) распределяют по группам, получающим возрастающие дозы полученных методами RedAM, TEMPO или CDAP конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub> 3 раза с интервалом в две недели. Затем мышам вводят антибиотики и заражают спорами *C. difficile* в дозе 10<sup>4</sup> КОЕ. Мышей наблюдают в отношении снижения массы тела и симптомов ИКД. Образцы крови собирают для анализа на иммуногенность, а фекальные гранулы собирают для проверки на эффективность против колонизации.

Основными конечными точками исследования являются: 1) снижение массы тела или симптомы после заражения в дни 0, 1, 2, 3, 6, 9 и 14; 2) Ответы в виде анти-PSII IgG в дни исследования 0, 14, 28, 42 и при завершении исследования. Вторичными конечными точками исследования являются КОЕ фекалий в дни 0, 6 и 14.

#### **Пример 7: Синтез и характеристики связанных концами конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub>**

[0240] Общая схема синтеза конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, связанного концами, представлена на схеме 4.



#### Схема 4

[0241] Конъюгат отделяли от не конъюгированных PSII и CRM<sub>197</sub> методом эксклюзионной хроматографии, молекулярную массу и степень конъюгации оценивали методом многоуглового лазерного светорассеяния (ЭХ-МУЛС). Репрезентативный анализ связанного концами конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> методом ЭХ-МУЛС представлен на Фиг. 5. Молекулярная масса конъюгата составляла 111,8 кДа, что соответствовало одной молекуле CRM<sub>197</sub>-малеимида (61,6 кДа), содержащей примерно 6 цепей PSII (10 кДа/цепь). Однако степень конъюгации можно контролировать, изменяя соотношение дериватизированного PSII и CRM<sub>197</sub>-малеимида. Были получены связанные концами конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub>, содержащие в среднем 3, 6 и 10 цепей PSII на CRM<sub>197</sub>, для определения оптимального соотношения PSII и CRM<sub>197</sub> с точки зрения иммуногенности и защиты в мышинных моделях ИКД. Данные хроматограммы анализа ЭХ-МУЛС для трех связанных концами конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub> представлены на Фиг. 21A-D. Расчетная молекулярная масса и степень конъюгации приведены ниже в Таблице 12.

[0242] *Моно-функционализация PSII (стадия 1)*. 75 мг HCl соли 3-аминооксипропан-1-тиола (40 мольных эквивалентов PSII) сначала растворяли в 4 мл 1,0 М боратного буфера (pH доводили до 8,5) в стеклянном флаконе. Затем 5 мл CPS20 PSII (раствор 19,8 мг/мл в воде) смешивали с раствором 3-аминооксипропан-1-тиола. Полученный раствор инкубировали при 50°C в течение 18 ч, а затем охлаждали до комнатной температуры. Измеренное значение pH реакционного раствора составляло 8,79. Стабильность PSII подтверждали анализом ЭХ-МУЛС.

[0243] Восстановление оксима PSII проводили при комнатной температуре. Сначала pH реакционного раствора доводили до 8,5. Твердый боргидрид натрия добавляли 3 последовательными порциями (по 50 мг каждая, всего 150 мг). Во время процесса восстановления pH реакционного раствора поддерживали в пределах 8,4-8,6 путем добавления 1 н. раствора HCl в течение 60 мин. Реакционную смесь гасили, доводя pH до 6,8 с помощью 1 н. раствора HCl. Полученный раствор пропускали через 0,2-мкм фильтр (Whatman GD/X PES) для удаления нерастворимых частиц и получали конечный объем 15 мл. Анализ ЭХ-МУЛС подтвердил целостность PSII, определенная в анализе концентрация составляла 6 мг/мл.

[0244] Уровень содержания тиолов в полученном PSII-NH<sub>2</sub>ORSSR оценивали с помощью анализа с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) (DTNB). Аликвоту PSII-NH<sub>2</sub>ORSSR объемом 50 мкл смешивали со 100 мкл раствора трис(2-карбоксиил)фосфина

(ТСЕР) (6 мг HCl соли ТСЕР в 100 мМ натрий-ацетатном буфере, конечное значение pH 6,0). Реакция протекала при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем ТСЕР, избыток аминоксителиола и другие небольшие молекулы удаляли ультрацентрифугированием с помощью ультрафильтра Amicon с порогом отсечения 3 кДа (4000 об/мин × 25 мин) с использованием 5 мМ ЭДТА в 5 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 6,5) в качестве промывающего буфера. Было проведено четыре раунда центрифугирования. Фильтрат после 4-го центрифугирования имел OD ниже предела обнаружения при 410 нм. Концентрация тиола была рассчитана как 0,087 мМ, что приводило к выходу 77% включения аминоксителиола на молекулу PSII (7,6 кДа) на редуцирующем конце. Стабильность PSII подтверждали анализом ЭХ-МУЛС.

**[0245]** *Конъюгация PSII с CRM<sub>197</sub>-малеимидом (стадии 2 и 3).* Конъюгацию модифицированного PSII с CRM<sub>197</sub>-малеимидом проводили при молярном соотношении 3×, 6× или 10× PSII (7,6 К) к CRM-малеимиду. ТСЕР (6 мг/мл) в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,0, 8 мл) добавляли к раствору PSII-NH<sub>2</sub>ORSSR (6 мг/мл, 4 мл) при комнатной температуре. Через 1 час ТСЕР, избыток аминоксителиола и другие небольшие молекулы удаляли ультрацентрифугированием с помощью ультрафильтра Amicon с порогом отсечения 3 кДа (4000 об/мин × 25 мин) с использованием 5 мМ ЭДТА в 5 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,6) в качестве промывочного буфера. Было проведено пять раундов центрифугирования. PSII со свободным тиолом в виде ретентата определяли анализом с DTNB. Полученный раствор PSII со свободным тиолом затем смешивали с CRM<sub>197</sub>-малеимидом (5 мг/мл в PBS и 5 мМ ЭДТА, pH 6,8) в различных соотношениях (Таблица 11). Протекание реакции конъюгации облегчали добавлением 3 мл буфера для конъюгации (0,5 М PBS, 10 мМ ЭДТА, pH 7,5). Реакционные растворы оставляли при комнатной температуре на 2 часа, а затем при 4°C на 16 часов. Реакционные смеси гасили добавлением раствора меркаптоэтанола (0,5 М в воде, 10 мкл). В Таблице 11 показано количество PSII со свободным тиолом, использованного для конъюгации при соотношениях 3х, 6х и 9х с CRM<sub>197</sub>-малеимидом.

**ТАБЛИЦА 11**

Соотношение (PSII к CRM)	CRM <sub>197</sub> -малеимид (5 мг/мл)	PSII-NH <sub>2</sub> ORSSR (0,3 мМ)	
		250 нмоль	0,83 мл
3×	5 мг (86 нмоль)	250 нмоль	0,83 мл
6×	5 мг (86 нмоль)	520 нмоль	1,73 мл
10×	2,5 мг (43 нмоль)	430 нмоль	1,43 мл

**[0246]** Конъюгацию PSII с CRM<sub>197</sub>-малеимидом во всех трех реакциях подтверждали анализом ЭХ-МУЛС. На Фиг. 24 представлен репрезентативный анализ (6хPSII-CRM) с сигналом конъюгата PSII в момент времени 30 мин, а также пиками PSII и тиол-PSII в момент времени примерно 38 мин. Через 24 минуты наблюдали неизвестный пик без определяемой массы и поглощения УФ-излучения, который мог соответствовать растворимым частицам, присутствующим во всех трех реакционных смесях. Полученные в

результате реакции конъюгации растворы разбавляли PBS до 12 мл. PSII и другие небольшие молекулы из растворов в реакционном растворе удаляли центрифугированием с помощью ультрафильтра Amicon с порогом отсечения 30 кДа (4000 об/мин x 15 мин), получая конечный концентрированный раствор объемом примерно 300 мкл. Анализ ЭХ-МУЛС после центрифугирования не выявил значительного снижения массы. Полученные конечные конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub> (по 2,5-3,0 мл каждый) стерилизовали, пропуская через стерильный фильтр 0,22, и полностью анализировали методом ЭХ-МУЛС.

[0247] На Фиг. 25A-25D представлены результаты конечного анализа методом ЭХ-МУЛС с подробным указанием компонентов белка CRM<sub>197</sub> и PSII в сигналах конъюгата и анализа с объединенными компонентами. Таблица 12 показывает подробные единицы массы и определение коэффициентов конъюгации PSII.

**ТАБЛИЦА 12**

			полидисперсность	CRM <sub>197</sub> -фрагмент	PSII-фрагмент	Масса CRM <sub>197</sub>	Масса PSII	мольное соотношение
	Mn (кДа)	Mw (кДа)	(Mw/Mn)	Mw (кДа)	Mw (кДа)	(мкг)	(мкг)	(PSII: CRM)
3x	86,3	90,9	1,054	65,4	25,5	59,39	22,6	3,4 (3,2)
6x	114,0	124,2	1,089	72,6	51,5	53,51	38,25	6,8 (6,0)
10x	145,8	156,4	1,073	71,3	85,2	22,08	26,57	11,2 (10,1)

[0248] Для расчета соотношения PSII и CRM<sub>197</sub> в конъюгате использовали два метода. В первом методе использовали формулу  $(MW_{\text{кон}} - MW_{\text{CRM}}) / 7,6$  кДа. Для вторых значений (указанных в скобках) использовали определенную методом МУЛС массу CRM<sub>197</sub> и PSII конъюгата по формуле:  $(\text{масса PSII} / \text{масса CRM}_{197}) * 62 \text{ кДа} / 7,6 \text{ кДа}$  (CRM<sub>197</sub>-малеимид как 62 кДа). Результаты обоих расчетов показали сопоставимое целевое соотношение PSII и CRM<sub>197</sub> в конъюгатах. Конечная концентрация, объем и количества стерильных растворов конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> были следующими: 1) конъюгат 3×PSII-CRM<sub>197</sub> 3,0 мг/мл в PBS, 2,2 мл (6,6 мг); 2) конъюгат 6×PSII-CRM<sub>197</sub> 3,4 мг/мл в PBS, 2,2 мл (7,6 мг) и 3) конъюгат 10×PSII-CRM<sub>197</sub> 1,8 мг/мл в PBS, 2,7 мл (4,9 мг).

**Пример 8: Эффекты адъювантов для вакцины против *C. difficile***

[0249] Конечными точками исследования были ответы в виде продуцирования IgG антител против анатоксина А, против анатоксина В и против PSII, определенные методом ELISA. Определяли продуцирование нейтрализующих антител против токсина А и против токсина В; снижение массы тела и симптомы после ИКД; а также КОЕ в фекалиях.

[0250] Шесть групп мышей получали либо 45 мкг конъюгата PSII; 5 мкг анатоксина

А и 5 мкг анатоксина В; 45 мкг конъюгата PSII, 5 мкг анатоксина А и 5 мкг анатоксина В; либо стерильный солевой раствор. В экспериментальных группах животные также получали различные адьюванты (AlPO<sub>4</sub>, AlOH или Advax2). Животные в группе 5, получавшие Advax2 в качестве адьюванта, получали две инъекции по 100 мкл.

[0251] В Таблице 13 указаны группы исследования, вводимые дозы, тестируемые препараты, адьюванты и вводимый инъекцией объем в данном эксперименте.

**ТАБЛИЦА 13**

Группа №	Вводимые в/м дозы (мкг)	Вводимые в/м тестируемые препараты	Адьювант (1 мг/мл)	Вводимый объем (мкл)	Количество мышей
1	45	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат	AlPO <sub>4</sub>	50	10
2	5+5	Анатоксины А+В	AlOH	50	10
3	(45) и (5+5)	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат и анатоксины А+В	AlPO <sub>4</sub>	50	10
4	(45) и (5+5)	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат и анатоксины А+В	AlOH	50	10
5	(45) и (5+5)	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат и анатоксины А+В	Advax2	100 (50 X 2)	10
6	Н/П	Стерильный солевой раствор	AlPO <sub>4</sub>	50	9

[0252] **График исследования.** Проводили три иммунизации с периодичностью раз в две недели, в дни 0, 14 и 27. Взятие крови для ELISA проводили в дни 0, 14, 27 и 41 (через 2 недели после последней иммунизации). Примерно через две недели после третьей иммунизации проводили курс введения антибиотиков, с последующим заражением спорами. Животных наблюдали в течение примерно нескольких недель, включая сбор и анализ фекалий. На Фиг. 28 представлен график исследования, используемого для определения эффектов различных адьювантов.

[0253] Композиция 1 содержит 45 мкг конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>, связанного концами, 5 мкг анатоксина А и 5 мкг анатоксина В. На Фиг. 29 представлено среднее геометрическое

значение снижения массы тела вследствие ИКД после заражения спорами в течение первых 9 дней после инфекции. В сравнении с животными, получавшими солевой раствор, у животных, получавших лечение, наблюдалось меньшее снижение массы тела. В течение большинства дней у мышей, получавших АІОН, снижение массы тела в процентах относительно дня 0 введения спор было больше, чем у мышей, получавших только сочетание анатоксинов. У животных, получавших вакцинную композицию, не наблюдалось значительного снижения массы тела в сравнении с группой животных, получавших солевой раствор/споры, особенно в дни 2-6. В дни 2-6 в группе животных, получавших солевой раствор/споры, наблюдалось значительное снижение массы тела. (\*) для группы животных, получавших солевой раствор/споры, на Фиг. 29 показывает, что наблюдалось статистически значимое снижение массы тела в дни 2-6 после заражения относительно дня 0. В группе животных, получавших солевой раствор/споры, (\*\*) было две мертвые мыши в день 3 после заражения. (\*) на кривой для анатоксина А/В указывает на то, что имело место статистически значимое снижение массы тела ко дню 6 после заражения относительно дня 0. В группе животных, получавших вакцинную композицию 1 (АІОН), отсутствовало статистически значимое снижение массы тела в любой момент времени после заражения. Статистический анализ проводили с использованием двустороннего анализа ANOVA (критерий множественного сравнения Даннетта).

[0254] На Фиг. 30 показан график с Фиг. 29 от дня 0 до дня 30. В Таблице 14 приведены изменения массы тела в % при иммунизации вакцинной композицией 1, как подробно описано в Таблице 13. Во всех группах введения анатоксинов А и В не наблюдали значительного снижения массы тела, а в группах, в которых животные получали композицию 1, наблюдали наибольшую стабильность массы тела. В группах введения вакцины с адьювантом Advax или  $AlPO_4$  у животных наблюдали мягкий стул вскоре после заражения и в течение 10 дней после заражения. В группе животных, получавших АІОН, симптомы отсутствовали на протяжении всего исследования, и она была первой группой, в которой масса тела животных вернулась в норму.

**ТАБЛИЦА 14**

Тестируемые препараты	Д1	Д2	Д3	Д6	Д9	Д14	Д17	Д21	Д27
PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат	-0,16%	-6,49%	-8,29%	-4,73%	-1,39%	-0,53%	1,99%	3,77%	4,08%
Анатоксины А+В	0,35%	-0,63%	-1,11%	-3,36%	0,47%	-2,5%	0,7%	3,01%	2,51%
Композиция 1 ( $AlPO_4$ )	-0,24%	0,18%	-0,62%	-2,37%	-0,73%	-0,53%	1,41%	3,41%	4,27%

Тестируемые препараты	Д1	Д2	Д3	Д6	Д9	Д14	Д17	Д21	Д27
Композиция 1 (AlOH)	0,87%	1,38%	-0,52%	-2,09%	0,73%	0,44%	2,42%	3,77%	4,47%
Композиция 1 (Advax)	-0,05%	1,89%	-0,5%	-4,04%	-0,17%	-0,16%	1,91%	4,89%	4,22%
Солевой раствор/Споры	0,01%	-10,61%	-8,97%	-4,8%	-2,24%	-1,67%	0,54%	2,3%	2,12%

[0255] Итоговые таблицы титров были получены для групп, получавших композиции и различные адъюванты. Основываясь только на данных по титру, в группе животных, получавших композицию 1 и AlPO<sub>4</sub>, наблюдали превосходный иммунный ответ в сравнении с другим вариантом иммунизации с другими адъювантами или только анатоксинами. Все образцы были сероконвертированы ко дню 14 иммунизации, через две недели после первой иммунизации. В Таблице 15 и Таблице 16 приведены сводные данные по титру анти-TxdA IgG в анализе ELISA для групп лечения и отдельных мышей в группах лечения, которым вводили только связанный концами конъюгат PSII-CRM<sub>197</sub>, анатоксины А и В или конъюгат, анатоксины А и В, а также AlPO<sub>4</sub>, AlOH или Advax в качестве адъюванта.

**ТАБЛИЦА 15**

Группа	Доза (мкг)	Тестируемый препарат	Адъювант /разведение	СГТ анти-TxdA IgG			
				День 0	День 14	День 27	День 41
1	45	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат	AlPO <sub>4</sub>	25	25	25	25
2	5+5	Анатоксины А+В	AlOH	25	71,385	597,141	1600000
3	(45) и 5+5	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат, и анатоксины А+В	AlPO <sub>4</sub>	25	129,960	1114305	2985706
4	(45) и 5+5	PSII-RM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат, и анатоксины А+В	AlOH	25	105,561	640,000	1600000
5	(45) и 5+5	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат, и анатоксины А+В	Advax2	25	74,643	1600000	1837917
6	Н/П	Стерильный солевой раствор	AlPO <sub>4</sub>	25	25	29	25







[0256] На Фиг. 31А-С представлены реципрокные титры анти-TcdA в группах животных, получавших анатоксины А и В (AlOH); связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+AlPO<sub>4</sub>; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+AlOH; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+Advax2; и стерильный солевой раствор (AlPO<sub>4</sub>), в день 14 (Фиг. 31А), день 27 (Фиг. 31В) и день 41 (Фиг. 31С). На Фиг. 31D представлены титры анти-TxdA в анализе ELISA для групп, получавших PSII-CRM<sub>197</sub>; анатоксины А и В (AlOH); связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+AlPO<sub>4</sub>; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+AlOH; связанный концами PSII-CRM<sub>197</sub>+анатоксины А и В+Advax2; и стерильный солевой раствор (AlPO<sub>4</sub>), на протяжении всего исследования.

[0257] В Таблице 17 и Таблице 18 приведены сводные данные по титру анти-TxdB IgG в анализе ELISA для групп лечения и отдельных мышей в группах лечения, которым вводили только связанный концами конъюгат PSII-CRM<sub>197</sub>, анатоксины А и В, или конъюгат, анатоксины А и В, а также AlPO<sub>4</sub>, AlOH или Advax в качестве адьюванта.

**ТАБЛИЦА 17**

Группа	Доза (мкг)	Тестируемый препарат	Адьювант /разведение	День 0	День 14	День 27	День 41
1	45	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат	AlPO <sub>4</sub>	25	25	25	50
2	5+5	Анатоксины А+В	AlOH	25	149285	844485	1371870
3	(45) и 5+5	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат и анатоксины А+В	AlPO <sub>4</sub>	25	89868	452548	905097
4	(45) и 5+5	PSII-RM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат и анатоксины А+В	AlOH	25	296983	1114305	1688970
5	(45) и 5+5	PSII-CRM <sub>197</sub> , связанный концами конъюгат и анатоксины А+В	Advax2	25	8574	685935	1810193
6	Н/П	Стерильный солевой раствор	AlPO <sub>4</sub>	25	33	27	31

ТАБЛИЦА 18

Группа	Описание	Доза (мкг)	Адьювант (1 мг/мл)	СГТ (n=10)	Серокон версия (%)	Мышь									
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	PSII- CRM <sub>197</sub> :связанный концами	45	AlPO <sub>4</sub>	25	0										
2	Анатоксины А+В	5+5	AlOH	149285	100	160000	160000	160000	160000	320000	80000	160000	160000	160000	80000
3	PSII- CRM <sub>197</sub> :связанный концами и анатоксины А+В	45 и (5+5)	AlPO <sub>4</sub>	89868	100	160000	80000	320000	80000	80000	32000	40000	80000	160000	80000
4	PSII- CRM <sub>197</sub> :связанный концами и анатоксины А+В	45 и (5+5)	AlOH	196983	100	320000	160000	160000	160000	160000	160000	160000	320000	160000	320000
5	PSII- CRM <sub>197</sub> :связанный концами и анатоксины А+В	45 и (5+5)	Advax2	8574	100	32000	8000	8000	8000	8000	4000	8000	16000	8000	4000
6	Стерильный солевой раствор	Н/П	AlPO <sub>4</sub>	33	0	25	25	25	25	25	100	25	100	25	25

**Пример 9. Иммуногенность и защита связанного концами конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub>**

[0258] Сначала функционализировали PSII тиоловой группой на редуцирующем конце путем образования оксима, с последующим восстановительным аминированием. Затем осуществляли конъюгацию с CRM<sub>197</sub> через свободный тиол путем добавления к CRM<sub>197</sub>-малеимиду. Готовый раствор конъюгата 6×PSII-EcoCRM стерилизовали, и конечный продукт характеризовали анализом ЭХ-МУЛС.

[0259] Для анализа конъюгата 50 мкл конечного раствора конъюгата 6×PSII-EcoCRM разводили 250 мкл раствора PBS. УФ-поглощение при 280 нм разбавленного образца регистрировали для установления концентрации CRM<sub>197</sub>. Образцы в двух экземплярах (инъекция по 50 и 100 мкл) анализировали методом ЭХ-МУЛС с колонкой TOSOH TSKgel G4000PW, а затем TSKgel G2000PW<sub>XL</sub>, и PBS, содержащим 0,02% азид натрия, в качестве рабочего буфера, со скоростью потока 0,5 мл/мин. Для анализа конъюгатов показатель  $dn/dc$  для PSII составлял 0,137, УФ-коэффициент составлял 0;  $dn/dc$  для CRM<sub>197</sub> составлял 0,185 и УФ-коэффициент составлял 0,934. Определенные массы, концентрации и соотношения в конъюгатах PSII-CRM<sub>197</sub> суммированы в Таблице 19. Соотношение PSII и CRM<sub>197</sub> в конъюгате рассчитывали по следующей формуле: (масса PSII/масса CRM<sub>197</sub>)\*62 кДа/7,6 кДа (CRM<sub>197</sub>-малеимид - 62 кДа). Репрезентативные данные можно найти на Фиг. 23А-23В.

ТАБЛИЦА 19

	CRM OD <sub>280</sub>	Конечная концентрация CRM	полидисперсность	CRM- фрагмент	PSII- фрагмент	Масса CRM	Масса PSII	Мольное соотношение
	Разведение 1:6	(мг/мл)	(Mw/Mn)	Mw (кДа)	Mw (кДа)	(мкг)	(мкг)	(PSII:CRM)
Пробирка №А	0,625		1,252	92	64	67,8	49,6	5,97 (масс)
	(0,67 мг/мл)	4,02			Конечная конц. PSII=3,0 мг/мл			(49,6/67,8)*62/7,6
Пробирка №В	0,570		1,272	95	55	63,4	46,2	5,95 (масс)
	(0,61 мг/мл)	3,66			Конечная конц. PSII=2,8 мг/мл			(46,2/63,4)*62/7,6
Всего EcoCRM=90 мг			Всего PSII=34,5+32,2=66,7 мг					

[0260] Для дальнейшей оценки в мышинных моделях ИКД было получено 70 мг связанного концами PSII-CRM<sub>197</sub>, содержащего в среднем 6 цепей. Было проведено несколько исследований на мышах для изучения влияния уровней доз связанного концами конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> на иммуногенность в двух мышинных моделях ИКД. В первой мышинной модели оценивали эффективность вакцины в предотвращении симптомов первичной ИКД, определяемую по снижению массы тела. Вторая модель представляла собой модель вторичной профилактики (колонизации), в которой мышей сначала заражали *C. difficile*, а затем вакцинировали для определения воздействия вакцинации на КОЕ *C. difficile* в фекалиях.

[0261] Интактных мышей (N=5-8) иммунизировали 3 раза с периодичностью раз в две недели 45 мкг связанного концами конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> с добавлением, или без добавления, по 5 мкг анатоксина А и В. Через две недели после последней иммунизации мышам в/ж инокулировали 10<sup>7</sup> спор *C. difficile*. Массу тела каждого животного контролировали ежедневно в течение 27 дней. На графике отображали среднее геометрическое значение снижения массы тела в процентах для каждой группы иммунизированных животных. Две мыши из группы, иммунизированной солевым раствором, были обнаружены мертвыми в день 3 после заражения спорами. Других смертей в этом эксперименте не было. Результаты в мышинной модели первичной ИКД показали очень незначительное влияние конъюгата PSII-CRM<sub>197</sub> на начальное снижение массы тела после заражения, что опосредовано в первую очередь действием двух основных токсинов, продуцируемых *C. difficile*. Имелись некоторые доказательства улучшения скорости восстановления массы тела у вакцинированных мышей (Фиг. 22). На Фиг. 22 показана защита от ИКД после иммунизации конъюгатом PSII-CRM<sub>197</sub> с анатоксинами А и В и без них. (\*) указывает на то, что две мыши из группы, иммунизированной солевым раствором, были обнаружены мертвыми в день 3 после заражения спорами.

[0262] Иммуногенность связанных концами конъюгатов PSII-CRM<sub>197</sub> с различным соотношением цепей PSII и CRM<sub>197</sub> оценивали на мышах. У мышей конъюгат со средним числом 6 цепей PSII приводил к самому высокому титру анти-PSII IgG. Все конъюгаты проявляли некоторую иммуногенность.

[0263] В Таблице 20 приведен дизайн исследования соотношения конъюгатов. Первичными конечными точками были: 1) анти-PSII IgG в сыворотке в дни 0, 14, 28 и 42 (2 недели после каждой иммунизации); и 2) снижение массы тела после заражения.

