



СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИММУНОТЕРАПИИ ИНФЕКЦИИ *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*

К.Э. Попруга, В.В. Макаров

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья, Москва, Россия

Modern approaches to the immunotherapy of *Clostridioides difficile*

K.E. Popruga, V.V. Makarov

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia

Резюме

Clostridioides difficile является основной причиной диареи и псевдомембранозного колита, ассоциированных с терапией антибиотиками. Гипервирулентные штаммы *C. difficile*, такие как риботип 027, характеризуются высоким уровнем смертности. Рецидивирующая инфекция *C. difficile* крайне трудно поддается лечению. Симптомы заболевания провоцируют 2 токсина, TcdA и TcdB. Эти токсины являются мишенями для терапевтических антител. Одобренное для профилактики рецидивирующей инфекции *C. difficile* моноклональное антитело безлотоксумаб (Zinplava ©, Merck & Co. Inc., США), специфичное к TcdB, обладает определенной эффективностью в отношении ограниченного набора штаммов *C. difficile*. Обладая меньшей по сравнению с моноклональными антителами себестоимостью, высокой аффинностью к антигену и уникальными структурно-функциональными свойствами, наноантитела являются перспективной стратегией иммунотерапии заболеваний, связанных с *C. difficile*.

Ключевые слова: *Clostridioides difficile*, TcdA, TcdB, иммунотерапия, моноклональные антитела, безлотоксумаб, наноантитела.

Abstract

Clostridioides difficile is a leading cause of diarrhea and pseudomembranous colitis associated with antibiotic therapy. Hypervirulent strains of *C. difficile*, such as ribotype 027, have high mortality rates. Recurrent *C. difficile* infection is extremely difficult to treat. Symptoms of the disease are caused by two toxins, TcdA and TcdB. These toxins are targets for therapeutic antibodies. The TcdB-specific monoclonal antibody bezlotoxumab (Zinplava ©, Merck & Co. Inc., USA), approved for the prevention of recurrent *C. difficile* infection, has some effectiveness against a limited set of *C. difficile* strains. Having a lower cost compared to monoclonal antibodies, high affinity for the antigen, and unique structural and functional properties, nanoantibodies are a promising strategy for the immunotherapy of diseases associated with *C. difficile*.

Key words: *Clostridioides difficile*, TcdA, TcdB, immunotherapy, monoclonal antibodies, bezlotoxumab, nanobodies.

Токсигенные штаммы *Clostridioides difficile* (ранее — *Clostridium difficile* или *C. difficile*) являются ведущей причиной внутрибольничных антибиотик-ассоциированных колита и диареи во всем мире [1]. Энтероколит, вызванный токсигенными штаммами *C. difficile*, часто принимает рецидивирующую форму и характеризуется высокой летальностью. Доля летальных исходов, ассоциированных с инфекцией *C. difficile*, среди зарегистрированных случаев составляет 6—30% [2].

C. difficile — грамположительная анаэробная облигатная спорообразующая бактерия. Передача спор *C. difficile* осуществляется фекально-оральным и контактно-бытовым путями. Приблизительно 5% взрослых и 15—70% младенцев бессимптомно колонизированы *C. difficile* [3]. Клинические проявления инфекции *C. difficile* могут варьировать от бессимптомного носительства или легкой само-

купирующейся диареи до псевдомембранозного колита и опасного для жизни фульминантного колита. Фульминантный колит часто влечет за собой токсический мегаколон, при котором могут развиться перфорация стенки толстой кишки, сепсис и полиорганная недостаточность [4]. Центральную роль в развитии таких патологических явлений в кишечнике при инфекции *C. difficile* играют вырабатываемые этой бактерией токсины — А и В.

На сегодняшний день существует потребность в эффективных противотоксинных лекарственных препаратах, направленных на устранение симптомов инфекции *C. difficile*. К таким препаратам относятся терапевтические антитела, специфичные к токсинам *C. difficile*.

В данном обзоре освещены особенности патогенеза инфекции *C. difficile* и иммунотерапевтические стратегии ее лечения.

В последние годы наблюдается увеличение глобального бремени инфекции *C. difficile* [5]. С 2003 г. отмечается резкий рост числа случаев, рецидивов и летальных исходов вследствие инфекции *C. difficile*, что обусловлено возникновением в это время гипервирулентного антибиотикорезистентного штамма риботипа 027 (BI/NAP1/027) [6]. Стоит отметить, что на сегодняшний день не зарегистрировано ни одного случая инфицирования штамма NAP1/BI/027 *C. difficile* в России. Первое в России крупное типирование *C. difficile* не выявило высоковирулентных патогенов риботипа 027 [12].