**ТАБЛИЦА 20**

Группа	Тестируемые препараты, вводимые в/м	Адьювант (1 мг/мл)	Объем инъекции (мкл)	Кол-во мышей	Инфекция
1	3:1 PSII:CRM <sub>197</sub>	АЮН	50	8	У (споры)
2	6:1 PSII:CRM <sub>197</sub>	АЮН	50	8	У (споры)
3	6:1 PSII:CRM <sub>197</sub>	АЮН	50	8	У (вег. клетки)



1	3:1 PSII:CRM <sub>197</sub> Связанный концами	45мкг	50мкг АІОН	Проф. <sup>1</sup>	25	100	4800	9600	
				2-я	25	800	3200	6400	3200
				Проф. <sup>2</sup>					
2	6:1 PSII:CRM <sub>197</sub> Связанный концами	45мкг	50мкг АІОН	Проф. <sup>1</sup>	25	800	19200	32000	
				2-я	25	3200	102400	102400	10240
				Проф. <sup>2</sup>					0
3	10:1 PSII:CRM <sub>197</sub> Связанный концами	45мкг	50мкг АІОН	Проф. <sup>1</sup>	25	800	19200	32000	
				2-я	25	3200	51200	51200	10240
				Проф. <sup>2</sup>					0
4	Солевой раствор	45мкг	50мкг АІОН	Проф. <sup>1</sup>	25	25	25	25	
				2-я	25	25	25	25	50
				Проф. <sup>2</sup>					

<sup>1</sup> Проф. (профилактические иммунизации): группы интактных мышей иммунизировали 3 раза с периодичностью раз в две недели в дни 0, 14 и 28 конъюгатами PSII-CRM<sub>197</sub>. Сыворотку собирали перед первой иммунизацией и через две недели после каждой последующей иммунизации в дни 14, 28 и 42. Сыворотку анализировали методом PSII-специфического анализа ELISA, и титры приведены выше.

<sup>2</sup> 2-я Проф. (вторичные профилактические иммунизации): группы интактных мышей заражали 10<sup>4</sup> спор *C. difficile* и оставляли до выздоровления от всех симптомов ИКД. В день 23 после заражения мышей разделяли на группы по 8-10 особей и в/м вводили конъюгаты PSII-CRM<sub>197</sub> 3 раза с интервалом две недели. Образцы сыворотки собирали перед первой иммунизацией и через две недели после каждой последующей иммунизации в дни 14, 28 и 42. Сыворотку анализировали методом PSII-специфического анализа ELISA, и титры приведены выше.

[0266] На Фиг. 27А-27D показано связанное с ИКД снижение массы тела после заражения спорами *C. difficile*. На Фиг. 27А показано снижение массы тела после ИКД у мышей; На Фиг. 27В показаны изменения массы тела в процентах относительно дня 0 введения спор у мышей, получавших PSII:CRM<sub>197</sub> с соотношением 3:1, в течение дней 1-14; На Фиг. 27С показаны изменения массы тела в процентах относительно дня 0 введения спор у мышей, получавших PSII:CRM<sub>197</sub> с соотношением 6:1, в течение дней 1-14; На Фиг. 27D показаны изменения массы тела в процентах относительно дня 0 введения спор у мышей, получавших PSII:CRM<sub>197</sub> с соотношением 10:1, в течение дней 1-14. В контрольной группе получения стерильного солевого раствора в одной клетке в день 14 не было воды, данные исключены (n=4). Остальные группы имели n=8.

#### **Пример 10. Дизайн клинического исследования**

[0267] *Исследование фазы 1.* Целью исследования фазы 1 является оптимизация



препаратов и проверка безопасности, переносимости и иммуногенности фармацевтической композиции, содержащей антиген PSII *C. difficile*, анатоксин токсина А и анатоксин токсина В. Клиническое исследование фазы 1 представляет собой исследование с участием двух групп, в котором сравнивают фармацевтическую композицию в двух разных препаратах, каждый из которых содержит разные адьюванты. Первичной конечной точкой исследования фазы 1 являются титры Ат к анатоксину А, анатоксину В и PSII; а также профили безопасности. Вторичная конечная точка исследования фазы 1 включает колонизацию фекалий, частоту случаев ИКД, а также степень тяжести и продолжительность ИКД. Критерии включения и исключения для исследования включают пациентов с наличием и отсутствием колонизации *C. difficile*. Субъектов исследуют на предмет различий в иммуногенности. Если у субъектов ранее была ИКД, порог для возникновения устанавливают перед исследованием. Размер выборки для исследования фазы 1 составляет 150-200 субъектов, проживающих в США.

**[0268]** *Клиническое исследование фазы 2 (исследование по определению основной дозы)*. Целью клинического исследования фазы 2 является оптимизация дозы, проверка безопасности, иммуногенности и эффективности фармацевтического препарата в профилактике ИКД. За субъектами наблюдают для изучения влияния фармацевтической композиции на долгосрочную ИКД. Клиническое исследование фазы 2 представляет собой исследование с несколькими группами, в котором сравнивают различные дозы и препараты фармацевтической композиции в дополнение к стандартному лечению (СЛ). Лечение фармацевтической композицией сравнивают с применением только СЛ. Первичные конечные точки включают частоту возникновения, степень тяжести и продолжительность ИКД, а также профили безопасности. Вторичные конечные точки включают титры Ат к анатоксину А, анатоксину В и PSII; долговечность иммунного ответа и колонизацию фекалий. Критерии включения и исключения для исследования включают пациентов, стратифицированных по положительным и отрицательным результатам анализа на колонизацию *C. difficile*. Если у субъекта ранее была ИКД, порог для возникновения устанавливают перед исследованием. Для участия в исследовании включают субъектов, планирующих поступление в больницу или дом престарелых, субъектов, члены семьи которых имеют положительный результат анализа на колонизацию *C. difficile*, а также пациентов-участников, которые в последнее время не принимали антибиотики. Размер выборки клинического исследования фазы 2 составляет 200-500 субъектов, проживающих в США. По мере необходимости добавляют дополнительных субъектов в Европе.

**[0269]** *Исследование фазы 3*. Целью клинического исследования фазы 3 является определение эффективности фармацевтической композиции, содержащей антиген PSII *C. difficile*, анатоксин токсина А и анатоксин токсина В, для предотвращения ИКД, иммуногенности, безопасности, а также сравнительные данные. Исследование фазы 3 представляет собой исследование с участием двух групп, в котором сравнивают эффекты фармацевтической композиции с эффектами PF-06425090 (Pfizer) при первичной профилактике ИКД; и сравнивают эффекты фармацевтической композиции со стандартами

лечения при вторичной профилактике или лечении ИКД. Критерии включения и исключения для клинического исследования фазы 2 используют в исследовании фазы 3. Для многонационального исследования используют размер выборки примерно 2000 субъектов.

**Пример 11: Рекомендации по отбору пациентов для клинических исследований**

**[0270]** *Пожилые пациенты из группы риска для первичной профилактики.* Пожилых пациентов из группы риска выбирают потому, что пожилые пациенты (>55 лет) подвергаются наибольшему риску, например субъекты, проживающие в домах престарелых, субъекты, недавно перенесшие госпитализацию, или субъекты с колонизацией *C. difficile*. Пожилых пациентов выбирают в качестве группы пациентов, потому что субъектов легко идентифицировать (то есть, жители домов престарелых или пансионатов для пожилых людей, недавно выписанные из больницы, ранее принимавшие антибиотики широкого спектра действия). Расширенные типы пациентов позволяют проводить исследование со скромной выборкой и более низкой стоимостью. Из-за старения иммунитета пожилым пациентам может потребоваться сильный адьювант. В клиническом исследовании фазы 3 частота случаев ИКД относительно низкая, и проводят более крупное исследование. Риски при выборе группы пожилых людей из группы риска заключаются в том, что исследованию может не хватить мощности для наблюдения разницы в заболеваемости, и что у пожилых пациентов может не проявляться устойчивый иммунный ответ.

**[0271]** *Взрослые с колонизацией *C. difficile* и риском развития ИКД (первичная и вторичная профилактика).* Взрослые с колонизацией *C. difficile* и риском развития ИКД включают пациентов с предшествующими эпизодами, начиная с заранее определенного порога (например, 6 месяцев). Дополнительные пациенты группы риска включают взрослых с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) или другими заболеваниями ЖКТ. У взрослых с предшествующей ИКД вероятность рецидива составляет 1 из 5. В группу пациентов входят взрослые с колонизацией *C. difficile*, определяемой методом ПЦР или ГАТ, а также взрослые из группы высокого риска без предшествующей ИКД. Первичную конечную точку снижения ИКД используют в качестве метода дифференциации групп субъектов.

**[0272]** *Взрослые с активным заболеванием (первичное лечение).* Взрослые с активной ИКД имеют самые высокие неудовлетворенные потребности. Скоротечная инфекция имеет скромный уровень смертности, составляющий около 7%. Лечение фармацевтической композицией по изобретению добавляют к стандартному лечению для стимулирования участия в исследовании. У субъектов наблюдается >25% вероятность первичной ИКД, что выше, чем в случае рецидивирующей ИКД. Исследуемой группе требуется быстрый иммунный ответ и всего лишь 1 или 2 дозы, чтобы клиническая польза от фармацевтической композиции была достигнута в течение нескольких дней в течение заболевания. Достаточный иммунный ответ должен быть индуцирован быстро, поскольку первый рецидив ИКД происходит в течение 2-4 недель после первоначального

возникновения.

#### ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0273] Следующие неограничивающие варианты осуществления представляют собой иллюстративные примеры изобретения, но не ограничивают объем изобретения.

[0274] Вариант осуществления 1. Композиция, содержащая полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), который представляет собой антиген PSII, обогащенный из *C. difficile*, где композиция имеет общее процентное содержание по массе углеводов, составляющее по меньшей мере примерно 40%, и где антиген PSII, обогащенный из *C. difficile*, составляет по меньшей мере 90% от общего процентного содержания углеводов.

[0275] Вариант осуществления 2. Композиция по варианту осуществления 1, дополнительно содержащая первый полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

[0276] Вариант осуществления 3. Композиция по варианту осуществления 2, где первый полипептид представляет собой анатоксин токсина А *C. difficile* (TcdA) или его фрагмент.

[0277] Вариант осуществления 4. Композиция по варианту осуществления 2 или 3, где первый полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина А *C. difficile*.

[0278] Вариант осуществления 5. Композиция по любому из вариантов осуществления 2-4, дополнительно содержащая второй полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

[0279] Вариант осуществления 6. Композиция по варианту осуществления 5, где второй полипептид представляет собой анатоксин токсина В *C. difficile* (TcdB) или его фрагмент.

[0280] Вариант осуществления 7. Композиция по варианту осуществления 6, где второй полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина В.

[0281] Вариант осуществления 8. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-7, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой анионный полисахарид клеточной поверхности.

[0282] Вариант осуществления 9. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-8, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* является незамещенным или замещенным.

[0283] Вариант осуществления 10. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-9, где первый полипептид и второй полипептид являются слитыми.

[0284] Вариант осуществления 11. Композиция по любому из вариантов осуществления 2-10, где первый полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 4-6.

**[0285]** Вариант осуществления 12. Композиция по любому из вариантов осуществления 5-11, где второй полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40.

**[0286]** Вариант осуществления 13. Композиция по любому из вариантов осуществления 2-12, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и первого полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

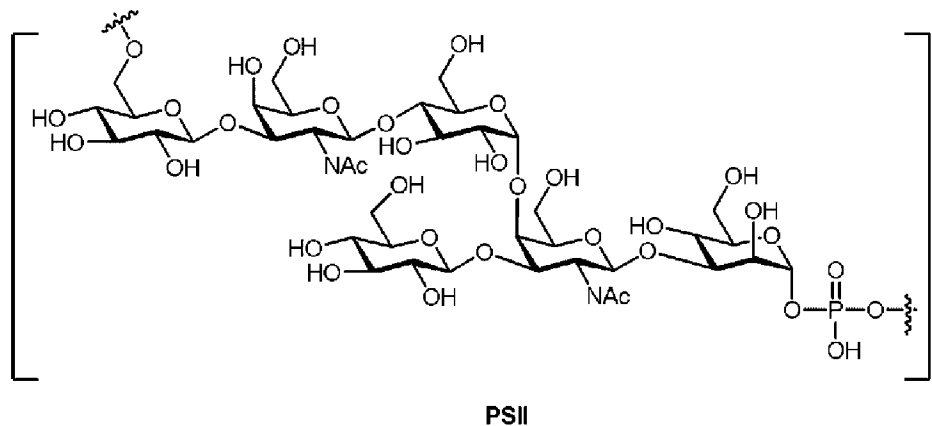
**[0287]** Вариант осуществления 14. Композиция по любому из вариантов осуществления 5-13, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и второго полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0288]** Вариант осуществления 15. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-14, где антиген PSII представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или иммуногенный фрагмент.

**[0289]** Вариант осуществления 16. Композиция по варианту осуществления 15, где PSII, его фармацевтически приемлемая соль или иммуногенный фрагмент содержит фосфатный фрагмент.

**[0290]** Вариант осуществления 17. Композиция по любому из вариантов осуществления 5-16, где полисахарид клеточной поверхности не конъюгирован с первым полипептидом или вторым полипептидом.

**[0291]** Вариант осуществления 18. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-17, где PSII представляет собой полисахарид формулы (I):



где n представляет собой целое число от 1 до 100.

**[0292]** Вариант осуществления 19. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-18, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

**[0293]** Вариант осуществления 20. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-19, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу примерно 8,8 кДа.

**[0294]** Вариант осуществления 21. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-20, дополнительно содержащая адъювант.

**[0295]** Вариант осуществления 22. Композиция по варианту осуществления 21, где

адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

**[0296]** Вариант осуществления 23. Композиция по варианту осуществления 21, где адъювант содержит гидроксид алюминия.

**[0297]** Вариант осуществления 24. Композиция по варианту осуществления 21, где адъювант содержит фосфат алюминия.

**[0298]** Вариант осуществления 25. Композиция по варианту осуществления 21, где адъювант содержит микрочастицы дельта-инулина.

**[0299]** Вариант осуществления 26. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-25, где антиген PSII конъюгирован с фармацевтически приемлемым носителем.

**[0300]** Вариант осуществления 27. Композиция по варианту осуществления 26, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой мутант дифтерийного токсина.

**[0301]** Вариант осуществления 28. Композиция по варианту осуществления 26, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>.

**[0302]** Вариант осуществления 29. Композиция по любому из вариантов осуществления 26-28, где антиген PSII конъюгирован с фармацевтически приемлемым носителем химическим линкером.

**[0303]** Вариант осуществления 30. Композиция по варианту осуществления 29, где химический линкер содержит тиосукцинимид.

**[0304]** Вариант осуществления 31. Композиция по варианту осуществления 29, где химический линкер содержит тиоэфир.

**[0305]** Вариант осуществления 32. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-31, где антиген PSII конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 1000 кДа.

**[0306]** Вариант осуществления 33. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-31, где антиген PSII конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 350 кДа.

**[0307]** Вариант осуществления 34. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-33, где антиген PSII представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0308]** Вариант осуществления 35. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-34, где антиген PSII не является синтетическим.

**[0309]** Вариант осуществления 36. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-35, где антиген PSII очищен из одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0310]** Вариант осуществления 37. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-36, где антиген PSII получен из экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0311]** Вариант осуществления 38. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-37, где композиция содержит менее примерно 20% по массе полипептида из *C. difficile*.

**[0312]** Вариант осуществления 39. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-38, где *C. difficile* относится к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

**[0313]** Вариант осуществления 40. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-39, которая представляет собой иммуногенную композицию или вакцину.

**[0314]** Вариант осуществления 41. Композиция по варианту осуществления 40, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против антигена PSII.

**[0315]** Вариант осуществления 42. Композиция по варианту осуществления 40 или 41, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* или токсина В *C. difficile*.

**[0316]** Вариант осуществления 43. Композиция по варианту осуществления 40 или 41, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* и токсина В *C. difficile*.

**[0317]** Вариант осуществления 44. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-43, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси относительно общей массы антигена PSII.

**[0318]** Вариант осуществления 45. Композиция по варианту осуществления 44, где примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание.

**[0319]** Вариант осуществления 46. Композиция по варианту осуществления 44 или 45, где примесь представляет собой примесь *C. difficile*.

**[0320]** Вариант осуществления 47. Композиция по любому из вариантов осуществления 44-46, где примесь представляет собой нуклеиновую кислоту.

**[0321]** Вариант осуществления 48. Композиция по любому из вариантов осуществления 44-46, где примесь представляет собой сахарид.

**[0322]** Вариант осуществления 49. Композиция по любому из вариантов осуществления 44-46, где примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0323]** Вариант осуществления 50. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-49, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси пептидогликана относительно общей массы антигена PSII.

**[0324]** Вариант осуществления 51. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-50, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси белка относительно общей массы антигена PSII.

**[0325]** Вариант осуществления 52. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-51, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси нуклеиновой кислоты относительно общей массы антигена PSII.

**[0326]** Вариант осуществления 53. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-52, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси сахараида относительно общей массы антигена PSII.

**[0327]** Вариант осуществления 54. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-53, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы антигена PSII, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(a) смеси примесей нуклеиновой кислоты и белка относительно общей массы антигена PSII;

(b) смеси примесей нуклеиновой кислоты и пептидогликана относительно общей массы антигена PSII;

(c) смеси примесей пептидогликана и белка относительно общей массы антигена PSII;

(d) смеси примесей сахара и белка относительно общей массы антигена PSII;

(e) смеси примесей пептидогликана и сахара; и

(f) смеси примесей нуклеиновой кислоты и сахара относительно общей массы антигена PSII.

**[0328]** Вариант осуществления 55. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-54, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы антигена PSII, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(a) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и пептидогликана относительно общей массы антигена PSII;

(b) смеси примесей сахара, белка и пептидогликана относительно общей массы антигена PSII;

(c) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и сахара относительно общей массы антигена PSII; и

(d) смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана и сахара относительно общей массы антигена PSII.

**[0329]** Вариант осуществления 56. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-55, содержащая менее примерно 5% по массе смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана, сахара и белка относительно общей массы антигена PSII.

**[0330]** Вариант осуществления 57. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-56, содержащая по меньшей мере 5% по массе антигена PSII.

**[0331]** Вариант осуществления 58. Композиция, содержащая:

(a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и

(b) первый полипептид, содержащий белок-носитель;

где белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* присутствуют в композиции в соотношении от менее примерно 10:1 до примерно 1:3.

**[0332]** Вариант осуществления 59. Композиция по варианту осуществления 58, дополнительно содержащая второй полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его

фрагмент.

**[0333]** Вариант осуществления 60. Композиция по варианту осуществления 59, где второй полипептид представляет собой анатоксин токсина А *C. difficile* (TcdA) или его фрагмент.

**[0334]** Вариант осуществления 61. Композиция по варианту осуществления 59 или 60, где второй полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина А.

**[0335]** Вариант осуществления 62. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-61, дополнительно содержащая третий полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий третий полипептид, где третий полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

**[0336]** Вариант осуществления 63. Композиция по варианту осуществления 62, где третий полипептид представляет собой анатоксин токсина В *C. difficile* (TcdB) или его фрагмент.

**[0337]** Вариант осуществления 64. Композиция по варианту осуществления 62 или 63, где третий полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина В.

**[0338]** Вариант осуществления 65. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-64, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой анионный полисахарид клеточной поверхности.

**[0339]** Вариант осуществления 66. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-65, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* является незамещенным или замещенным.

**[0340]** Вариант осуществления 67. Композиция по любому из вариантов осуществления 62-66, где второй полипептид и третий полипептид являются слитыми.

**[0341]** Вариант осуществления 68. Композиция по любому из вариантов осуществления 59-67, где второй полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 4-6.

**[0342]** Вариант осуществления 69. Композиция по любому из вариантов осуществления 62-68, где третий полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40.

**[0343]** Вариант осуществления 70. Композиция по любому из вариантов осуществления 59-69, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и второго полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0344]** Вариант осуществления 71. Композиция по любому из вариантов осуществления 62-70, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и третьего полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0345]** Вариант осуществления 72. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-71, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или иммуногенный фрагмент.

**[0346]** Вариант осуществления 73. Композиция по варианту осуществления 72, где PSII или его фармацевтически приемлемая соль, или иммуногенный фрагмент содержит

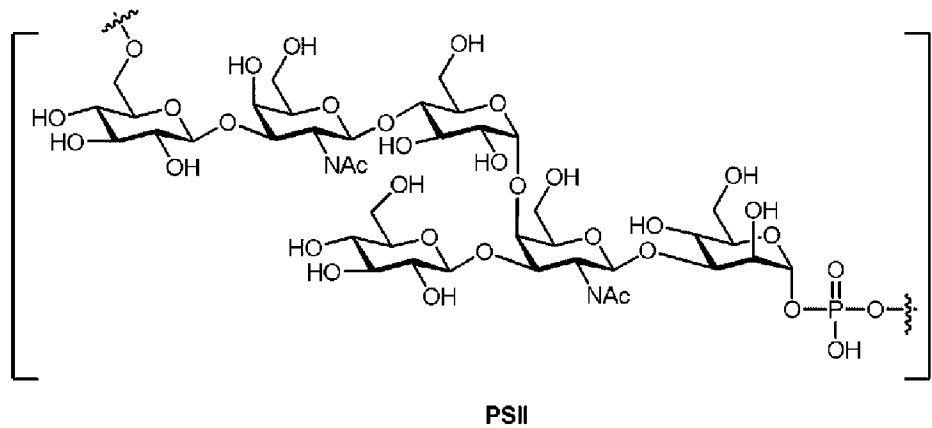


фосфатный фрагмент.

[0347] Вариант осуществления 74. Композиция по любому из вариантов осуществления 62-73, где полисахарид клеточной поверхности обогащен из *C. difficile* и не конъюгирован со вторым полипептидом или третьим полипептидом.

[0348] Вариант осуществления 75. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-74, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой обогащенный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

[0349] Вариант осуществления 76. Композиция по варианту осуществления 72 или 73, где PSII представляет собой полисахарид формулы (I):



где n представляет собой целое число от 1 до 100.

[0350] Вариант осуществления 77. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-76, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

[0351] Вариант осуществления 78. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-77, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу примерно 8,8 кДа.

[0352] Вариант осуществления 79. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-78, дополнительно содержащая адъювант.

[0353] Вариант осуществления 80. Композиция по варианту осуществления 79, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

[0354] Вариант осуществления 81. Композиция по варианту осуществления 79, где адъювант содержит гидроксид алюминия.

[0355] Вариант осуществления 82. Композиция по варианту осуществления 79, где адъювант содержит фосфат алюминия.

[0356] Вариант осуществления 83. Композиция по варианту осуществления 79, где адъювант содержит микрочастицы дельта-инулина.

[0357] Вариант осуществления 84. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-83, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем.

[0358] Вариант осуществления 85. Композиция по варианту осуществления 84, где

белок-носитель представляет собой мутант дифтерийного токсина.

**[0359]** Вариант осуществления 86. Композиция по варианту осуществления 84, где белок-носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>.

**[0360]** Вариант осуществления 87. Композиция по любому из вариантов осуществления 84-86, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем химическим линкером.

**[0361]** Вариант осуществления 88. Композиция по варианту осуществления 87, где химический линкер содержит тиосукцинимид.

**[0362]** Вариант осуществления 89. Композиция по варианту осуществления 87, где химический линкер содержит тиоэфир.

**[0363]** Вариант осуществления 90. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-89, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 1000 кДа.

**[0364]** Вариант осуществления 91. Композиция по варианту осуществления 90, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 350 кДа.

**[0365]** Вариант осуществления 92. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-91, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0366]** Вариант осуществления 93. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-92, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* не является синтетическим.

**[0367]** Вариант осуществления 94. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-93, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* очищен из одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0368]** Вариант осуществления 95. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-94, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* получен из экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0369]** Вариант осуществления 96. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-95, где композиция или фармацевтическая композиция содержит менее 20% по массе полипептида *C. difficile*.

**[0370]** Вариант осуществления 97. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-96, где *C. difficile* относится к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

**[0371]** Вариант осуществления 98. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-97, которая представляет собой иммуногенную композицию или вакцину.

**[0372]** Вариант осуществления 99. Композиция по варианту осуществления 98, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против антигена PSII.

**[0373]** Вариант осуществления 100. Композиция по варианту осуществления 98 или

99, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* и/или токсина В *C. difficile*.

**[0374]** Вариант осуществления 101. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-100, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0375]** Вариант осуществления 102. Композиция по варианту осуществления 101, где примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание.

**[0376]** Вариант осуществления 103. Композиция по варианту осуществления 101 или 102, где примесь представляет собой примесь *C. difficile*.

**[0377]** Вариант осуществления 104. Композиция по любому из вариантов осуществления 101-103, где примесь представляет собой нуклеиновую кислоту.

**[0378]** Вариант осуществления 105. Композиция по любому из вариантов осуществления 101-103, где примесь представляет собой сахарид.

**[0379]** Вариант осуществления 106. Композиция по любому из вариантов осуществления 101-103, где примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0380]** Вариант осуществления 107. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-102, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0381]** Вариант осуществления 108. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-102, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0382]** Вариант осуществления 109. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-102, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси нуклеиновой кислоты относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0383]** Вариант осуществления 110. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-102, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси сахараида относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0384]** Вариант осуществления 111. Вариант осуществления 199. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-101, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(а) смеси примесей нуклеиновой кислоты и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(b) смеси примесей нуклеиновой кислоты и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(с) смеси примесей пептидогликана и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(d) смеси примесей сахараида и белка относительно общей массы полисахарида

клеточной поверхности;

(е) смеси примесей пептидогликана и сахарада; и

(f) смеси примесей нуклеиновой кислоты и сахарада относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0385]** Вариант осуществления 112. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-101, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(a) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(b) смеси примесей сахарада, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(c) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и сахарада относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности; и

(d) смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана и сахарада относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0386]** Вариант осуществления 113. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-112, содержащая менее примерно 5% по массе смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана, сахарада и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0387]** Вариант осуществления 114. Композиция по любому из вариантов осуществления 58-113, содержащая по меньшей мере 5% по массе полисахарида клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0388]** Вариант осуществления 115. Композиция, содержащая:

(a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и

(b) первый полипептид, содержащий белок-носитель, полученный из организма, отличного от *C. difficile*;

где белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности присутствуют в композиции в соотношении от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0389]** Вариант осуществления 116. Композиция по варианту осуществления 115, дополнительно содержащая второй полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

**[0390]** Вариант осуществления 117. Композиция по варианту осуществления 116, где второй полипептид представляет собой анатоксин токсина А *C. difficile* (TcdA) или его фрагмент.

**[0391]** Вариант осуществления 118. Композиция по варианту осуществления 116 или 117, где второй полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина А.

**[0392]** Вариант осуществления 119. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-118, дополнительно содержащая третий полипептид или второй

полинуклеотид, кодирующий третий полипептид, где третий полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

**[0393]** Вариант осуществления 120. Композиция по варианту осуществления 119, где третий полипептид представляет собой анатоксин токсина В *C. difficile* (TcdB) или его фрагмент.

**[0394]** Вариант осуществления 121. Композиция по варианту осуществления 119 или 120, где третий полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина В.

**[0395]** Вариант осуществления 122. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-121, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой анионный полисахарид клеточной поверхности.

**[0396]** Вариант осуществления 123. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-122, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* является незамещенным или замещенным.

**[0397]** Вариант осуществления 124. Композиция по любому из вариантов осуществления 116-123, где второй полипептид и третий полипептид являются слитыми.

**[0398]** Вариант осуществления 125. Композиция по любому из вариантов осуществления 116-124, где второй полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 4-6.

**[0399]** Вариант осуществления 126. Композиция по любому из вариантов осуществления 116-125, где третий полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40.

**[0400]** Вариант осуществления 127. Композиция по любому из вариантов осуществления 116-126, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и второго полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0401]** Вариант осуществления 128. Композиция по любому из вариантов осуществления 119-127, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и третьего полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0402]** Вариант осуществления 129. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-128, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или иммуногенный фрагмент.

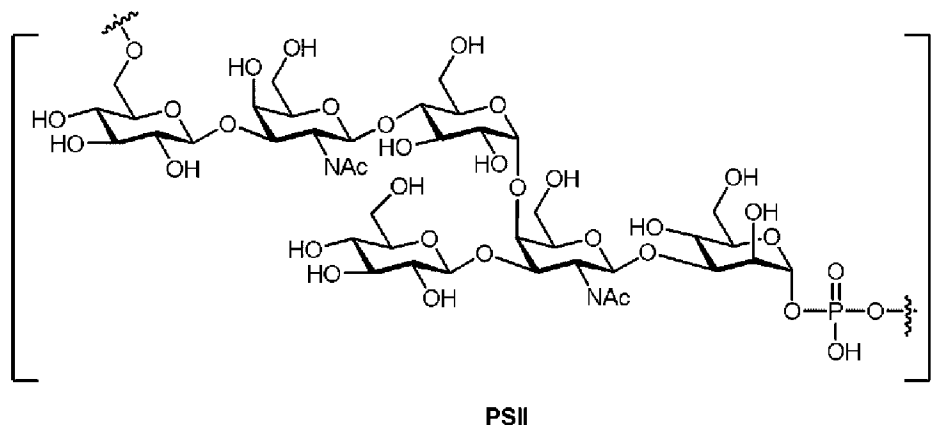
**[0403]** Вариант осуществления 130. Композиция по варианту осуществления 129, где PSII или его фармацевтически приемлемая соль, или иммуногенный фрагмент содержит фосфатный фрагмент.

**[0404]** Вариант осуществления 131. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-130, где полисахарид клеточной поверхности обогащен из *C. difficile* и не конъюгирован со вторым полипептидом или третьим полипептидом.

**[0405]** Вариант осуществления 132. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-131, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой обогащенный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0406]** Вариант осуществления 133. Композиция по варианту осуществления 129 или

130, где PSII представляет собой полисахарид формулы (I):



где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 100.

**[0407]** Вариант осуществления 134. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-133, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

**[0408]** Вариант осуществления 135. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-134, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу примерно 8,8 кДа.

**[0409]** Вариант осуществления 136. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-135, дополнительно содержащая адъювант.

**[0410]** Вариант осуществления 137. Композиция по варианту осуществления 136, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

**[0411]** Вариант осуществления 138. Композиция по варианту осуществления 136, где адъювант содержит гидроксид алюминия.

**[0412]** Вариант осуществления 139. Композиция по варианту осуществления 136, где адъювант содержит фосфат алюминия.

**[0413]** Вариант осуществления 140. Композиция по варианту осуществления 136, где адъювант содержит микрочастицы дельта-инулина.

**[0414]** Вариант осуществления 141. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-140, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем.

**[0415]** Вариант осуществления 142. Композиция по варианту осуществления 141, где белок-носитель представляет собой мутант дифтерийного токсина.

**[0416]** Вариант осуществления 143. Композиция по варианту осуществления 141, где белок-носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>.

**[0417]** Вариант осуществления 144. Композиция по любому из вариантов осуществления 141-143, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем химическим линкером.

**[0418]** Вариант осуществления 145. Композиция по варианту осуществления 144, где химический линкер содержит тиосукцинимид.

**[0419]** Вариант осуществления 146. Композиция по варианту осуществления 144, где химический линкер содержит тиоэфир.

**[0420]** Вариант осуществления 147. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-146, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 1000 кДа.

**[0421]** Вариант осуществления 148. Композиция по варианту осуществления 147, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 350 кДа.

**[0422]** Вариант осуществления 149. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-148, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0423]** Вариант осуществления 150. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-149, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* не является синтетическим.

**[0424]** Вариант осуществления 151. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-150, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* очищен из одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0425]** Вариант осуществления 152. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-151, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* получен из экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0426]** Вариант осуществления 153. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-152, где композиция или фармацевтическая композиция содержит менее 20% по массе полипептида *C. difficile*.

**[0427]** Вариант осуществления 154. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-153, где *C. difficile* относится к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

**[0428]** Вариант осуществления 155. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-154, которая представляет собой иммуногенную композицию или вакцину.

**[0429]** Вариант осуществления 156. Композиция по варианту осуществления 155, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против антигена PSII.

**[0430]** Вариант осуществления 157. Композиция по варианту осуществления 155 или 156, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* и/или токсина В *C. difficile*.

**[0431]** Вариант осуществления 158. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-157, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0432]** Вариант осуществления 159. Композиция по варианту осуществления 158, где примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание.

**[0433]** Вариант осуществления 160. Композиция по варианту осуществления 158 или 159, где примесь представляет собой примесь *C. difficile*.

**[0434]** Вариант осуществления 161. Композиция по любому из вариантов осуществления 158-160, где примесь представляет собой нуклеиновую кислоту.

**[0435]** Вариант осуществления 162. Композиция по любому из вариантов осуществления 158-160, где примесь представляет собой сахарид.

**[0436]** Вариант осуществления 163. Композиция по любому из вариантов осуществления 158-160, где примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0437]** Вариант осуществления 164. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-163, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0438]** Вариант осуществления 165. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-163, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0439]** Вариант осуществления 166. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-163, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси нуклеиновой кислоты относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0440]** Вариант осуществления 167. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-163, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси сахараида относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0441]** Вариант осуществления 168. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-159, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(а) смеси примесей нуклеиновой кислоты и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(b) смеси примесей нуклеиновой кислоты и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(c) смеси примесей пептидогликана и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(d) смеси примесей сахараида и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(e) смеси примесей пептидогликана и сахараида; и

(f) смеси примесей нуклеиновой кислоты и сахараида относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0442]** Вариант осуществления 169. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-159, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из



(a) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(b) смеси примесей сахара, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности;

(c) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности; и

(d) смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0443]** Вариант осуществления 170. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-169, содержащая менее примерно 5% по массе смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана, сахара и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности.

**[0444]** Вариант осуществления 171. Композиция по любому из вариантов осуществления 115-170, содержащая по меньшей мере 5% по массе полисахарида клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0445]** Вариант осуществления 172. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из вариантов осуществления 1-171.

**[0446]** Вариант осуществления 173. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*);

(b) первый полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент;

(c) второй полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и

(d) фармацевтически приемлемый носитель;

где фармацевтическая композиция имеет общее процентное содержание углеводов, где по меньшей мере примерно 90% общего процентного содержания углеводов составляет PSII.

**[0447]** Вариант осуществления 174. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 173, где первый полипептид представляет собой анатоксин токсина А *C. difficile* (TcdA) или его фрагмент.

**[0448]** Вариант осуществления 175. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 173-174, где первый полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина А *C. difficile*.

**[0449]** Вариант осуществления 176. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-175, где второй полипептид представляет собой анатоксин токсина В *C. difficile* (TcdB) или его фрагмент.

**[0450]** Вариант осуществления 177. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-176, где второй полипептид представляет собой

полноразмерный анатоксин токсина В.

**[0451]** Вариант осуществления 178. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-177, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой анионный полисахарид клеточной поверхности.

**[0452]** Вариант осуществления 179. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-178, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* является незамещенным или замещенным.

**[0453]** Вариант осуществления 180. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-179, где первый полипептид и второй полипептид являются слитыми.

**[0454]** Вариант осуществления 181. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-180, где первый полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 4-6.

**[0455]** Вариант осуществления 182. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-181, где второй полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40.

**[0456]** Вариант осуществления 183. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-182, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и первого полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

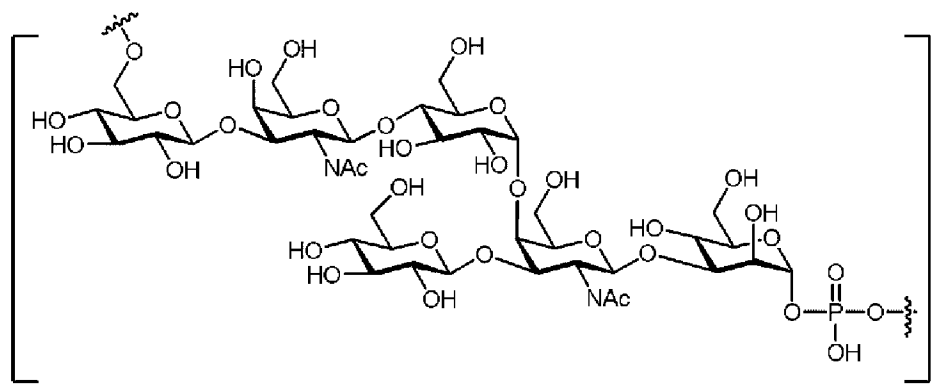
**[0457]** Вариант осуществления 184. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-183, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и второго полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0458]** Вариант осуществления 185. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-184, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или иммуногенный фрагмент.

**[0459]** Вариант осуществления 186. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 185, где PSII, его фармацевтически приемлемая соль или иммуногенный фрагмент содержит фосфатный фрагмент.

**[0460]** Вариант осуществления 187. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-186, где полисахарид клеточной поверхности не конъюгирован с первым полипептидом или вторым полипептидом.

**[0461]** Вариант осуществления 188. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-187, где PSII представляет собой полисахарид формулы (I):



PSII

где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 100.

**[0462]** Вариант осуществления 189. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-188, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

**[0463]** Вариант осуществления 190. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-189, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу примерно 8,8 кДа.

**[0464]** Вариант осуществления 191. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-190, дополнительно содержащая адъювант.

**[0465]** Вариант осуществления 192. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 191, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

**[0466]** Вариант осуществления 193. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 191, где адъювант содержит гидроксид алюминия.

**[0467]** Вариант осуществления 194. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 191, где адъювант содержит фосфат алюминия.

**[0468]** Вариант осуществления 195. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 191, где адъювант содержит микрочастицы дельта-инулина.

**[0469]** Вариант осуществления 196. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-195, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с фармацевтически приемлемым носителем.

**[0470]** Вариант осуществления 197. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 196, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой мутант дифтерийного токсина.

**[0471]** Вариант осуществления 198. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 196, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>.

**[0472]** Вариант осуществления 199. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 196-198, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с фармацевтически приемлемым носителем химическим линкером.

**[0473]** Вариант осуществления 200. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 199, где химический линкер содержит тиосукцинимид.

**[0474]** Вариант осуществления 201. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 199, где химический линкер содержит тиоэфир.

**[0475]** Вариант осуществления 202. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-201, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 1000 кДа.

**[0476]** Вариант осуществления 203. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-201, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 350 кДа.

**[0477]** Вариант осуществления 204. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-203, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0478]** Вариант осуществления 205. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-204, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, не является синтетическим.

**[0479]** Вариант осуществления 206. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-205, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, очищен из одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0480]** Вариант осуществления 207. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-206, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, получен из экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0481]** Вариант осуществления 208. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-207, которая содержит менее примерно 20% по массе полипептида из *C. difficile*.

**[0482]** Вариант осуществления 209. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-208, где *C. difficile* относится к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

**[0483]** Вариант осуществления 210. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-209, которая представляет собой иммуногенную фармацевтическую композицию или вакцину.

**[0484]** Вариант осуществления 211. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 210, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против антигена PSp.

**[0485]** Вариант осуществления 212. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 210 или 211, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* или токсина В *C. difficile*.

[0486] Вариант осуществления 213. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 210 или 211, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* и токсина В *C. difficile*.

[0487] Вариант осуществления 214. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-213, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0488] Вариант осуществления 215. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 214, где примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание.

[0489] Вариант осуществления 216. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 214 или 215, где примесь представляет собой примесь *C. difficile*.

[0490] Вариант осуществления 217. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 214-216, где примесь представляет собой нуклеиновую кислоту.

[0491] Вариант осуществления 218. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 214-216, где примесь представляет собой сахарид.

[0492] Вариант осуществления 219. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 214-216, где примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

[0493] Вариант осуществления 220. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-219, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0494] Вариант осуществления 221. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-220, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0495] Вариант осуществления 222. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-221, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси нуклеиновой кислоты относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0496] Вариант осуществления 223. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-222, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси сахараида относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0497] Вариант осуществления 224. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-215, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(а) смеси примесей нуклеиновой кислоты и белка относительно общей массы

полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(b) смеси примесей нуклеиновой кислоты и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(c) смеси примесей пептидогликана и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(d) смеси примесей сахара и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(e) смеси примесей пептидогликана и сахара; и

(f) смеси примесей нуклеиновой кислоты и сахара относительно общей массы антигена PSII.

**[0498]** Вариант осуществления 225. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-215, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(a) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(b) смеси примесей сахара, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(c) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*; и

(d) смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0499]** Вариант осуществления 226. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-225, содержащая менее примерно 5% по массе смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана, сахара и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0500]** Вариант осуществления 227. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 173-226, содержащая по меньшей мере 5% по массе полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0501]** Вариант осуществления 228. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*);

(b) первый полипептид, содержащий первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент;

(c) второй полипептид, содержащий второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент;

и

(d) фармацевтически приемлемый носитель;

где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, не конъюгирован с первым полипептидом или вторым полипептидом.

**[0502]** Вариант осуществления 229. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 228, где первый полипептид представляет собой анатоксин токсина А *C.*

*difficile* (TcdA) или его фрагмент.

**[0503]** Вариант осуществления 230. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 228 или 229, где первый полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина A *C. difficile*.

**[0504]** Вариант осуществления 231. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-230, где второй полипептид представляет собой анатоксин токсина B *C. difficile* (TcdB) или его фрагмент.

**[0505]** Вариант осуществления 232. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-231, где второй полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина B.

**[0506]** Вариант осуществления 233. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-232, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой анионный полисахарид клеточной поверхности.

**[0507]** Вариант осуществления 234. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-233, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* является незамещенным или замещенным.

**[0508]** Вариант осуществления 235. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-234, где первый полипептид и второй полипептид являются слитыми.

**[0509]** Вариант осуществления 236. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-235, где первый полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 4-6.

**[0510]** Вариант осуществления 237. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-236, где второй полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40.

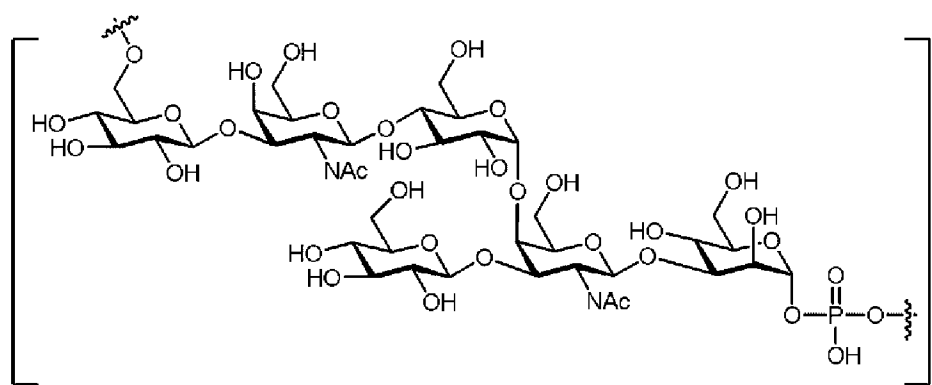
**[0511]** Вариант осуществления 238. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-237, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и первого полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0512]** Вариант осуществления 239. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-238, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и второго полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0513]** Вариант осуществления 240. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-239, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или иммуногенный фрагмент.

**[0514]** Вариант осуществления 241. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 240, где PSII, его фармацевтически приемлемая соль или иммуногенный фрагмент содержит фосфатный фрагмент.

**[0515]** Вариант осуществления 242. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-241, где PSII представляет собой полисахарид формулы (I):



PSII

где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 100.

**[0516]** Вариант осуществления 243. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-242, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

**[0517]** Вариант осуществления 244. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-243, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу примерно 8,8 кДа.

**[0518]** Вариант осуществления 245. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-244, дополнительно содержащая адъювант.

**[0519]** Вариант осуществления 246. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 245, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

**[0520]** Вариант осуществления 247. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 245, где адъювант содержит гидроксид алюминия.

**[0521]** Вариант осуществления 248. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 245, где адъювант содержит фосфат алюминия.

**[0522]** Вариант осуществления 249. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 245, где адъювант содержит микрочастицы дельта-инулина.

**[0523]** Вариант осуществления 250. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-249, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с фармацевтически приемлемым носителем.

**[0524]** Вариант осуществления 251. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 250, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой мутант дифтерийного токсина.

**[0525]** Вариант осуществления 252. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 250, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>.

**[0526]** Вариант осуществления 253. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 250-252, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с фармацевтически приемлемым носителем химическим линкером.



**[0527]** Вариант осуществления 254. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 253, где химический линкер содержит тиосукцинимид.

**[0528]** Вариант осуществления 255. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 253, где химический линкер содержит тиоэфир.

**[0529]** Вариант осуществления 256. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-255, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 1000 кДа.

**[0530]** Вариант осуществления 257. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-256, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 350 кДа.

**[0531]** Вариант осуществления 258. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-257, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0532]** Вариант осуществления 259. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-258, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, не является синтетическим.

**[0533]** Вариант осуществления 260. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-259, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, очищен из одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0534]** Вариант осуществления 261. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-260, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, получен из экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0535]** Вариант осуществления 262. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-261, где фармацевтическая композиция содержит менее примерно 20% по массе полипептида из *C. difficile*.

**[0536]** Вариант осуществления 263. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-262, где *C. difficile* относится к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

**[0537]** Вариант осуществления 264. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-263, которая представляет собой иммуногенную фармацевтическую композицию или вакцину.

**[0538]** Вариант осуществления 265. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 264, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0539]** Вариант осуществления 266. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 264 или 265, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* или токсина В *C. difficile*.

[0540] Вариант осуществления 267. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 264 или 265, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* и токсина В *C. difficile*.

[0541] Вариант осуществления 268. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-267, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0542] Вариант осуществления 269. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 268, где примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание.

[0543] Вариант осуществления 270. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 268 или 269, где примесь представляет собой примесь *C. difficile*.

[0544] Вариант осуществления 271. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 268-270, где примесь представляет собой нуклеиновую кислоту.

[0545] Вариант осуществления 272. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 268-270, где примесь представляет собой сахарид.

[0546] Вариант осуществления 273. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 268-270, где примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

[0547] Вариант осуществления 274. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-273, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0548] Вариант осуществления 275. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-274, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0549] Вариант осуществления 276. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-275, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси нуклеиновой кислоты относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0550] Вариант осуществления 277. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-276, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси сахараида относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

[0551] Вариант осуществления 278. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-268, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(а) смеси примесей нуклеиновой кислоты и белка относительно общей массы

полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(b) смеси примесей нуклеиновой кислоты и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(c) смеси примесей пептидогликана и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(d) смеси примесей сахара и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(e) смеси примесей пептидогликана и сахара; и

(f) смеси примесей нуклеиновой кислоты и сахара относительно общей массы антигена PSII.

**[0552]** Вариант осуществления 279. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-268, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(a) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(b) смеси примесей сахара, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(c) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*; и

(d) смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0553]** Вариант осуществления 280. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-279, содержащая менее примерно 5% по массе смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана, сахара и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0554]** Вариант осуществления 281. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-280, содержащая по меньшей мере 5% по массе полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0555]** Вариант осуществления 282. Фармацевтическая композиция, состоящая в основном из:

(a) полисахарида клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), конъюгированного с фармацевтически приемлемым носителем,

(b) первого полипептида или первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, где первый полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент,

(c) второго полипептида или второго полинуклеотида, кодирующего второй полипептид, где второй полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент; и

(d) адьюванта.

**[0556]** Вариант осуществления 283. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 282, где первый полипептид представляет собой анатоксин токсина *A. C. difficile* (TcdA) или его фрагмент.

**[0557]** Вариант осуществления 284. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 282 или 283, где первый полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина *A. C. difficile*.

**[0558]** Вариант осуществления 285. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-284, где второй полипептид представляет собой анатоксин токсина *B. C. difficile* (TcdB) или его фрагмент.

**[0559]** Вариант осуществления 286. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-285, где второй полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина *B*.

**[0560]** Вариант осуществления 287. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-286, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой анионный полисахарид клеточной поверхности.

**[0561]** Вариант осуществления 288. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-287, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* является незамещенным или замещенным.

**[0562]** Вариант осуществления 289. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-288, где первый полипептид и второй полипептид являются слитыми.

**[0563]** Вариант осуществления 290. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-289, где первый полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 4-6.

**[0564]** Вариант осуществления 291. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-290, где второй полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40.

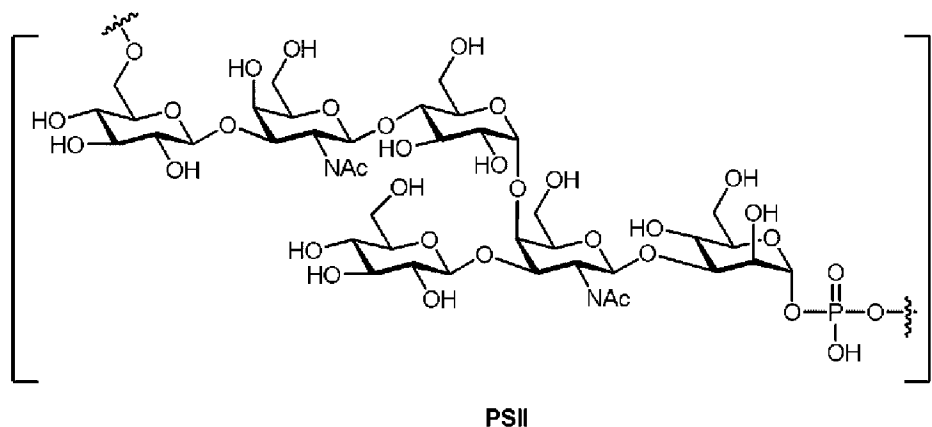
**[0565]** Вариант осуществления 292. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-291, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и первого полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0566]** Вариант осуществления 293. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-292, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и второго полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.

**[0567]** Вариант осуществления 294. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-293, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или иммуногенный фрагмент.

**[0568]** Вариант осуществления 295. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 294, где PSII, его фармацевтически приемлемая соль или иммуногенный фрагмент содержит фосфатный фрагмент.

**[0569]** Вариант осуществления 296. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 295, где PSII представляет собой полисахарид формулы (I):



где n представляет собой целое число от 1 до 100.

**[0570]** Вариант осуществления 297. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-296, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

**[0571]** Вариант осуществления 298. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-297, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу примерно 8,8 кДа.

**[0572]** Вариант осуществления 299. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-298, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

**[0573]** Вариант осуществления 300. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-298, где адъювант содержит гидроксид алюминия.

**[0574]** Вариант осуществления 301. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-298, где адъювант содержит фосфат алюминия.

**[0575]** Вариант осуществления 302. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-298, где адъювант содержит микрочастицы дельта-инулина.

**[0576]** Вариант осуществления 303. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-302, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой мутант дифтерийного токсина.

**[0577]** Вариант осуществления 304. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-302, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>.

**[0578]** Вариант осуществления 305. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-304, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с фармацевтически приемлемым носителем химическим линкером.

**[0579]** Вариант осуществления 306. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 305, где химический линкер содержит тиосукцинимид.

**[0580]** Вариант осуществления 307. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 305, где химический линкер содержит тиоэфир.

**[0581]** Вариант осуществления 308. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-307, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 1000 кДа.

**[0582]** Вариант осуществления 309. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-308, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 350 кДа.

**[0583]** Вариант осуществления 310. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-309, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0584]** Вариант осуществления 311. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-310, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, не является синтетическим.

**[0585]** Вариант осуществления 312. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-311, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, очищен из одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0586]** Вариант осуществления 313. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-312, где полисахарид клеточной поверхности, обогащенный из *C. difficile*, получен из экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0587]** Вариант осуществления 314. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-313, которая содержит менее примерно 20% по массе полипептида из *C. difficile*.

**[0588]** Вариант осуществления 315. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-314, где *C. difficile* относится к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

**[0589]** Вариант осуществления 316. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-315, которая представляет собой иммуногенную фармацевтическую композицию или вакцину.

**[0590]** Вариант осуществления 317. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 316, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0591]** Вариант осуществления 318. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 316 или 317, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* или токсина В *C. difficile*.

**[0592]** Вариант осуществления 319. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 316 или 317, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против

токсина А *C. difficile* и токсина В *C. difficile*.