C. difficile является причиной 15% случаев всех нозокомиальных инфекций в США [7]. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США, количество ежегодных случаев нозокомиальной инфекции *C. difficile* приближается к 500 000, количество смертей в год составляет 15 000 – 29 000 [8]. При этом частота инфицирования *C. difficile* в США увеличилась с 52,88 на 100 000 человек в 2012 г. до 65,93 на 100 000 человек в 2017 г., а избыточные ежегодные расходы на стационарную неотложную помощь пациентам с инфекцией *C. difficile* превышают 4,8 млрд долларов США [9].

Подобная тенденция к увеличению частоты инфицирования *C. difficile* наблюдается и в других странах, включая Россию. Несмотря на то, что в России пока не ведется централизованный учет случаев данной инфекции, периодически появляются публикации, посвященные эпидемиологическому состоянию *C. difficile* в различных медицинских учреждениях. Так, по данным исследования Филь Т.С., в 2017 г. у 6,5% пациентов Городской больницы № 26 г. Санкт-Петербурга, получавших антибактериальную терапию, наблюдалась диарея, при этом более чем в 50% случаев возбудителем была бактерия *C. difficile* [10].

В другом, более крупном исследовании, охватившем 12 стационарных медицинских учреждений, было показано, что в среднем клостридиальная инфекция развивается у 26,2% пациентов хирургических отделений, у 17,8% пациентов терапевтических отделений и у 17,7% пациентов реанимационных отделений. Доля пациентов с инфекцией *C. difficile* в различных отделениях стационаров, по данным авторов, варьирует от 0 до 44,3% [11]. Это говорит о том, что эпидемиология клостридиальной инфекции в нашей стране на сегодняшний день имеет мозаичный характер, однако проблема так же, как и в других странах, является актуальной.

Прием курса антибиотиков в профилактических и/или в терапевтических целях является основным фактором риска развития инфекции *C. difficile* [12]. Нормальная микробиота кишечника создает неблагоприятные условия для ко-

лонизации и роста *C. difficile* [13]. Антимикробная терапия нарушает видовой состав кишечной микробиоты, что изменяет поддерживаемый ею гомеостаз кишечника и снижает резистентность к *C. difficile* [14]. Практически все антибиотики способны спровоцировать инфекцию *C. difficile*, однако применение клиндамицина, пенициллинов и цефалоспоринов ассоциировано с наибольшим риском [15]. Основным методом лечения как первичной, так и рецидивирующей инфекции *C. difficile* является антибактериальная терапия метронидазолом и/или ванкомицином либо фидаксомицином [16]. Однако применение этих антибиотиков для терапии *C. difficile* не исключает возможности возникновения рецидива.

Рецидивирующая инфекция *C. difficile* обычно определяется как эпизод инфекции *C. difficile*, возникший в течение 8 недель после предыдущего ее эпизода [17]. У 15–30% пациентов, которые были успешно вылечены от первичной инфекции *C. difficile*, случается рецидив [18]. После возникновения первого эпизода рецидива риск повторных рецидивов увеличивается до 35–65% [9]. Высокая частота рецидивов инфекции *C. difficile* создает финансовую нагрузку на здравоохранение. В исследованиях, проведенных в США, показатели оценки затрат в сфере здравоохранения варьировали от 2871 до 4846 долларов США на 1 случай первичной инфекции *C. difficile* и от 13 655 до 18 067 долларов США на 1 случай рецидива инфекции *C. difficile* [19].

Экзотоксины А (TcdA) и В (TcdB) *C. difficile* являются основными факторами патогенности *C. difficile* [20]. Молекулы TcdA и TcdB представляют собой гликозилтрансферазы, которые инактивируют ГТФазы семейства Rho в клетках-мишенях, что ведет к повреждениям актинового цитоскелета, гибели клеток и нарушению кишечного барьера и воспалению [21].

Оба эти токсина содержат 4 функциональных домена: 1) N-концевой каталитический домен с гликозилтрансферазной активностью (GTD); 2) домен аутопротеазы (APD); 3) домен доставки (DD); 4) C-концевой домен, образованный короткими гомологичными участками, называемыми комбинированными повторяющимися олигопептидами (CROPs), который играет основную роль в связывании с клеточными рецепторами [22] (рис. А).

Токсины TcdA и TcdB воздействуют на клетки кишечника посредством многоступенчатого механизма, включающего: 1) связывание с рецептором и эндоцитоз; 2) образование пор и транслокацию GTD и APD через эндосомальную мембрану; 3) аутопроцессинг и высвобождение GTD в цитозоль; 4) гликозилирование Rho ГТФаз хозяина [23] (рис. Б).