**[0593]** Вариант осуществления 320. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 228-319, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0594]** Вариант осуществления 321. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 320, где примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание.

**[0595]** Вариант осуществления 322. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 320 или 321, где примесь представляет собой примесь *C. difficile*.

**[0596]** Вариант осуществления 323. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 320-322, где примесь представляет собой нуклеиновую кислоту.

**[0597]** Вариант осуществления 324. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 320-322, где примесь представляет собой сахарид.

**[0598]** Вариант осуществления 325. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 320-322, где примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0599]** Вариант осуществления 326. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-325, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0600]** Вариант осуществления 327. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-326, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0601]** Вариант осуществления 328. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-327, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси нуклеиновой кислоты относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0602]** Вариант осуществления 329. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-328, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси сахараида относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0603]** Вариант осуществления 330. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-320, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(а) смеси примесей нуклеиновой кислоты и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(b) смеси примесей нуклеиновой кислоты и пептидогликана относительно общей

массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(с) смеси примесей пептидогликана и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(d) смеси примесей сахара и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(е) смеси примесей пептидогликана и сахара; и

(f) смеси примесей нуклеиновой кислоты и сахара относительно общей массы антигена PSII.

**[0604]** Вариант осуществления 331. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-320, которая содержит менее примерно 5% по массе смеси примесей относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*, где смесь примесей выбрана из группы, состоящей из

(a) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(b) смеси примесей сахара, белка и пептидогликана относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*;

(с) смеси примесей нуклеиновой кислоты, белка и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*; и

(d) смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана и сахара относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0605]** Вариант осуществления 332. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-331, содержащая менее примерно 5% по массе смеси примесей нуклеиновой кислоты, пептидогликана, сахара и белка относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0606]** Вариант осуществления 333. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 282-332, содержащая по меньшей мере 5% по массе полисахарида клеточной поверхности, обогащенного из *C. difficile*.

**[0607]** Вариант осуществления 334. Способ лечения инфекции, включающий:

(a) введение терапевтически эффективного количества композиции по любому из вариантов осуществления 1-171 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 172-333 субъекту, который нуждается в этом; где инфекция представляет собой инфекцию *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*);

(b) после введения фармацевтической композиции сбор образца фекалий у субъекта;  
и

(с) анализ фекалий и определение изменения количества колониеобразующих единиц (КОЕ)/мг *C. difficile* в фекалиях в качестве маркера инфекции.

**[0608]** Вариант осуществления 335. Способ по варианту осуществления 334, где у субъекта отсутствуют симптомы инфекции *C. difficile*.

**[0609]** Вариант осуществления 336. Способ по варианту осуществления 334 или 335, где введение является парентеральным.



**[0610]** Вариант осуществления 337. Способ по варианту осуществления 334 или 335, где введение является внутривенным.

**[0611]** Вариант осуществления 338. Способ по варианту осуществления 334 или 335, где введение является внутримышечным.

**[0612]** Вариант осуществления 339. Способ по любому из вариантов осуществления 334-338, где сбор образца фекалий проводят по меньшей мере через 1 день после введения композиции или фармацевтической композиции.

**[0613]** Вариант осуществления 340. Способ по варианту осуществления 339, где сбор образца фекалий проводят по меньшей мере через 6 дней после введения композиции или фармацевтической композиции.

**[0614]** Вариант осуществления 341. Способ по варианту осуществления 339, где сбор образца фекалий проводят по меньшей мере через 9 дней после введения композиции или фармацевтической композиции.

**[0615]** Вариант осуществления 342. Способ по варианту осуществления 339, где сбор образца фекалий проводят по меньшей мере через 14 дней после введения композиции или фармацевтической композиции.

**[0616]** Вариант осуществления 343. Способ по любому из вариантов осуществления 334-342, где анализ включает посев и анализ кПЦР.

**[0617]** Вариант осуществления 344. Способ по любому из вариантов осуществления 334-343, который включает определение процентного снижения количества КОЕ/мг *S. difficile* в фекалиях и корректировку дозировки/лечения.

**[0618]** Вариант осуществления 345. Способ по варианту осуществления 344, где процентное снижение представляет собой по меньшей мере 60% снижение количества КОЕ/мг *S. difficile* в сравнении с отсутствием терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции.

**[0619]** Вариант осуществления 346. Способ по любому из вариантов осуществления 334-345, где, если в образце фекалий наблюдается увеличение количества КОЕ/мг в сравнении с образцом фекалий в отсутствие введения фармацевтической композиции, вводят второе терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, которое больше, чем терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

**[0620]** Вариант осуществления 347. Способ по варианту осуществления 334, где, если в образце фекалий наблюдается снижение количества КОЕ/мг в сравнении с образцом фекалий в отсутствие введения фармацевтической композиции, вводят третье терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, которое меньше, чем терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

**[0621]** Вариант осуществления 348. Способ по любому из вариантов осуществления 334-347, где введение выполняют еженедельно.

**[0622]** Вариант осуществления 349. Способ по любому из вариантов осуществления 334-347, где введение выполняют еженедельно в течение двух недель.

**[0623]** Вариант осуществления 350. Способ по любому из вариантов осуществления 334-347, где введение выполняют раз в две недели.

**[0624]** Вариант осуществления 351. Способ по любому из вариантов осуществления 334-347, где введение выполняют раз в две недели в течение одного месяца.

**[0625]** Вариант осуществления 352. Способ по любому из вариантов осуществления 334-351, где субъект проживает в доме престарелых.

**[0626]** Вариант осуществления 353. Способ по любому из вариантов осуществления 334-352, где субъект имеет в анамнезе инфекцию *C. difficile*.

**[0627]** Вариант осуществления 354. Способ по любому из вариантов осуществления 334-353, где субъект имеет положительное количество КОЕ/мг *C. difficile*.

**[0628]** Вариант осуществления 355. Способ по любому из вариантов осуществления 334-354, дополнительно включающий применение терапевтического средства.

**[0629]** Вариант осуществления 356. Способ по варианту осуществления 355, где терапевтическое средство представляет собой антибиотик.

**[0630]** Вариант осуществления 357. Способ по варианту осуществления 356, где антибиотик представляет собой ванкомицин.

**[0631]** Вариант осуществления 358. Способ по варианту осуществления 356, где антибиотик представляет собой фидаксомицин.

**[0632]** Вариант осуществления 359. Способ лечения инфекции, включающий введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей

(a) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и

(b) полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, где полипептид содержит анатоксин *C. difficile* или его фрагмент;

где введение выполняют еженедельно или раз в две недели, и

где инфекция вызвана *C. difficile*.

**[0633]** Вариант осуществления 360. Способ по варианту осуществления 359, где фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 172-333.

**[0634]** Вариант осуществления 361. Способ по варианту осуществления 359 или 360, где субъект не проявляет симптомов инфекции *C. difficile*.

**[0635]** Вариант осуществления 362. Способ по любому из вариантов осуществления 359-361, где введение является парентеральным.

**[0636]** Вариант осуществления 363. Способ по любому из вариантов осуществления 359-361, где введение является внутривенным.

**[0637]** Вариант осуществления 364. Способ по любому из вариантов осуществления 359-361, где введение является внутримышечным.

**[0638]** Вариант осуществления 365. Способ по любому из вариантов осуществления 359-364, который включает определение процентного снижения количества КОЕ/мг *C. difficile* в фекалиях и корректировку дозировки/лечения.

**[0639]** Вариант осуществления 366. Способ по любому из вариантов осуществления 365, где процентное снижение представляет собой по меньшей мере 60% снижение количества КОЕ/мг *C. difficile* в сравнении с отсутствием терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции.

**[0640]** Вариант осуществления 367. Способ по любому из вариантов осуществления 359-366, где, если в образце фекалий наблюдается увеличение количества КОЕ/мг в сравнении с образцом фекалий в отсутствие введения фармацевтической композиции, вводят второе терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, которое больше, чем терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

**[0641]** Вариант осуществления 368. Способ по варианту осуществления 367, где, если в образце фекалий наблюдается снижение количества КОЕ/мг в сравнении с образцом фекалий в отсутствие введения фармацевтической композиции, вводят третье терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, которое меньше, чем терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

**[0642]** Вариант осуществления 369. Способ по любому из вариантов осуществления 359-368, где введение выполняют еженедельно в течение двух недель.

**[0643]** Вариант осуществления 370. Способ по любому из вариантов осуществления 359-368, где введение выполняют раз в две недели.

**[0644]** Вариант осуществления 371. Способ по любому из вариантов осуществления 359-368, где введение выполняют раз в две недели в течение одного месяца.

**[0645]** Вариант осуществления 372. Способ по любому из вариантов осуществления 359-371, где субъект проживает в доме престарелых.

**[0646]** Вариант осуществления 373. Способ по любому из вариантов осуществления 359-372, где субъект имеет в анамнезе инфекцию *C. difficile*.

**[0647]** Вариант осуществления 374. Способ по любому из вариантов осуществления 359-373, где субъект имеет положительное количество КОЕ/мг *C. difficile*.

**[0648]** Вариант осуществления 375. Способ по любому из вариантов осуществления 359-374, дополнительно включающий применение терапевтического средства.

**[0649]** Вариант осуществления 376. Способ по варианту осуществления 375, где терапевтическое средство представляет собой антибиотик.

**[0650]** Вариант осуществления 377. Способ по варианту осуществления 375, где антибиотик представляет собой ванкомицин.

**[0651]** Вариант осуществления 378. Способ по варианту осуществления 375, где антибиотик представляет собой фидаксомицин.

**[0652]** Вариант осуществления 379. Способ, включающий:

(а) выбор субъекта из группы, состоящей из:

(i) первого субъекта, который старше 55 лет;

(ii) второго субъекта, который в анамнезе перенес инфекцию *C. difficile* в пределах 6-месячного периода; и

(iii) третьего субъекта, который имеет положительное количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мг *C. difficile*; и

(b) введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* и полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, где полипептид содержит анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.

**[0653]** Вариант осуществления 380. Способ по варианту осуществления 379, где фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 172-333.

**[0654]** Вариант осуществления 381. Способ по варианту осуществления 379, где первый субъект проживает в доме престарелых.

**[0655]** Вариант осуществления 382. Способ по варианту осуществления 379, где первый субъект имеет в анамнезе инфекцию *C. difficile*.

**[0656]** Вариант осуществления 383. Способ по варианту осуществления 379, где первый субъект имеет в анамнезе лечение антибиотиками широкого спектра действия.

**[0657]** Вариант осуществления 384. Способ по варианту осуществления 379, где второй субъект имеет положительное количество КОЕ/мг *C. difficile*.

**[0658]** Вариант осуществления 385. Способ лечения инфекции, включающий

(a) получение информации о генетической последовательности биологического образца, полученного от субъекта, для определения наличия инфекции, где инфекция представляет собой инфекцию *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

**[0659]** Вариант осуществления 386. Способ по варианту осуществления 385, где фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 172-333.

**[0660]** Вариант осуществления 387. Способ по варианту осуществления 385, который включает проведение анализа, где анализ представляет собой полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) или тест амплификации нуклеиновой кислоты (ТАНК).

**[0661]** Вариант осуществления 388. Способ по варианту осуществления 385, где анализ проводят на образце фекалий субъекта.

**[0662]** Вариант осуществления 389. Способ по варианту осуществления 388, где в анализе определяют КОЕ/мг *C. difficile* в образце фекалий.

**[0663]** Вариант осуществления 390. Способ обогащения по полисахариду клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), включающий:

(a) получение экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*, и

(b) обогащение по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* из ЭКП, с получением в результате обогащенного по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile*

образца;

где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образец содержит менее примерно 5% по массе примесей *C. difficile*.

**[0664]** Вариант осуществления 391. Способ по варианту осуществления 390, который включает: обогащение по PSII из ЭКП, с получением тем самым обогащенного по PSII образца;

где обогащенный по PSII образец содержит PSII и (a) имеет уровень примеси пептидогликана, составляющий менее 5% по массе пептидогликана относительно общей массы PSII;

(b) уровень примеси белка, составляющий менее 5% по массе белка относительно общей массы PSII; или

(c) уровень примеси нуклеиновой кислоты, составляющий менее 5% по массе нуклеиновой кислоты относительно общей массы PSII.

**[0665]** Вариант осуществления 392. Способ по варианту осуществления 390, где получение включает снятие поверхностного слоя одного или более штаммов *C. difficile*.

**[0666]** Вариант осуществления 393. Способ по варианту осуществления 392, где один или более штаммов *C. difficile* относятся к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

**[0667]** Вариант осуществления 394. Способ по любому из вариантов осуществления 390-393, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит менее примерно 5% по массе белка *C. difficile*.

**[0668]** Вариант осуществления 395. Способ по любому из вариантов осуществления 390-394, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* выбран из группы, состоящей из PSI, PSII, PSIII, их фармацевтически приемлемых солей и их иммуногенных фрагментов.

**[0669]** Вариант осуществления 396. Способ по любому из вариантов осуществления 390-395, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* содержит фосфатный фрагмент.

**[0670]** Вариант осуществления 397. Способ по любому из вариантов осуществления 390-396, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой PSII.

**[0671]** Вариант осуществления 398. Способ по любому из вариантов осуществления 390-397, где обогащение включает стадию осаждения этанолом.

**[0672]** Вариант осуществления 399. Способ по любому из вариантов осуществления 390-398, где обогащение включает одну или более стадий осаждения ТХУ.

**[0673]** Вариант осуществления 400. Способ по любому из вариантов осуществления 390-399, где обогащение включает стадию ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ).

**[0674]** Вариант осуществления 401. Способ по любому из вариантов осуществления 390-400, где обогащение включает стадию ионообменной хроматографии.

**[0675]** Вариант осуществления 402. Способ по варианту осуществления 401, где обогащение включает одну или более стадий осаждения ТХУ после стадии ионообменной хроматографии.

**[0676]** Вариант осуществления 403. Способ по варианту осуществления 401 или 402, где обогащение включает одну или более стадий ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) после стадии осаждения ТХУ и/или после стадии ионообменной хроматографии.

**[0677]** Вариант осуществления 404. Способ по любому из вариантов осуществления 401-403, где обогащение включает стадию фильтрации.

**[0678]** Вариант осуществления 405. Способ по варианту осуществления 404, где стадия фильтрации включает тангенциальную проточную фильтрацию или центрифугирование через фильтр с порогом отсека по молекулярной массе.

**[0679]** Вариант осуществления 406. Способ по варианту осуществления 405, где фильтр имеет порог отсека по молекулярной массе 3 кДа или менее.

**[0680]** Вариант осуществления 407. Способ по варианту осуществления 405, где фильтр имеет порог отсека по молекулярной массе 10 кДа или более.

**[0681]** Вариант осуществления 408. Способ по любому из вариантов осуществления 390-407, который дополнительно включает лиофилизацию.

**[0682]** Вариант осуществления 409. Способ по любому из вариантов осуществления 391-407, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит PSII и имеет уровень примеси пептидогликана, составляющий менее 5% по массе пептидогликана относительно общей массы PSII по результатам ЯМР.

**[0683]** Вариант осуществления 410. Способ по любому из вариантов осуществления 391-409, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит PSII и имеет уровень примеси белка, составляющий менее 5% по массе белка относительно общей массы PSII по результатам ЯМР.

**[0684]** Вариант осуществления 411. Способ по любому из вариантов осуществления 391-410, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит PSII и имеет уровень примеси нуклеиновой кислоты, составляющий менее 5% по массе нуклеиновой кислоты относительно общей массы PSII по результатам ЯМР.

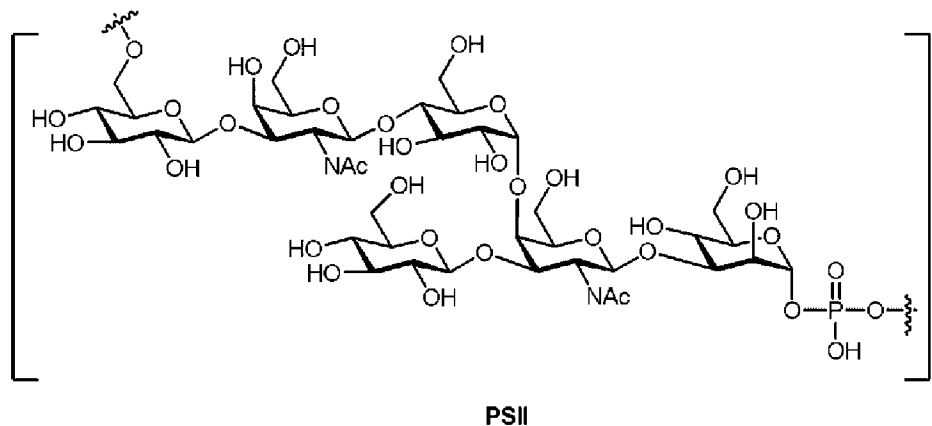
**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Композиция, содержащая:
  - (а) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и
  - (б) первый полипептид, содержащий белок-носитель, полученный из организма, отличного от *C. difficile*;где белок-носитель и полисахарид клеточной поверхности присутствуют в композиции в соотношении от примерно 10:1 до примерно 1:10.
2. Композиция по п. 1, дополнительно содержащая второй полипептид или первый полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, где второй полипептид содержит первый анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.
3. Композиция по п. 2, где второй полипептид представляет собой анатоксин токсина А *C. difficile* (TcdA) или его фрагмент.
4. Композиция по п. 2, где второй полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина А.
5. Композиция по п. 2, дополнительно содержащая третий полипептид или второй полинуклеотид, кодирующий третий полипептид, где третий полипептид содержит второй анатоксин *C. difficile* или его фрагмент.
6. Композиция по п. 5, где третий полипептид представляет собой анатоксин токсина В *C. difficile* (TcdB) или его фрагмент.
7. Композиция по п. 5, где третий полипептид представляет собой полноразмерный анатоксин токсина В.
8. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой анионный полисахарид клеточной поверхности.
9. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* является незамещенным или замещенным.
10. Композиция по п. 5, где второй полипептид и третий полипептид являются слитыми.
11. Композиция по п. 2, где второй полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 4-6.
12. Композиция по п. 5, где третий полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1-3 или 7-40.
13. Композиция по п. 2, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и второго полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.
14. Композиция по п. 5, где соотношение полисахарида клеточной поверхности *C. difficile* и третьего полипептида составляет от примерно 10:1 до примерно 1:10.
15. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой PSII, его фармацевтически приемлемую соль или иммуногенный фрагмент.
16. Композиция по п. 15, где PSII или его фармацевтически приемлемая соль, или иммуногенный фрагмент содержит фосфатный фрагмент.

17. Композиция по п. 5, где полисахарид клеточной поверхности обогащен из *C. difficile* и не конъюгирован со вторым полипептидом или третьим полипептидом.

18. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой обогащенный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

19. Композиция по п. 15, где PSII представляет собой полисахарид формулы (I):



где n представляет собой целое число от 1 до 100.

20. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

21. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности имеет молекулярную массу примерно 8,8 кДа.

22. Композиция по п. 1, дополнительно содержащая адъювант.

23. Композиция по п. 22, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

24. Композиция по п. 22, где адъювант содержит гидроксид алюминия.

25. Композиция по п. 22, где адъювант содержит фосфат алюминия.

26. Композиция по п. 22, где адъювант содержит микрочастицы дельта-инулина.

27. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем.

28. Композиция по п. 1, где белок-носитель представляет собой мутант дифтерийного токсина.

29. Композиция по п. 1, где белок-носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>.

30. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с белком-носителем химическим линкером.

31. Композиция по п. 30, где химический линкер содержит тиосукцинимид.

32. Композиция по п. 30, где химический линкер содержит тиоэфир.

33. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно 1000 кДа.

34. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* конъюгирован с CRM<sub>197</sub> и имеет молекулярную массу от примерно 100 кДа до примерно



350 кДа.

35. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой нативный полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.

36. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* очищен из одного или более штаммов *C. difficile*.

37. Композиция по п. 1, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* получен из экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*.

38. Композиция по п. 1, где композиция или фармацевтическая композиция содержит менее 20% по массе полипептида *C. difficile*.

39. Композиция по п. 1, где *C. difficile* относится к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

40. Композиция по п. 1, которая представляет собой иммуногенную композицию или вакцину.

41. Композиция по п. 1, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против антигена PSII.

42. Композиция по п. 1, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* или токсина В *C. difficile*.

43. Композиция по п. 1, которая индуцирует нейтрализующие титры антител против токсина А *C. difficile* и токсина В *C. difficile*.

44. Композиция по п. 1, которая содержит менее примерно 5% по массе примеси относительно общей массы полисахарида клеточной поверхности *C. difficile*.

45. Композиция по п. 44, где примесь представляет собой пептидогликан, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид или их сочетание.

46. Композиция по п. 44, где примесь представляет собой примесь *C. difficile*.

47. Композиция по п. 44, где примесь представляет собой нуклеиновую кислоту.

48. Композиция по п. 44, где примесь представляет собой сахарид.

49. Композиция по п. 44, где примесь происходит из экстракта клеточной поверхности *C. difficile*.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пунктов 1-49.

51. Способ лечения инфекции, включающий введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей

(а) полисахарид клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и

(б) полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, где полипептид содержит анатоксин *C. difficile* или его фрагмент;

где введение выполняют еженедельно или раз в две недели, и

где инфекция вызвана *C. difficile*.

52. Способ по п. 51, где фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию по п. 50.

53. Способ по п. 51, где субъект не проявляет симптомов инфекции *C. difficile*.
54. Способ по п. 51, где введение является внутривенным.
55. Способ по п. 51, где введение является внутримышечным.
56. Способ по п. 51, включающий определение процентного снижения количества КОЕ/мг *C. difficile* в фекалиях и корректировку дозировки/лечения.
57. Способ по п. 51, где процентное снижение представляет собой по меньшей мере 60% снижение количества КОЕ/мг *C. difficile* в сравнении с отсутствием терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции.
58. Способ по п. 51, где, если в образце фекалий, полученном от субъекта, наблюдается увеличение количества КОЕ/мг в сравнении с образцом фекалий в отсутствие введения фармацевтической композиции, вводят второе терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, которое больше, чем терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.
59. Способ по п. 58, где, если в образце фекалий наблюдается снижение количества КОЕ/мг в сравнении с образцом фекалий в отсутствие введения фармацевтической композиции, вводят третье терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, которое меньше, чем терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.
60. Способ по п. 51, где введение выполняют еженедельно в течение двух недель.
61. Способ по п. 51, где введение выполняют раз в две недели.
62. Способ по п. 51, где введение выполняют раз в две недели в течение одного месяца.
63. Способ по п. 51, где субъект проживает в доме престарелых.
64. Способ по п. 51, где субъект имеет в анамнезе инфекцию *C. difficile*.
65. Способ по п. 51, где субъект имеет положительное количество КОЕ/мг *C. difficile*.
66. Способ по п. 51, дополнительно включающий применение терапевтического средства.
  67. Способ по п. 66, где терапевтическое средство представляет собой антибиотик.
  68. Способ по п. 66, где антибиотик представляет собой ванкомицин.
  69. Способ по п. 66, где антибиотик представляет собой фидаксомицин.
  70. Способ лечения инфекции, включающий
    - (a) получение информации о генетической последовательности биологического образца, полученного от субъекта, для определения наличия инфекции, где инфекция представляет собой инфекцию *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*); и
    - (b) введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полисахарид клеточной поверхности *C. difficile*.
71. Способ по п. 70, где фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию по п. 50.
72. Способ по п. 70, который включает проведение анализа, где анализ представляет собой полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) или тест

амплификации нуклеиновой кислоты (ТАНК).

73. Способ по п. 72, где анализ проводят на образце фекалий субъекта.

74. Способ по п. 72, где в анализе определяют КОЕ/мг *C. difficile* в образце фекалий.

75. Способ обогащения по полисахариду клеточной поверхности *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*), включающий:

(а) получение экстракта клеточной поверхности (ЭКП) одного или более штаммов *C. difficile*, и

(б) обогащение по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* из ЭКП, с получением в результате обогащенного по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образца;

где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности *C. difficile* образец содержит менее примерно 5% по массе примесей *C. difficile*.

76. Способ по п. 75, который включает: обогащение по PSII из ЭКП, с получением тем самым обогащенного по PSII образца;

где обогащенный по PSII образец содержит PSII и (а) имеет уровень примеси пептидогликана, составляющий менее 5% по массе пептидогликана относительно общей массы PSII; (б) уровень примеси белка, составляющий менее 5% по массе белка относительно общей массы PSII; или (с) уровень примеси нуклеиновой кислоты, составляющий менее 5% по массе нуклеиновой кислоты относительно общей массы PSII.

77. Способ по п. 75, где получение включает снятие поверхностного слоя одного или более штаммов *C. difficile*.

78. Способ по п. 77, где один или более штаммов *C. difficile* относятся к риботипу 001, 003, 012, 014, 027, 036, 106, МОН 900 или МОН 718.

79. Способ по п. 75, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит менее примерно 5% по массе белка *C. difficile*.

80. Способ по п. 75, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* выбран из группы, состоящей из PSI, PSII, PSIII, их фармацевтически приемлемых солей и их иммуногенных фрагментов.

81. Способ по п. 75, где полисахарид клеточной поверхности *C. difficile* представляет собой PSII.

82. Способ по п. 75, где обогащение включает стадию осаждения этанолом.

83. Способ по п. 75, где обогащение включает одну или более стадий осаждения ТХУ.

84. Способ по п. 75, где обогащение включает стадию ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ).

85. Способ по п. 75, где обогащение включает стадию ионообменной хроматографии.

86. Способ по п. 75, где обогащение включает одну или более стадий осаждения ТХУ после стадии ионообменной хроматографии.

87. Способ по п. 86, где обогащение включает одну или более стадий

ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) после стадии осаждения ТХУ и/или после стадии ионообменной хроматографии.

88. Способ по п. 75, где обогащение включает стадию фильтрации.

89. Способ по п. 88, где стадия фильтрации включает тангенциальную проточную фильтрацию или центрифугирование через фильтр с порогом отсечения по молекулярной массе.

90. Способ по п. 89, где фильтр имеет порог отсечения по молекулярной массе 3 кДа или менее.

91. Способ по п. 89, где фильтр имеет порог отсечения по молекулярной массе 10 кДа или более.

92. Способ по п. 75, который дополнительно включает лиофилизацию.

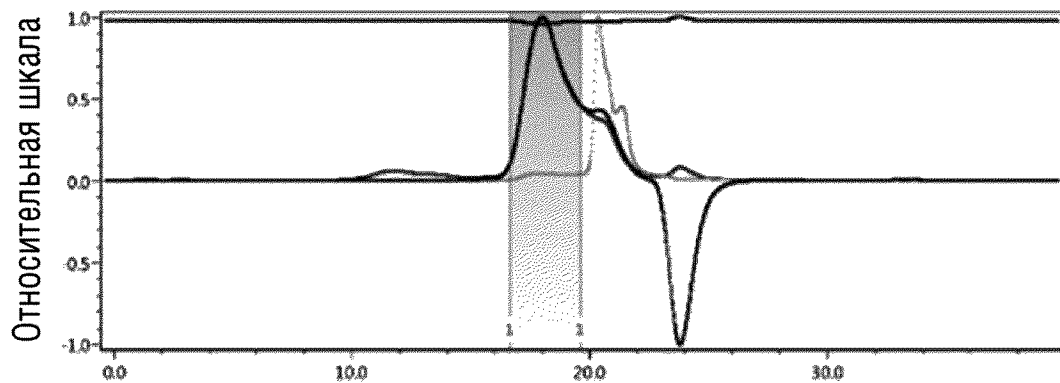
93. Способ по п. 75, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит PSII и имеет уровень примеси пептидогликана, составляющий менее 5% по массе пептидогликана относительно общей массы PSII по результатам ЯМР.

94. Способ по п. 93, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит PSII и имеет уровень примеси белка, составляющий менее 5% по массе белка относительно общей массы PSII по результатам ЯМР.

95. Способ по п. 75, где обогащенный по полисахариду клеточной поверхности образец *C. difficile* содержит PSII и имеет уровень примеси нуклеиновой кислоты, составляющий менее 5% по массе нуклеиновой кислоты относительно общей массы PSII по результатам ЯМР.

По доверенности

## ФИГ.1



Время (мин)

Молярные массовые моменты (г/моль)

Колонка Yarra 3u SEC 2000

Скорость потока: 0.5 мл/мин PBS

Средняя молярная масса: 8228 дальтон

Полидисперсность (Mw/Mn) = 1.00

Mn  $8.224 \times 10^3$  ( $\pm 1.642\%$ )

Mr  $8.184 \times 10^3$  ( $\pm 0.625\%$ )

Mv н/п

Mw  $8.228 \times 10^3$  ( $\pm 1.659\%$ )

Mz  $8.232 \times 10^3$  ( $\pm 3.727\%$ )

Полидисперсность

Mw/Mn 1.000 ( $\pm 2.334\%$ )

Mz/Mn 1.001 ( $\pm 4.072\%$ )

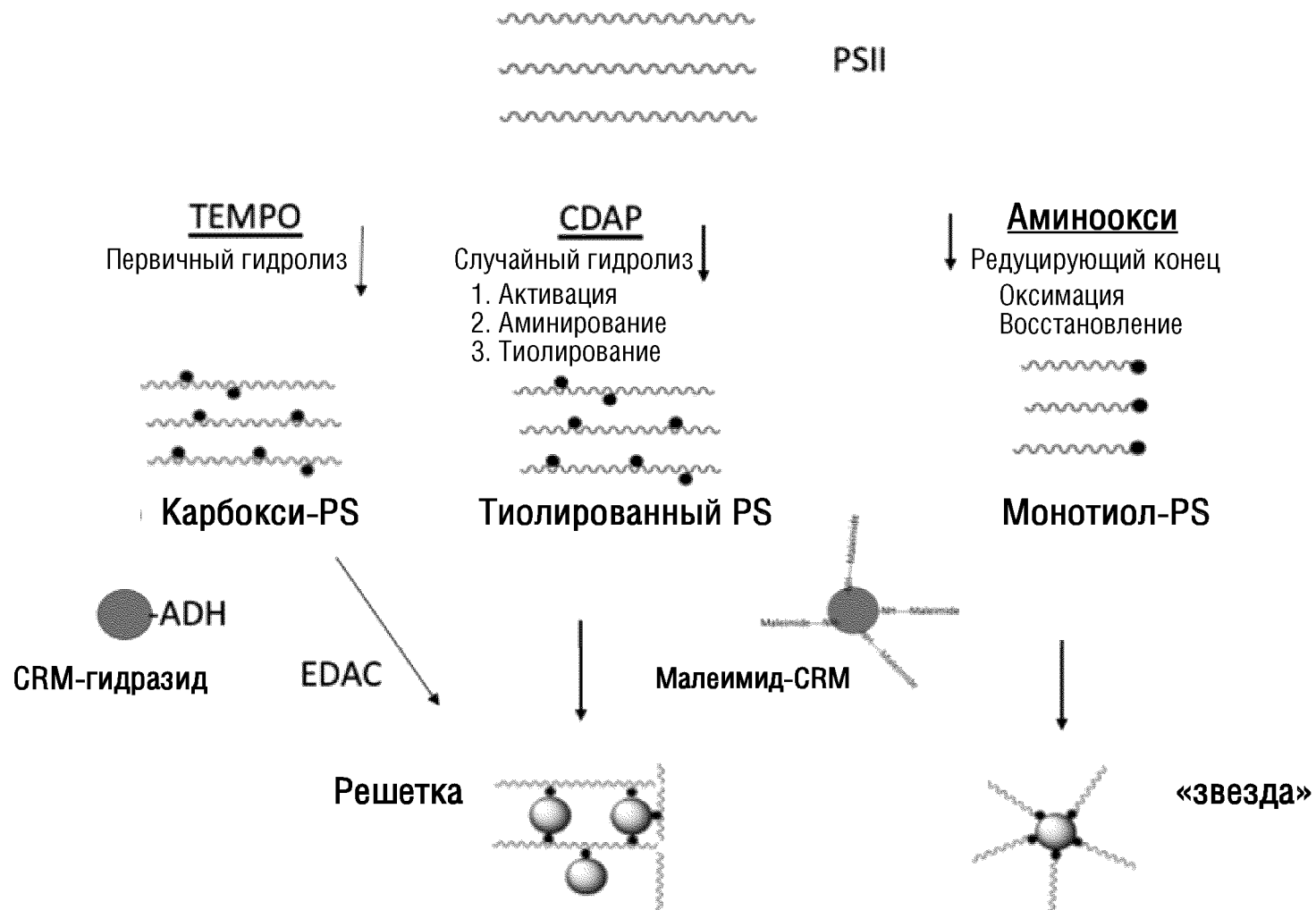
скв моменты радиуса (нм)

rp 3.4 ( $\pm 455.6\%$ )

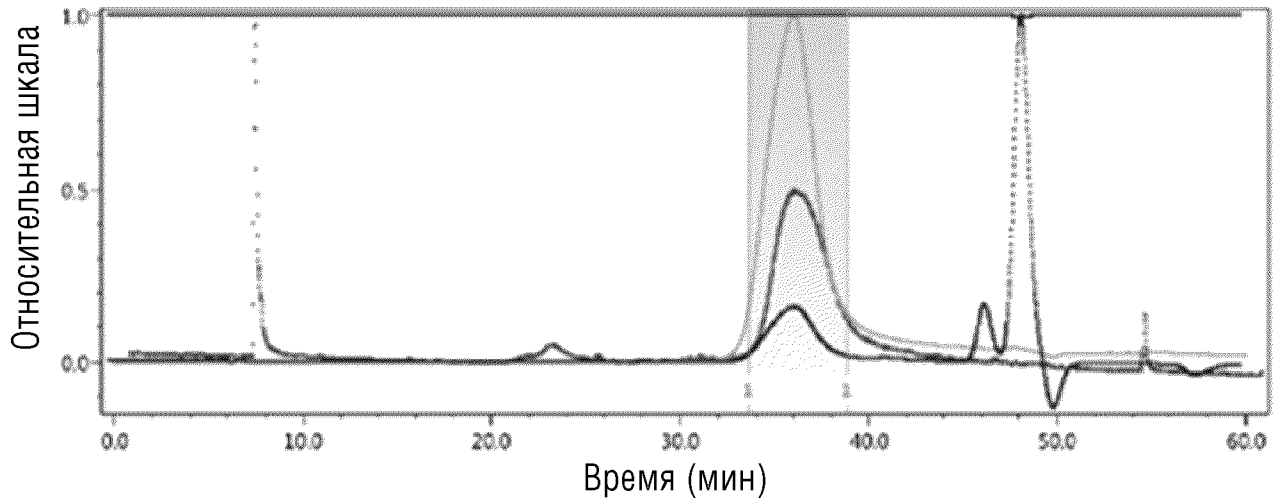
rw 4.1 ( $\pm 317.8\%$ )

rz 4.7 ( $\pm 243.6\%$ )

ФИГ.2



ФИГ.3



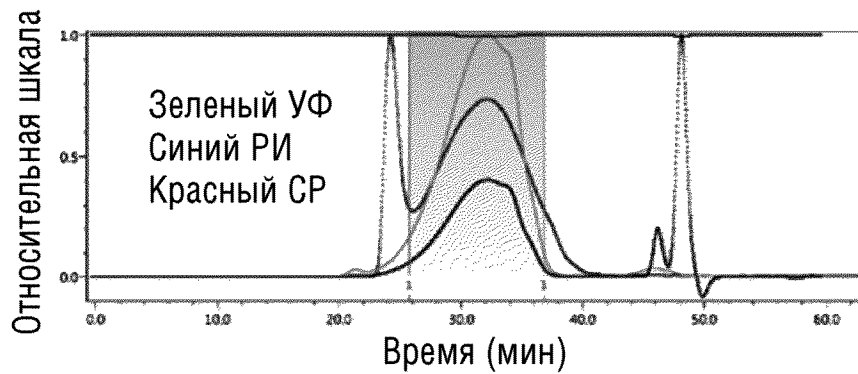
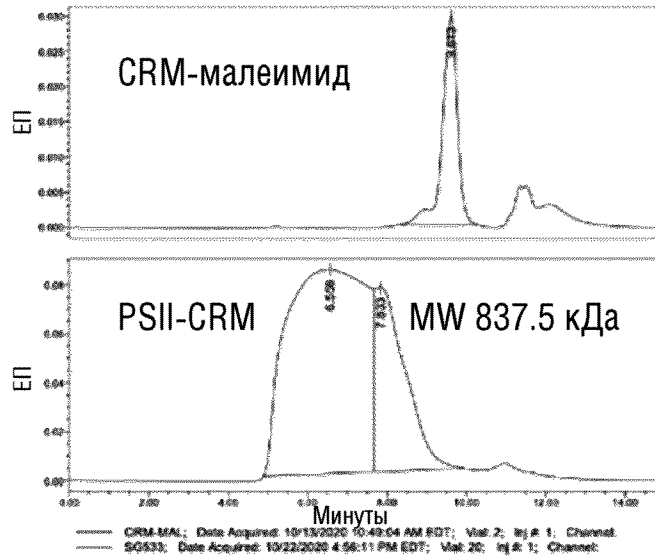
Метод	Белок	PSII
ЭХ-МУЛС	0.51 мг/мл	0.24 мг/мл
OD280	2.1 мг/мл	
Резорцин		1.2 мг/мл

MW 328.7 кДа ~0.5 мг PSII/мг CRM

#### Инжекция 100 мкл

Массы	Пик 1
Расчетная масса (мкг)	75.69
Масса белка (мкг)	$5.1174 \times 10^1$
Масса модификатора (мкг)	$2.4519 \times 10^1$
Молярные массовые моменты (г/моль)	
Mn	$2.733 \times 10^5$ ( $\pm 17.434\%$ )
Mw	$3.287 \times 10^5$ ( $\pm 23.359\%$ )
Полидисперсность	
Mw/Mn	1.202 ( $\pm 29.147\%$ )
скв моменты радиуса (нм)	
rZ	92.3 ( $\pm 11.6\%$ )
Молярные массовые моменты белка (г/моль)	
Mn (белок)	$1.823 \times 10^5$ ( $\pm 17.217\%$ )
Mw (белок)	$2.293 \times 10^5$ ( $\pm 24.104\%$ )

ФИГ.4



PSII	10 кДа
CRM	58.4 кДа
CRM-мал	61.6 кДа
Конъюгат	837.5 кДа

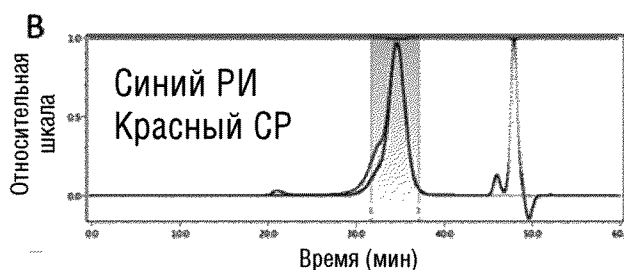
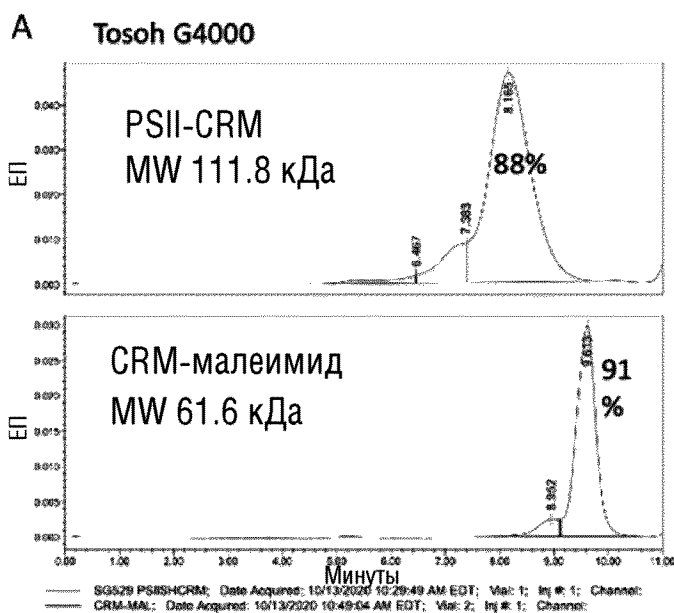
Метод	Белок	PSII
ЭХ-МУЛС	4.5 мг/мл	2.0 мг/мл
OD280	4.5 мг/мл	
Резорцин		1.5 мг/мл

Массы	Пик 1
Расчетная масса (мкг)	648.13
Масса белка (мкг)	$4.4806 \times 10^2$
Масса модификатора (мкг)	$2.0008 \times 10^2$
Молярные массовые моменты (г/моль)	
Mn	$7.932 \times 10^5$ ( $\pm 0.601\%$ )
Mw	$8.375 \times 10^5$ ( $\pm 0.666\%$ )
Полидисперсность	
Mw/Mn	1.056 ( $\pm 0.898\%$ )
скв моменты радиуса (нм)	
rZ	23.3 ( $\pm 4.4\%$ )
Молярные массовые моменты белка (г/моль)	
Mn (белок)	$5.461 \times 10^5$ ( $\pm 0.599\%$ )
Mw (белок)	$5.824 \times 10^5$ ( $\pm 0.672\%$ )



## ФИГ.5

## SG529 Связанный концами PSII-CRM

**С ЭХ-МУЛС анализ**

CRM 58.4 кДа

CRM-мал 61.6 кДа

PSII 10 кДа

Конъюгат MW 111.8 кДа **Химический анализ**

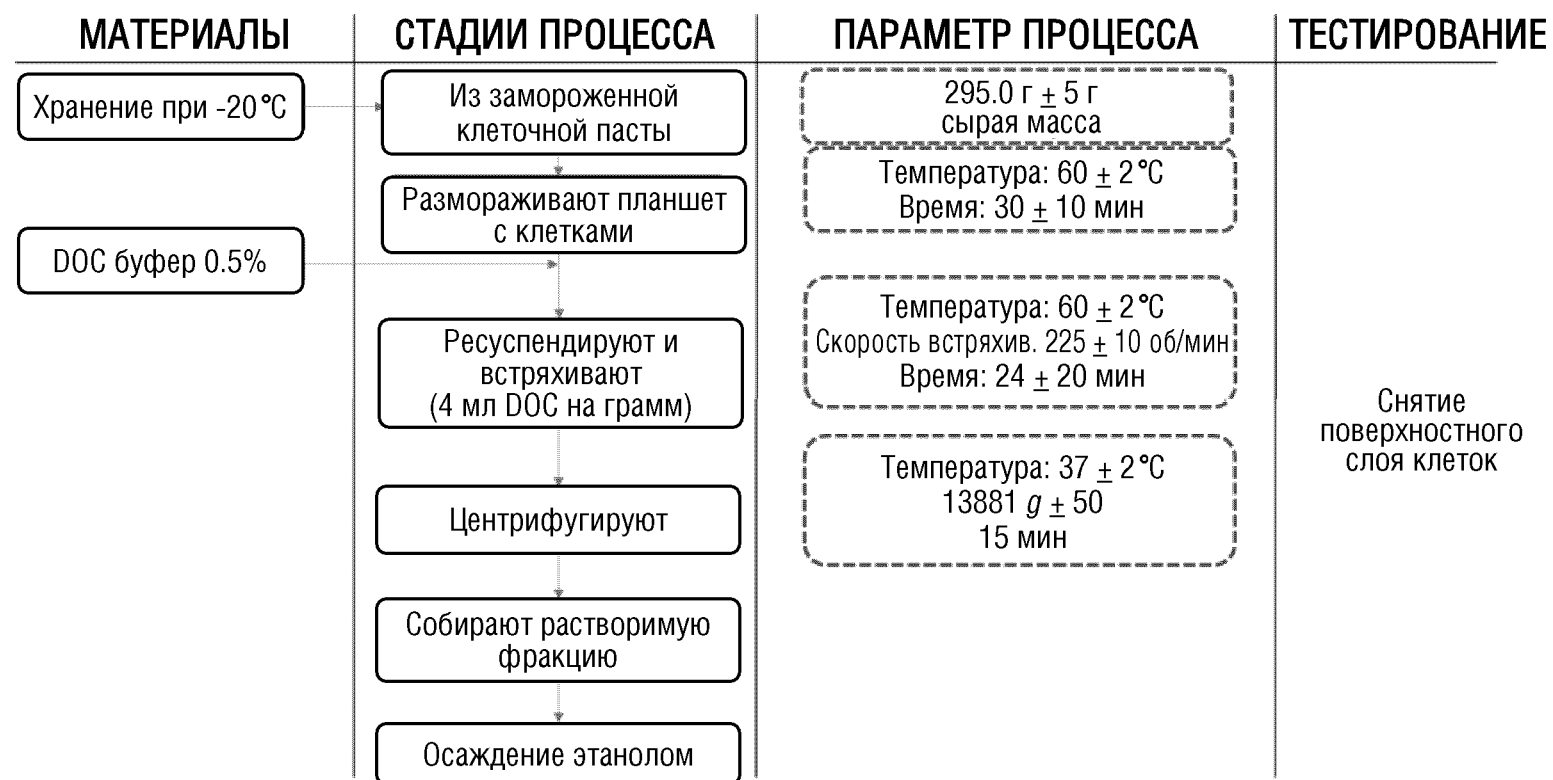
4.7 PSII/CRM-мал

2.8 PSII/CRM

Метод	Белок	PSII
ЭХ-МУЛС	2.1 мг/мл	1.67 мг/мл
OD280	1.9 мг/мл	
Резорцин		0.93 мг/мл

Массы	Пик 1
Расчетная масса (мкг)	378.43
Масса белка (мкг)	$2.1222 \times 10^2$
Масса модификатора (мкг)	$1.6621 \times 10^2$
Молярные массовые моменты (г/моль)	
Mn	$1.085 \times 10^5$ ( $\pm 0.674\%$ )
Mw	$1.118 \times 10^5$ ( $\pm 0.662\%$ )
Полидисперсность	
Mw/Mn	1.030 ( $\pm 0.944\%$ )
скв моменты радиуса (нм)	
rZ	n/a
Молярные массовые моменты белка (г/моль)	
Mn (белок)	$6.096 \times 10^4$ ( $\pm 0.676\%$ )
Mw (белок)	$6.250 \times 10^4$ ( $\pm 0.661\%$ )

ФИГ.6



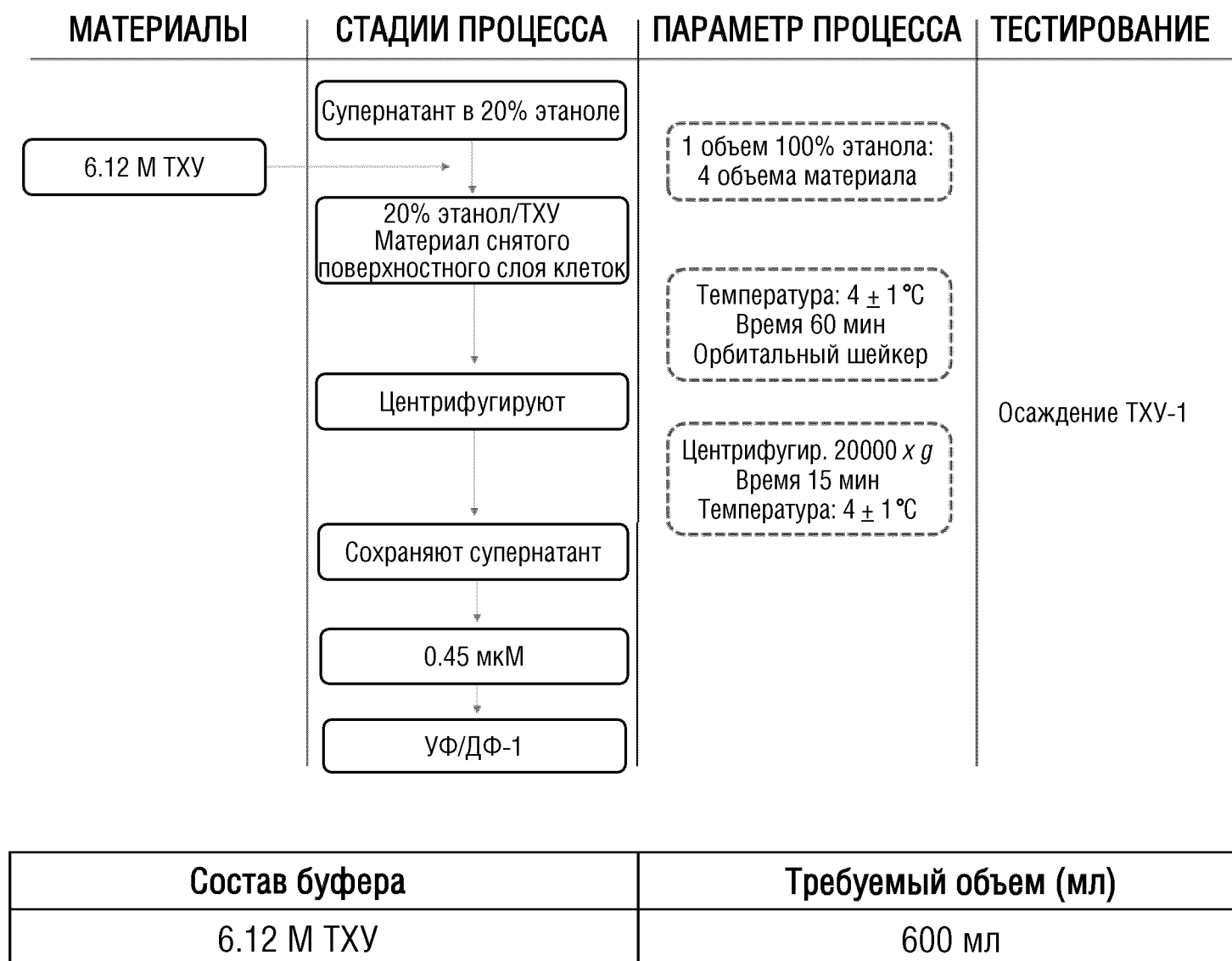
Состав буфера	Требуемый объем (мл)
0.5 DOC в 1x PBS	1500 мл

ФИГ.7

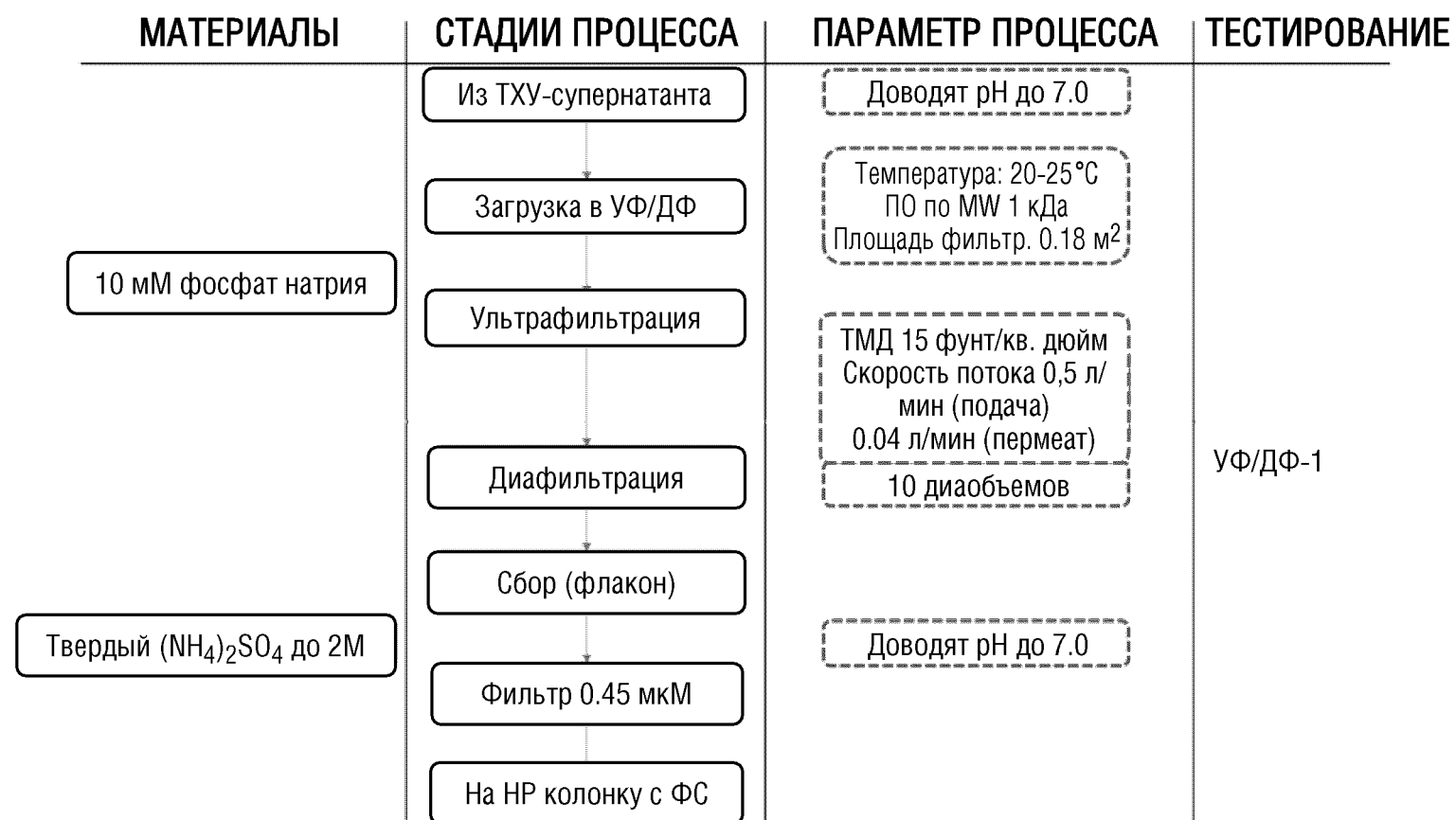
МАТЕРИАЛЫ	СТАДИИ ПРОЦЕССА	ПАРАМЕТР ПРОЦЕССА	ТЕСТИРОВАНИЕ
<p>Реагент спирт</p>	<p>Растворимая фракция после снятия поверхностного слоя клеток</p> <p>20% этанол Материал снятого поверхностного слоя клеток</p> <p>Центрифугируют</p> <p>Сохраняют супернатант</p> <p>Осаждение ТХУ-1</p>	<p>1 объем 100% этанола: 4 объема материала</p> <p>Температура: <math>4 \pm 1^\circ\text{C}</math> Время 60 мин Орбитальный шейкер</p> <p>Центрифугир. <math>17568 \times g</math> Время 15 мин Температура: <math>4 \pm 1^\circ\text{C}</math></p>	<p>Осаждение этанолом</p>

Состав буфера	Требуемый объем (мл)
100% этанол	400 мл

ФИГ.8



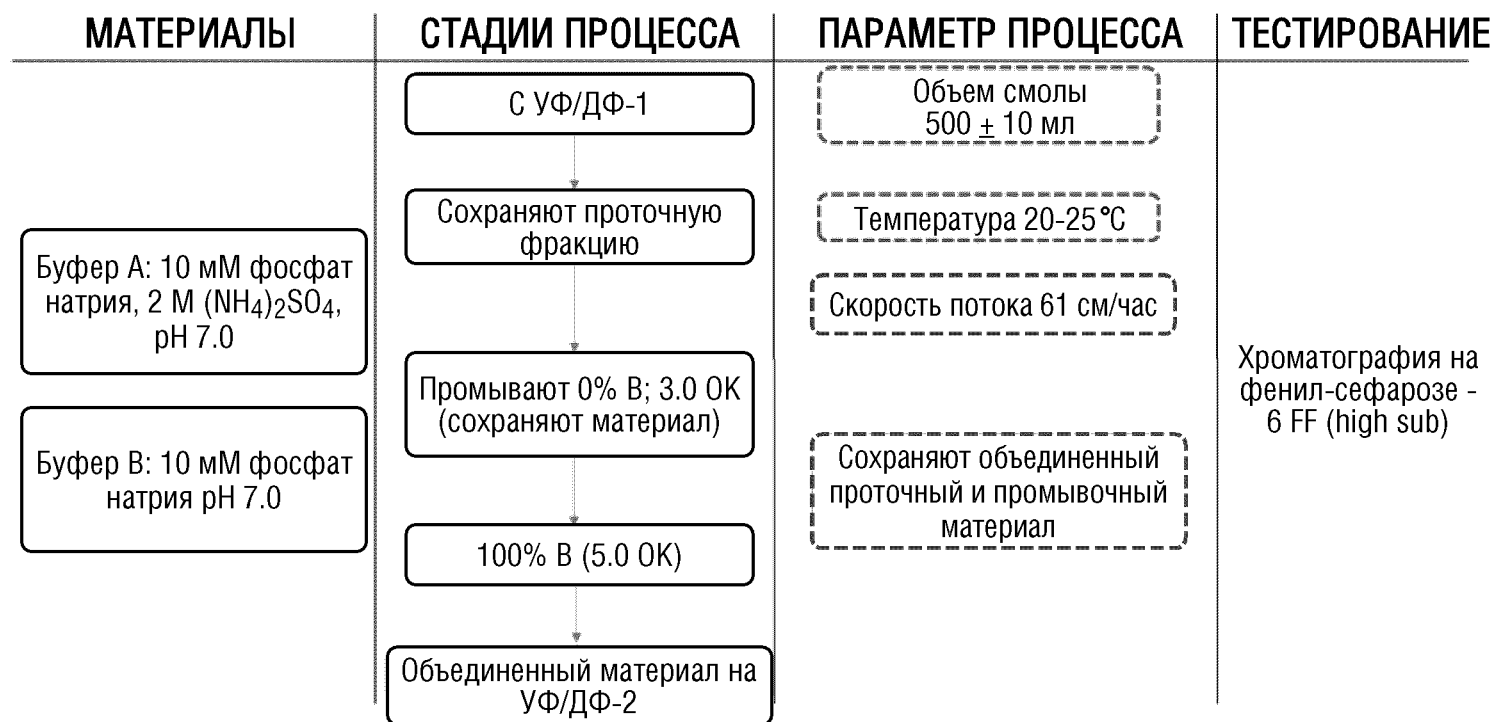
ФИГ.9



9/32

Состав буфера	Требуемый объем (мл)
10 мМ фосфат натрия	4 л
Твердый (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> до 2М	Подлежит определению

ФИГ.10



Состав буфера	Требуемый объем
Буфер А: 10 мМ фосфат натрия, 2 М (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , рН 7.0	8 л
Буфер В: 10 мМ фосфат натрия, рН 7.0	8 л

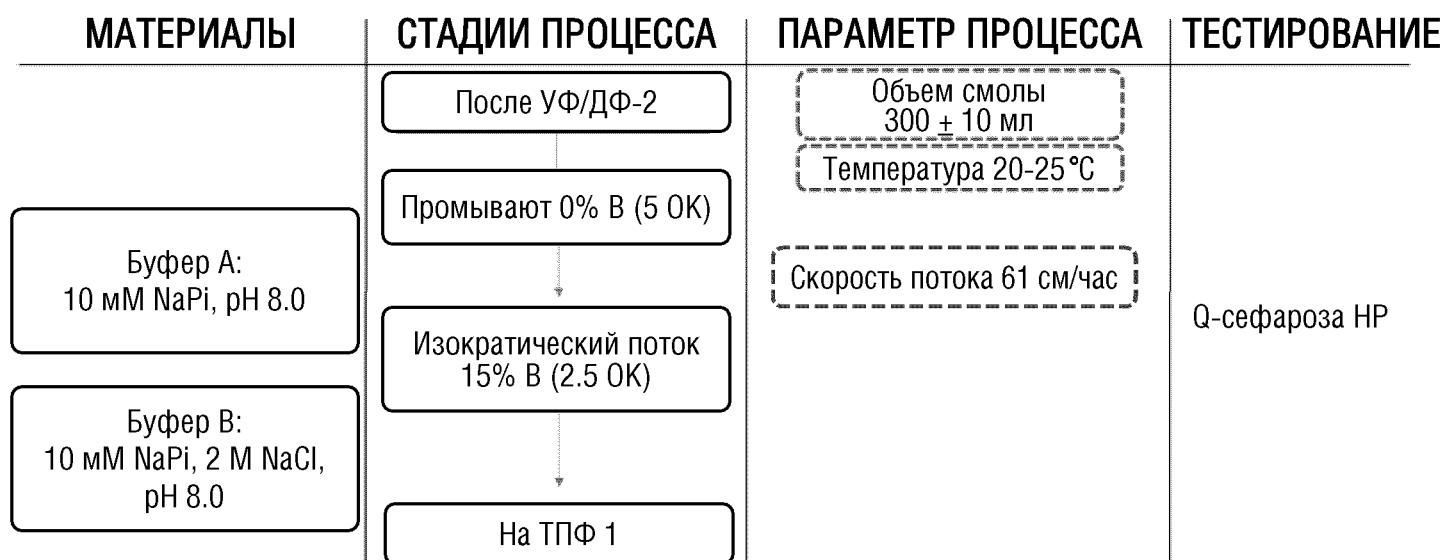
ФИГ.11

МАТЕРИАЛЫ	СТАДИИ ПРОЦЕССА	ПАРАМЕТР ПРОЦЕССА	ТЕСТИРОВАНИЕ
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;">10 мМ NaPi, pH 8.0</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">После стадии с фенол-сефарозой</div>	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;">Доводят pH до 8.0</div>	УФ/ДФ-2
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Загрузка в УФ/ДФ</div>	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;">Температура: 20-25°C ПО по MW 1 кДа Площадь фильтр. 0.18 м²</div>	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Ультрафильтрация</div>	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;">ТМД 15 фунт/кв. дюйм Скорость потока 0.5 л/мин (подача) 0.04 л/мин (пермеат)</div>	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Диафильтрация</div>	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;">10 диаобъемов</div>	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Сбор (флакон)</div>		
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">На HP колонку с Q-сефарозой</div>		

11/32

Состав буфера	Требуемый объем
10 мМ NaPi, pH 8.0	4 л

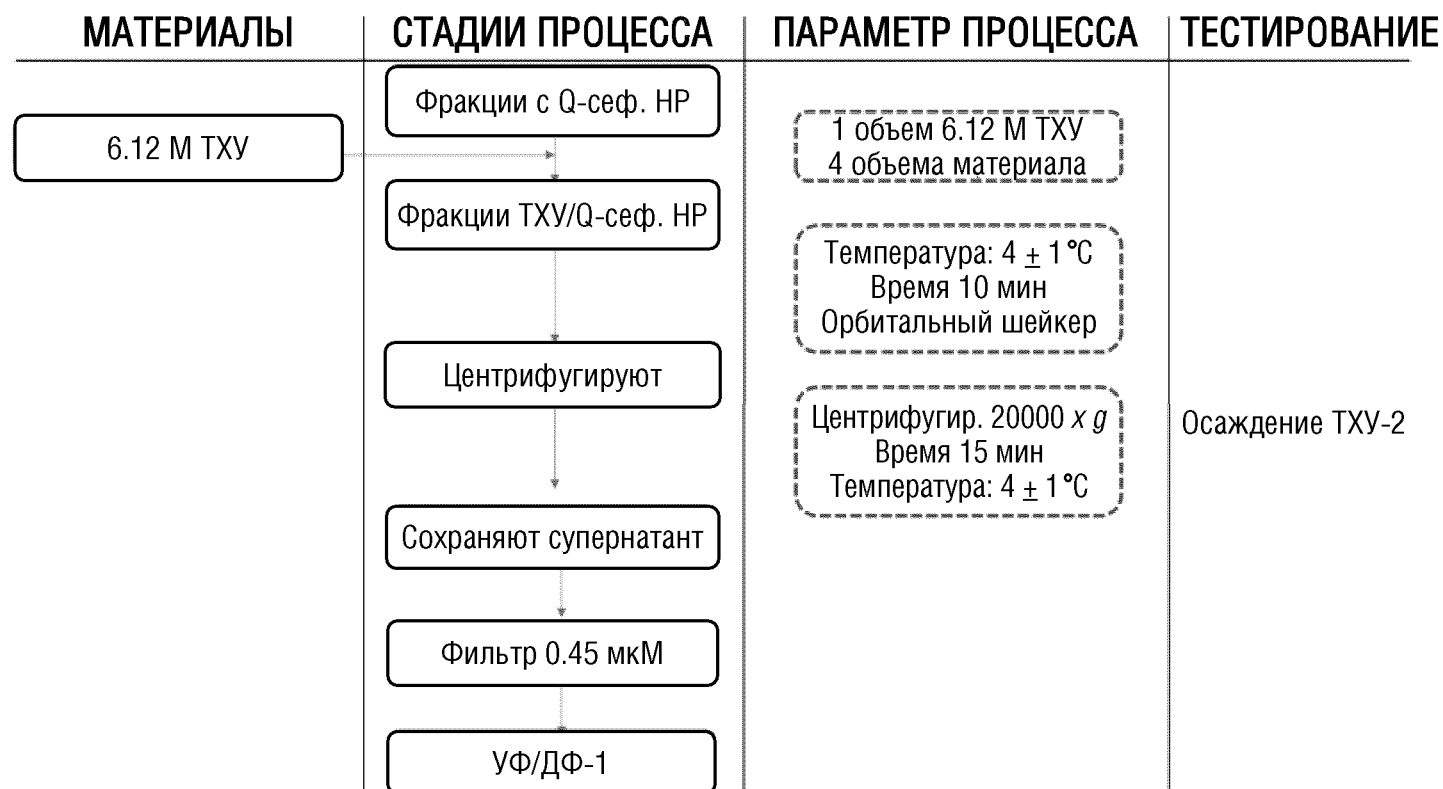
ФИГ.12



Состав буфера	Требуемый объем
Буфер А: 10 мМ NaPi, рН 8.0	8.0 л
Буфер В: 10 мМ NaPi, 1 М NaCl, рН 8.0	8.0 л

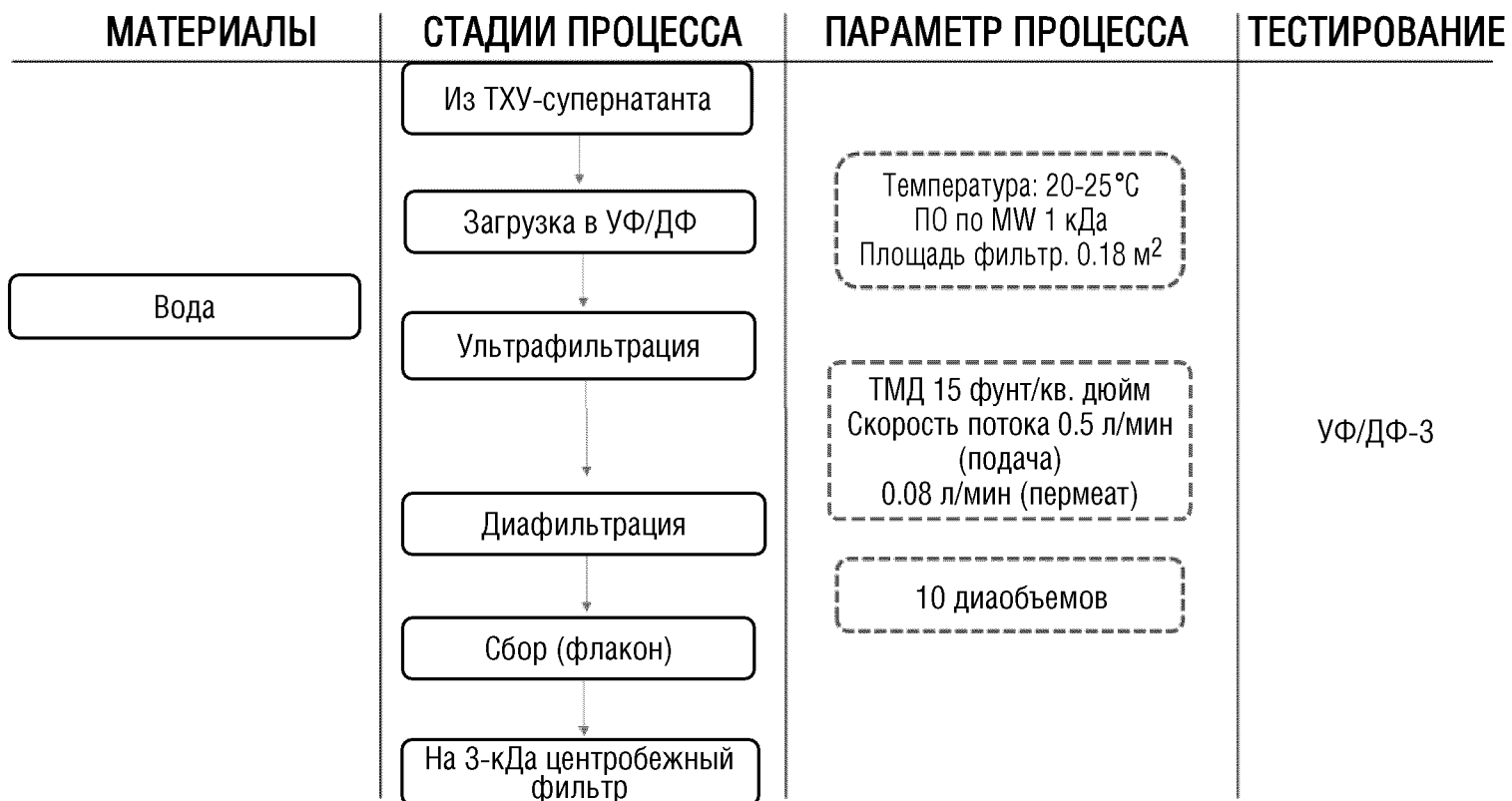


ФИГ.13



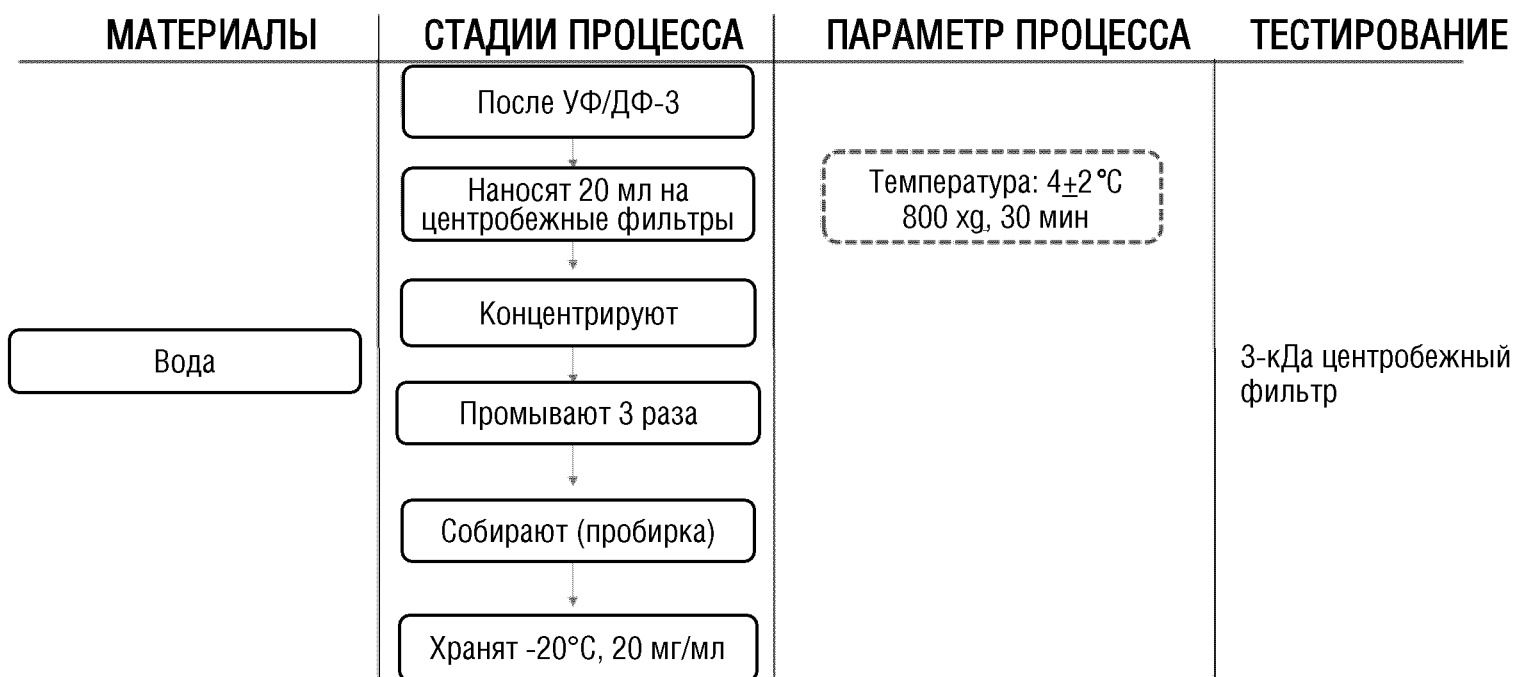
Состав буфера	Требуемый объем (мл)
6.12 М ТХУ	100 мл

ФИГ.14



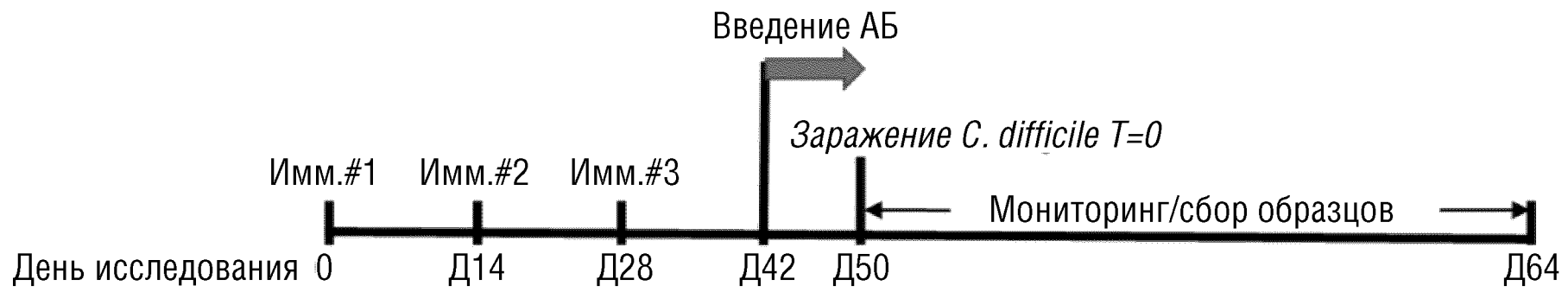
Состав буфера	Требуемый объем
Вода	4 л

ФИГ.15



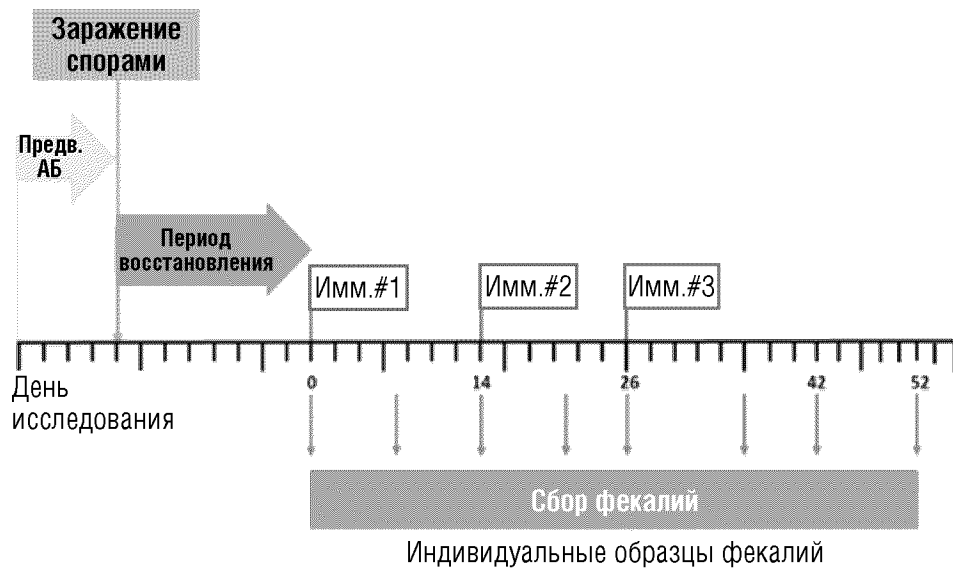
Состав буфера	Требуемый объем (мл)
10 мМ фосфат натрия, рН 6.8	100 мл

ФИГ.16

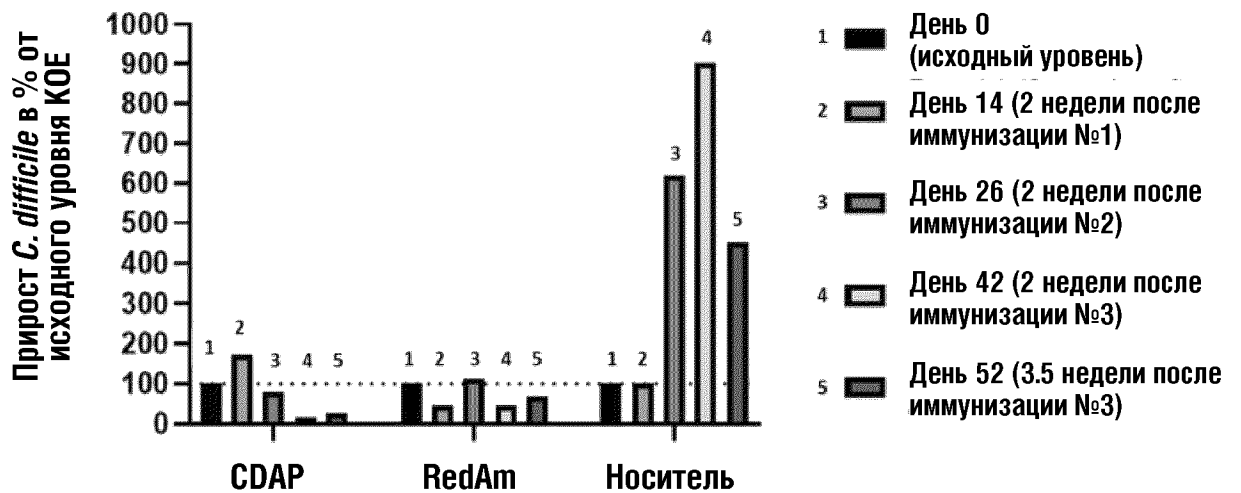


ФИГ.17

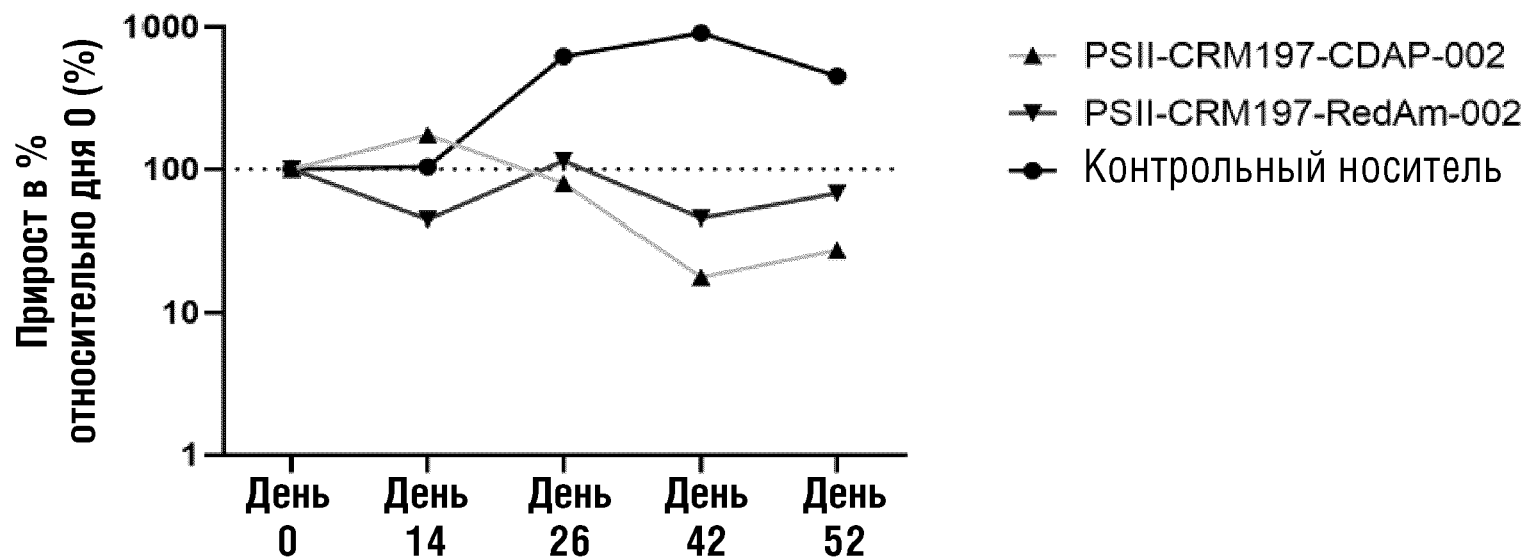
А



В



**Прирост *C. difficile* в % от исходного уровня КОЕ в день 0**



День 0: 16 дней после заражения спорами *C. diff* (n=5)

День 14: 2 недели после 1-й иммунизации (n=5)

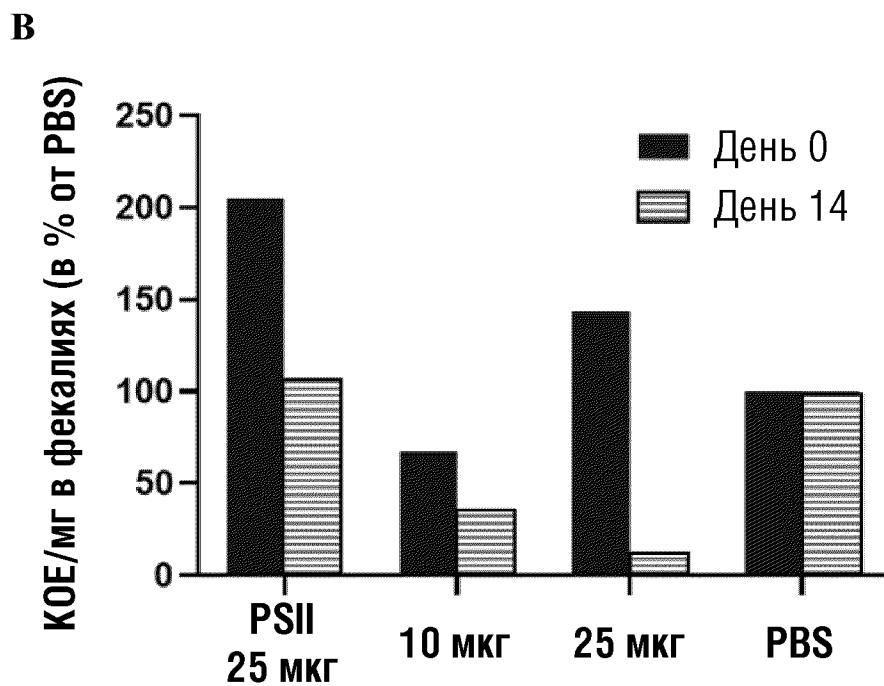
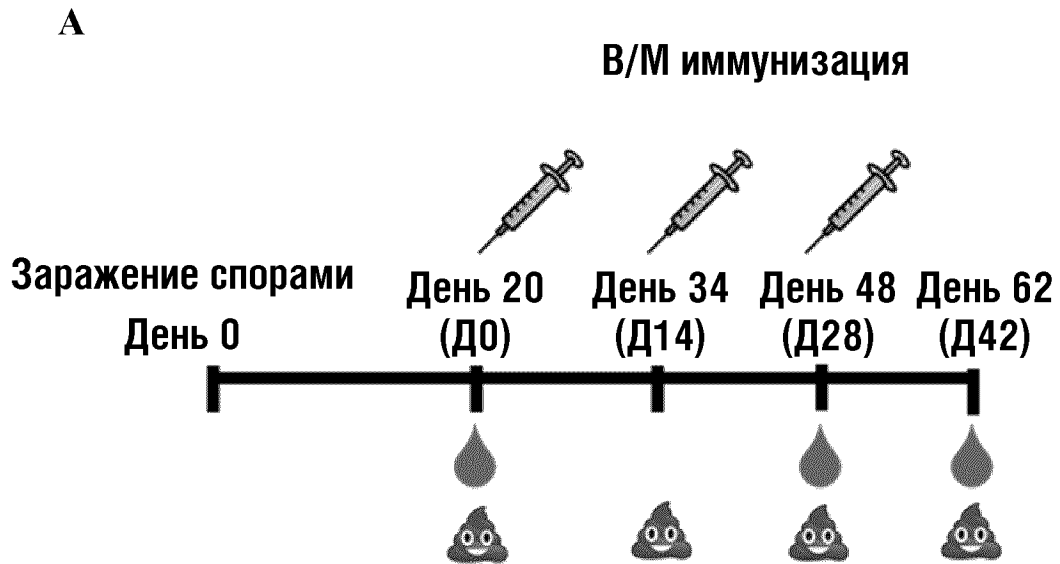
День 26: 2 недели после 2-й иммунизации (n=5)

День 42: 2 недели после 3-й иммунизации (n=5)

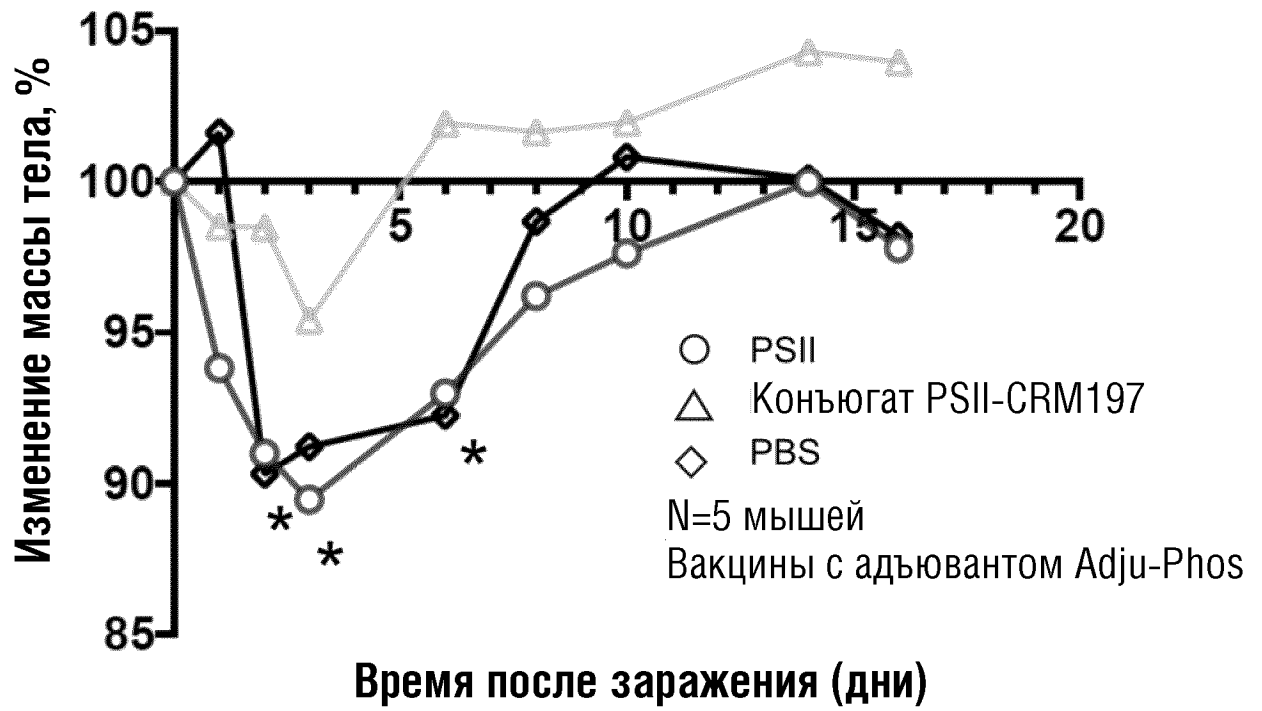
День 52: 3.5 недели после 3-й иммунизации (n=5)

\*\*Продолжается сбор данных по состоянию на 02 февраля 2021 г., на графике отображены средние геометрические значения

ФИГ.19



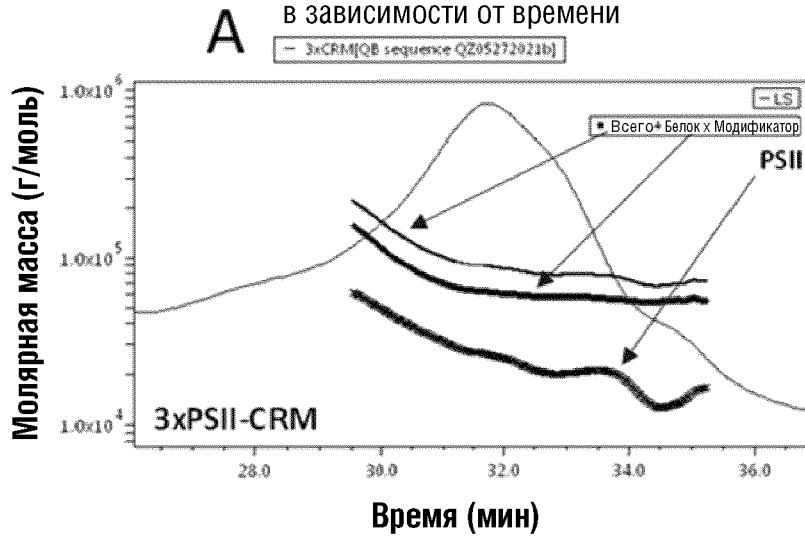
ФИГ.20



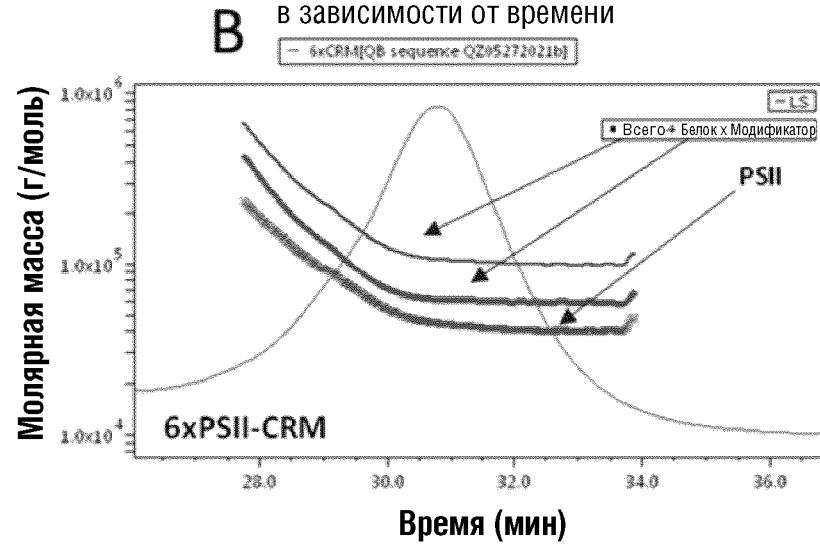


# ФИГ.21

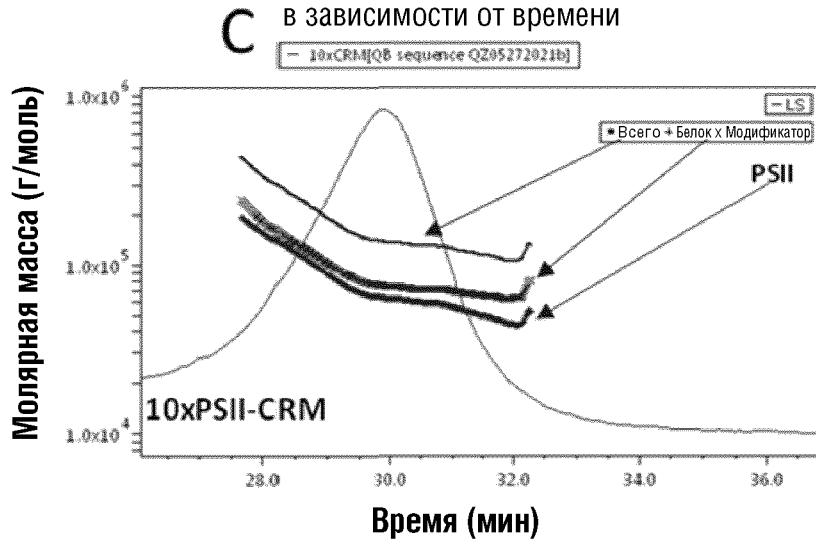
Данные белкового конъюгата в зависимости от времени



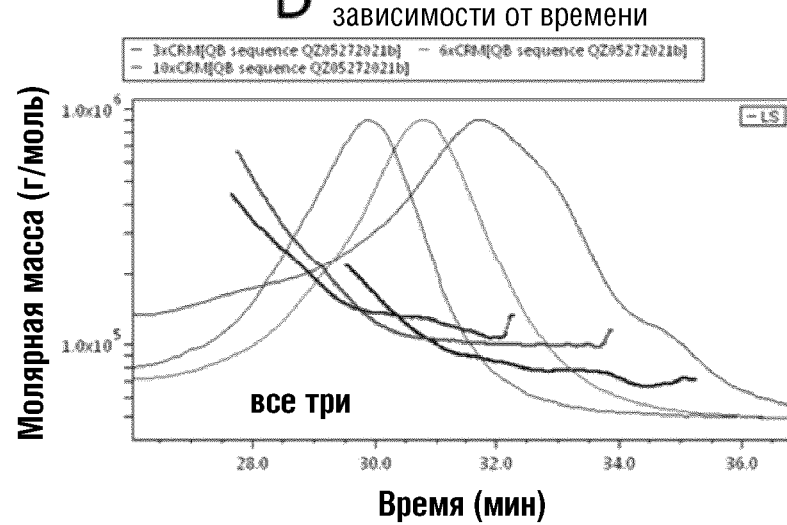
Данные белкового конъюгата в зависимости от времени



Данные белкового конъюгата в зависимости от времени

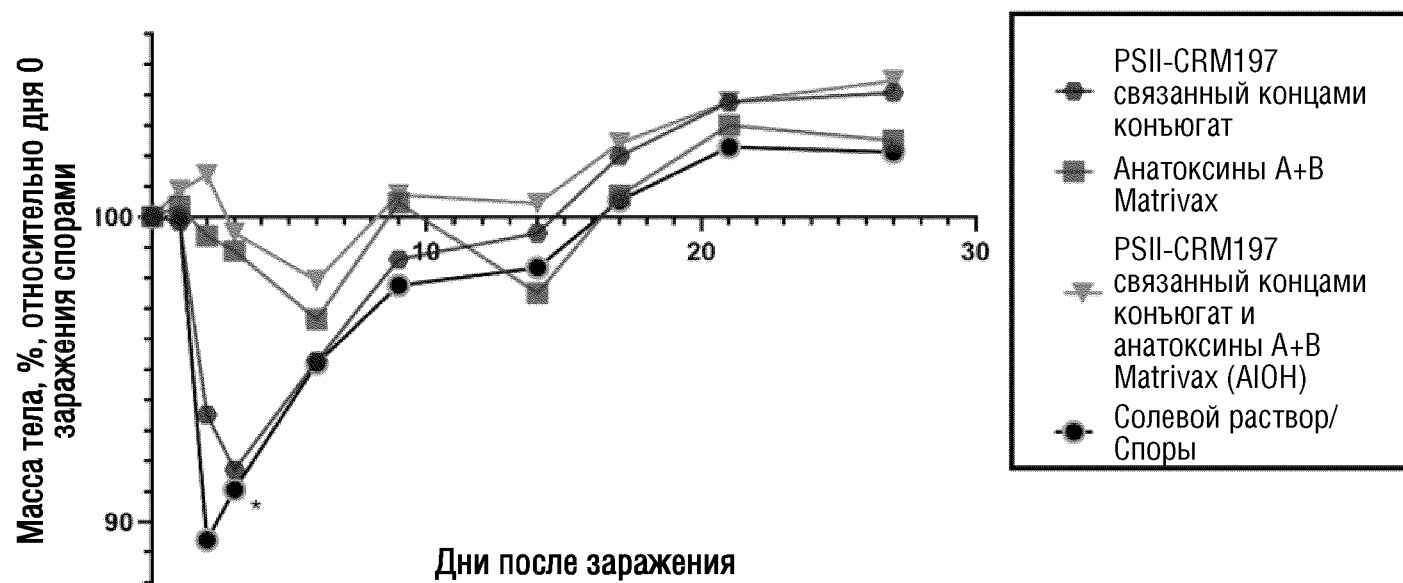


Молярная масса в зависимости от времени



ФИГ.22

М258 Снижение массы тела после ИКД у мышей

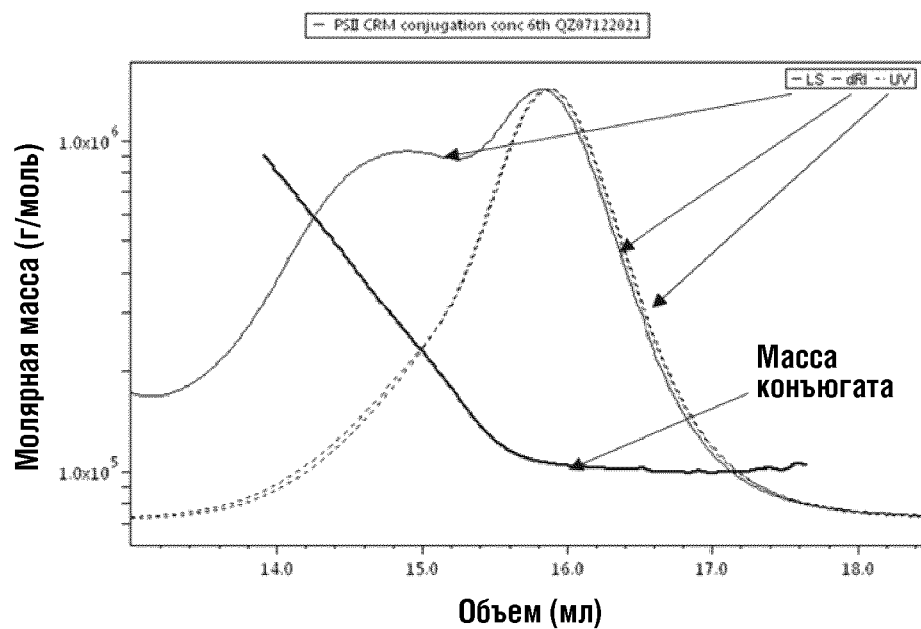


\* Две мыши из группы Солевой раствор/Споры были найдены мертвыми в день 3

# ФИГ.23

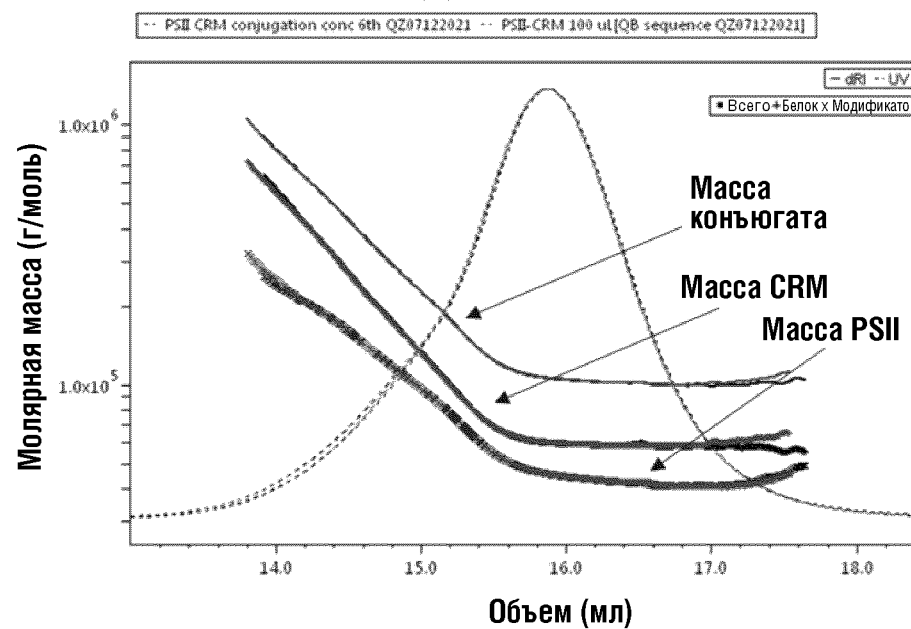
## А.

### Молярная масса в зависимости от времени



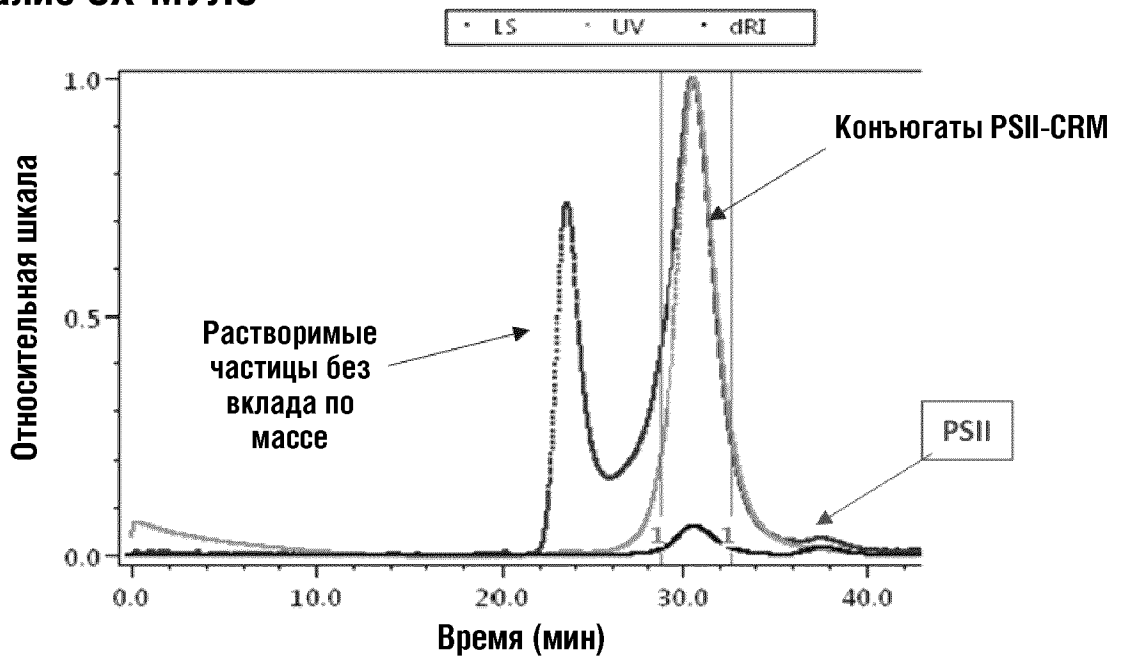
## В.

### Данные белкового конъюгата в зависимости от времени



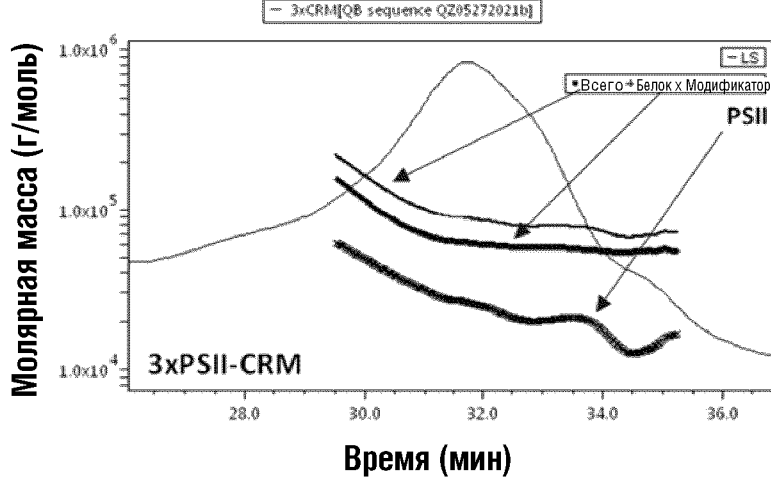
ФИГ.24

## Анализ ЭХ-МУЛС

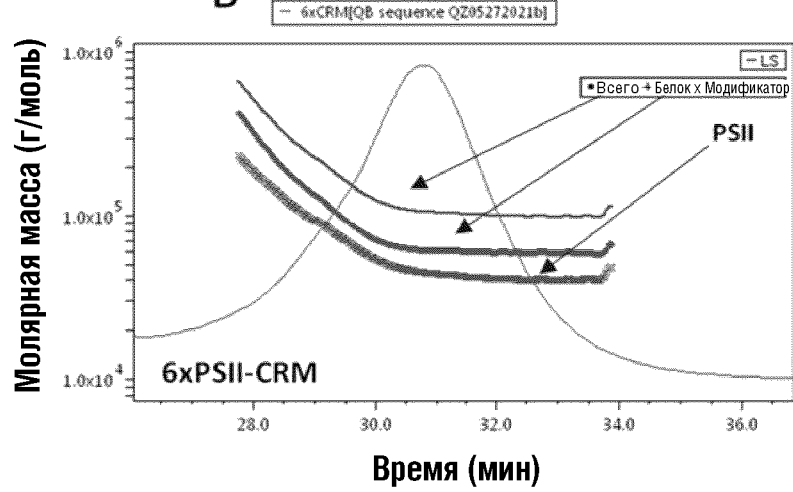


# ФИГ.25

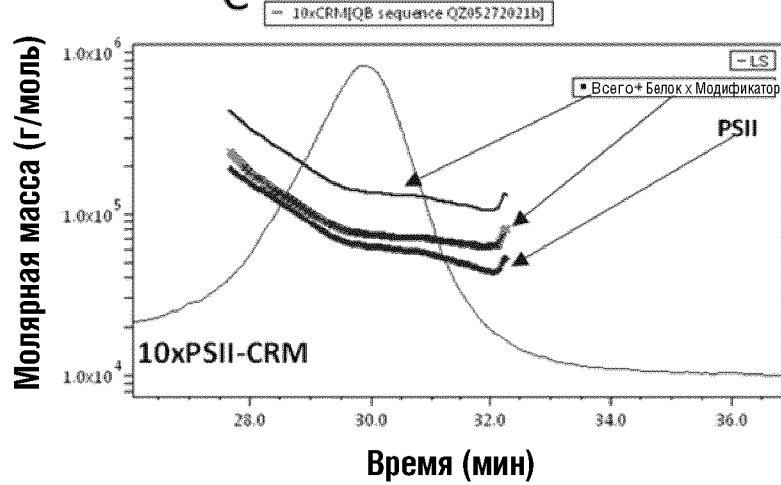
**А** Данные белкового конъюгата в зависимости от времени



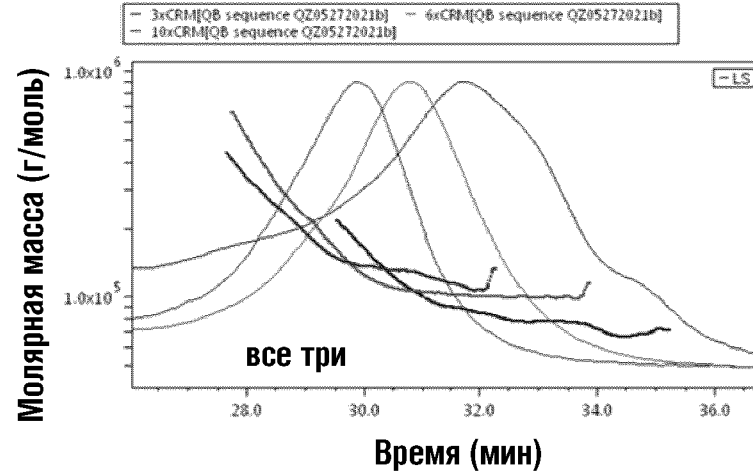
**В** Данные белкового конъюгата в зависимости от времени



**С** Данные белкового конъюгата в зависимости от времени

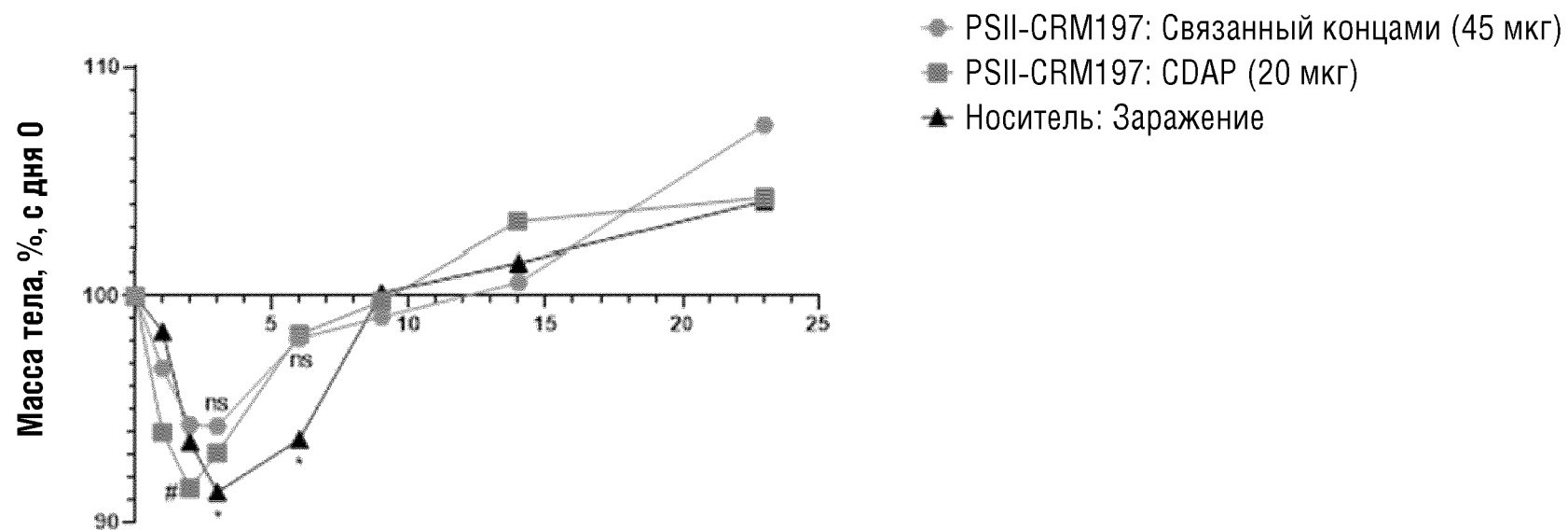


**Д** Молярная масса в зависимости от времени



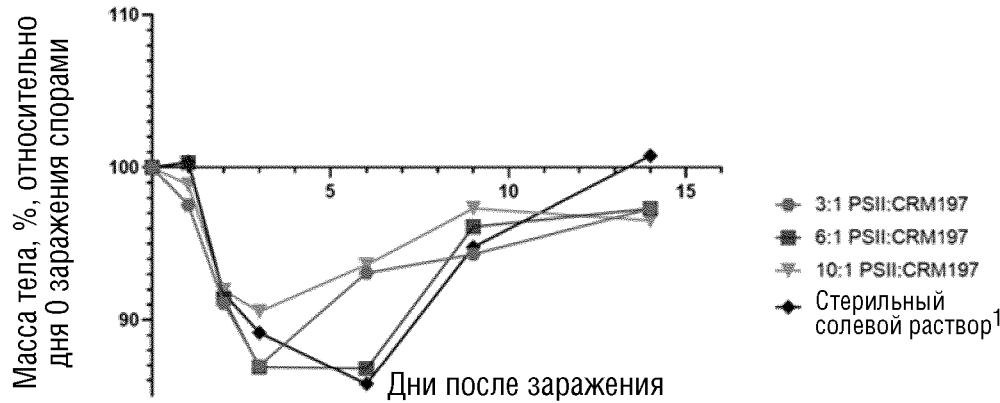
ФИГ.26

**Среднее геометрическое снижение массы тела после профилактической иммунизации и заражения спорами**

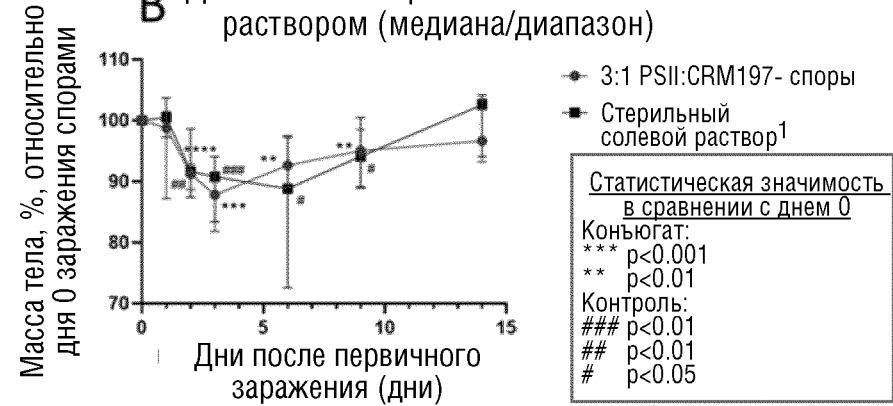


# ФИГ.27

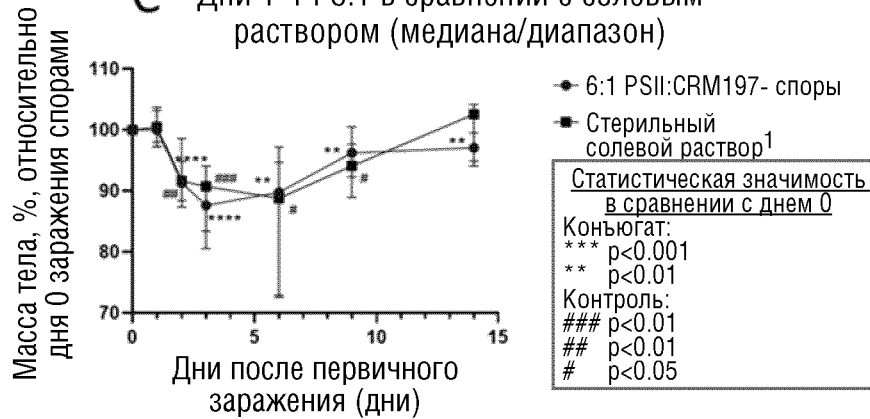
**А** Снижение массы тела после ИКД у мышей (СГТ)



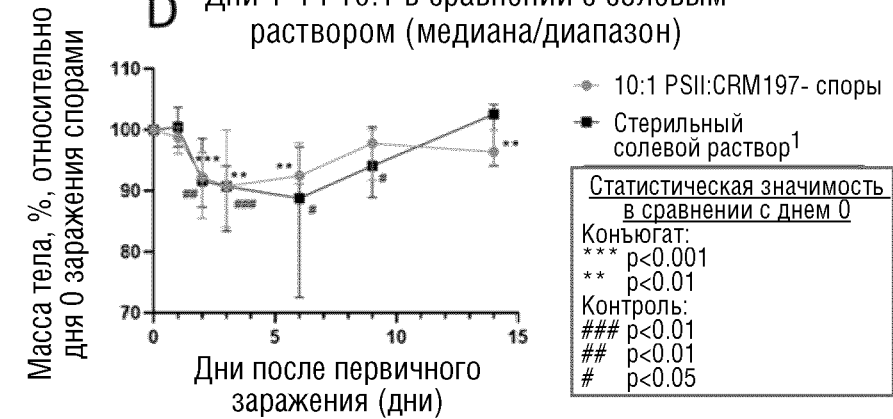
**В** Дни 1-14 3:1 в сравнении с соевым раствором (медиана/диапазон)



**С** Дни 1-14 6:1 в сравнении с соевым раствором (медиана/диапазон)

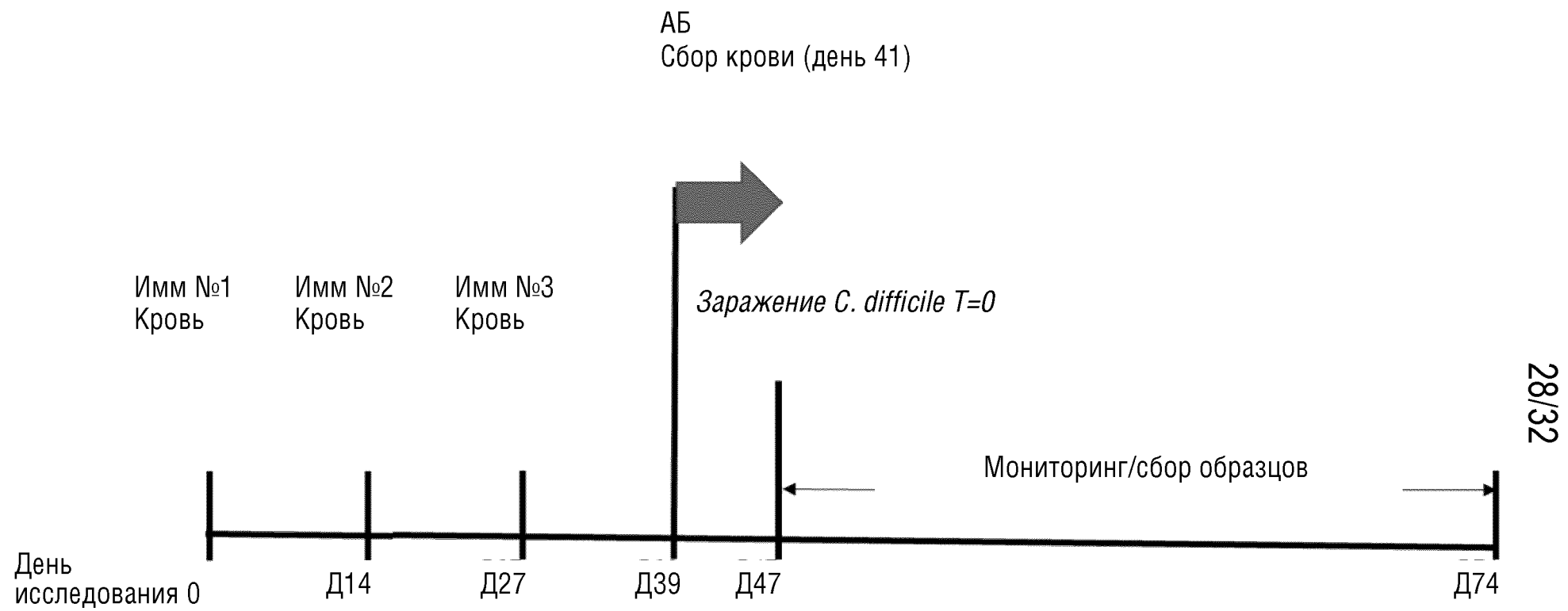


**Д** Дни 1-14 10:1 в сравнении с соевым раствором (медиана/диапазон)



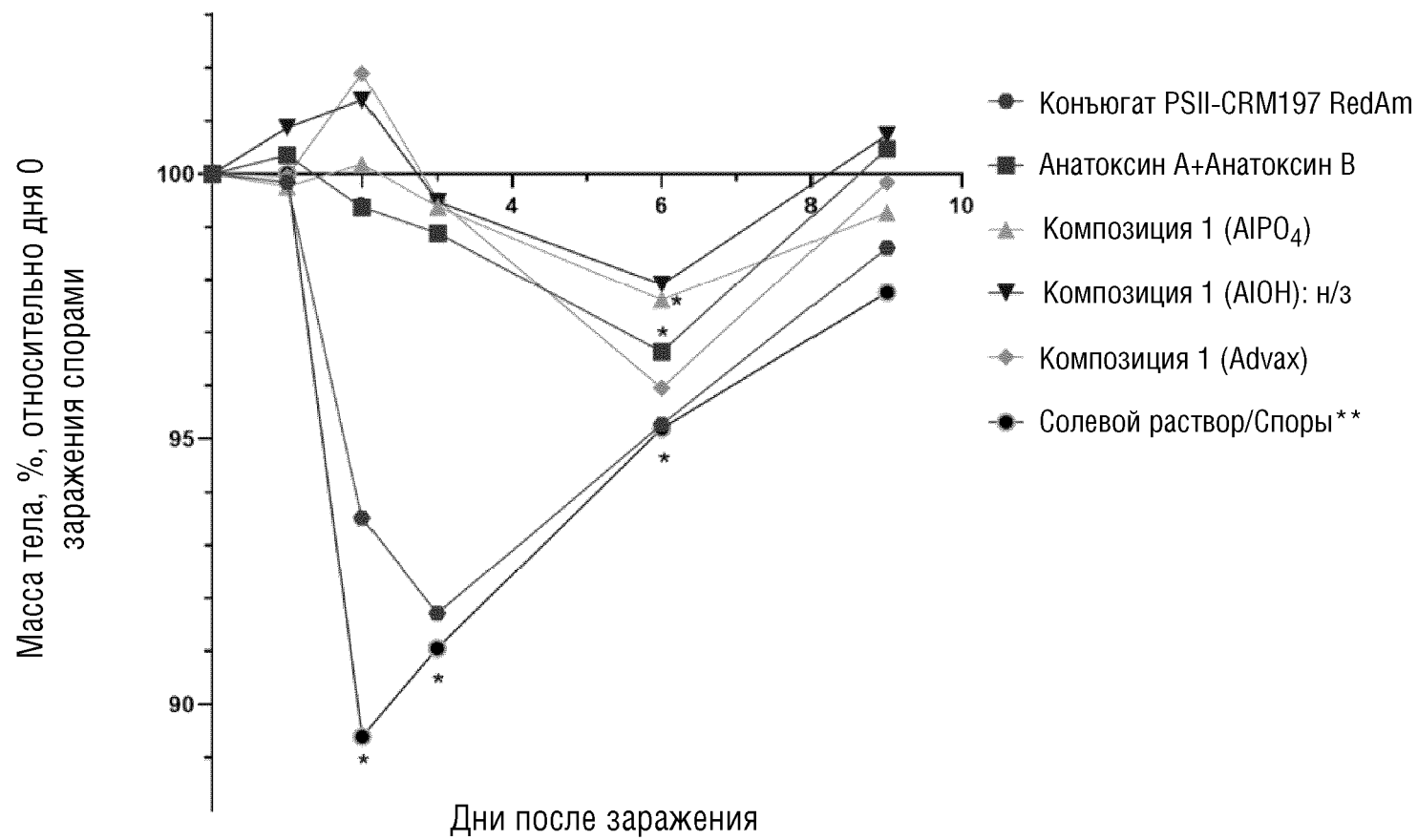
ФИГ.28

АБ  
Сбор крови (день 41)

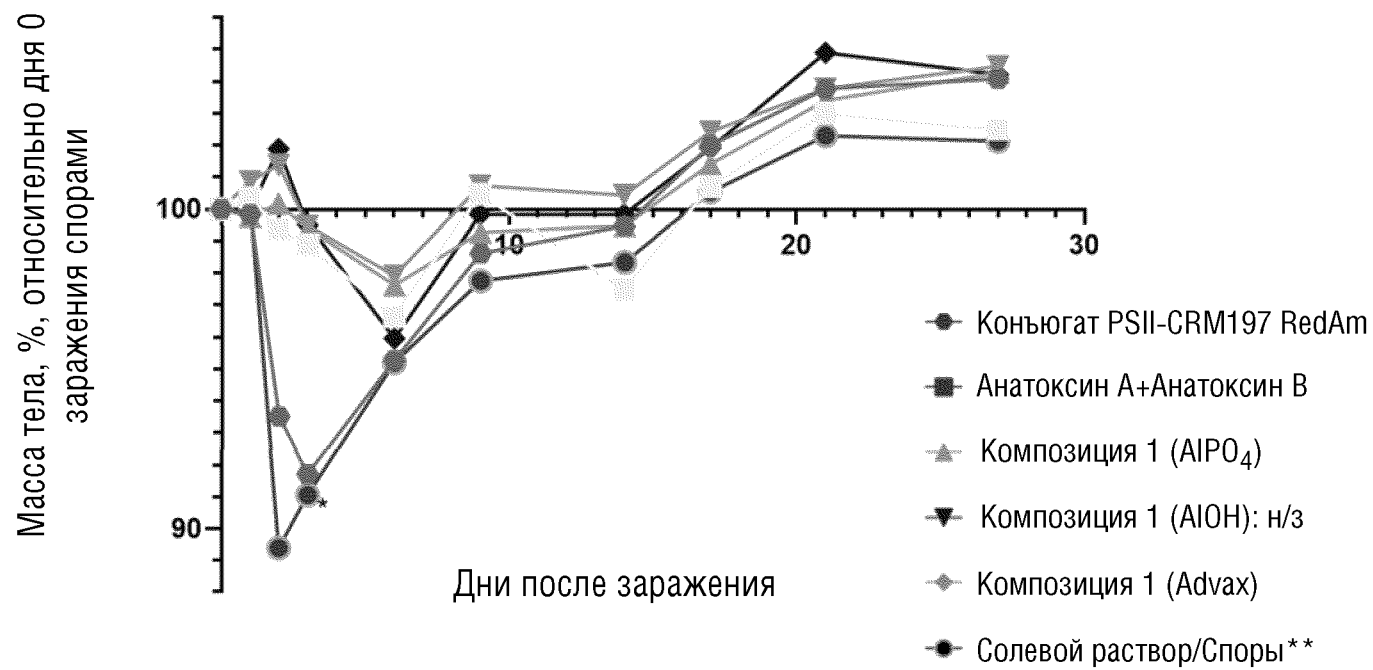




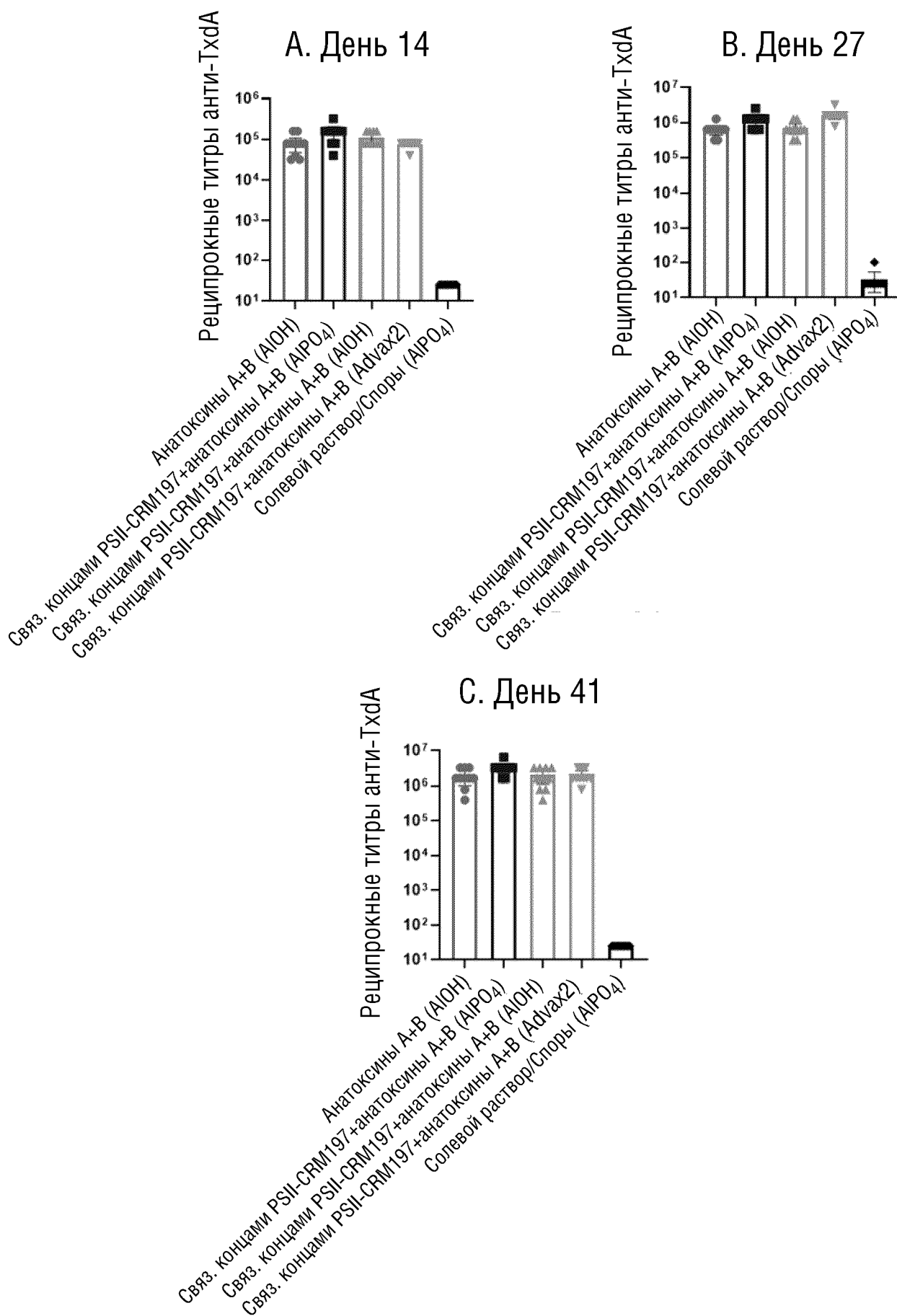
ФИГ.29



ФИГ.30



## ФИГ.31А-31С



## ФИГ.31D