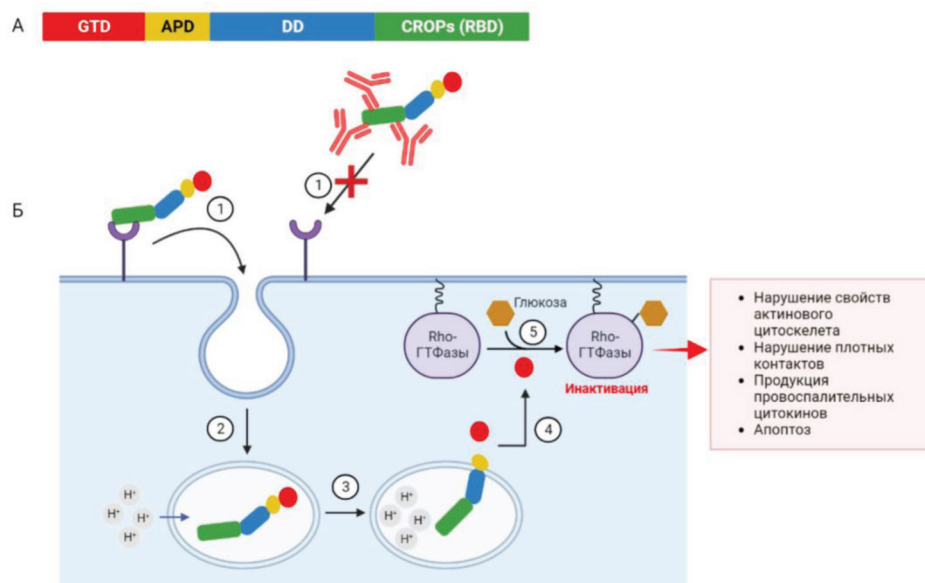


Рис. Схема структуры TcdA и TcdB *C. difficile* и механизма токсических эффектов TcdA и TcdB *C. difficile* и действия токсин-специфических терапевтических антител: А — структура TcdA и TcdB *C. difficile*: N-концевой гликозилтрансферазный домен (GTD, красный), домен аутопротеазы (APD, желтый), домен доставки (DD, синий), C-концевой домен, образованный комбинацией повторяющихся олигопептидами (CROPs, зеленый), являющийся доменом связывания с рецептором (RBD); Б — механизм токсических эффектов TcdA и TcdB *C. difficile* и действия токсин-специфических терапевтических антител

Домен CROPs TcdA и TcdB играет ключевую роль в эндоцитозе токсинов (см. рис. Б). Для TcdB были идентифицированы несколько рецепторов, опосредующих механизм проникновения токсина в клетки: хондроитинсульфатный протеогликан 4 (CSPG4), Frizzled 1 (FZD1), FZD2, FZD7 и нектин 3 [23]. Лучше всего изучена роль CSPG4 в патогенных эффектах TcdB. Так, эксперименты с инфицированием *C. difficile* мышей, нокаутных по гену CSPG4, показали значительное снижение тяжести инфекции, хотя у животных все же наблюдались диарея и потеря веса [24]. Для TcdA механизм проникновения токсина в клетки и специфические рецепторы, опосредующие эндоцитоз, в точности не установлены. Предположительно TcdA также задействует одновременно несколько рецепторов.

Гуморальный иммунитет против токсинов *C. difficile* играет важную роль в обеспечении защиты от первичной симптоматической инфекции *C. difficile* и рецидивов. Бессимптомные носители *C. difficile* демонстрируют анамнестический гуморальный иммунный ответ к TcdA [25]. Также известно, что уровень циркулирующих антител против TcdA или TcdB связан с защитой от рецидивирующей инфекции *C. difficile* [26], [27].

В 2016 г. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) и Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) одобрили моноклональное гуманизованное антитело безлотоксумаб (Zinplava ©, Merck & Co. Inc., США) для профилактики реци-

дивирующей инфекции *C. difficile* у взрослых [28]. На сегодняшний день безлотоксумаб является единственным моноклональным антителом, одобренным к применению у человека.

Изначально в 2006 г. были разработаны 2 моноклональных гуманизованных антитела — безлотоксумаб и актоксумаб, специфичные к CROPs TcdB и TcdA соответственно. Результаты 2 клинических исследований III фазы — MODIFY 1 (ClinicalTrials.gov, NCT01241552) и MODIFY 2 (ClinicalTrials.gov, NCT01513239) — показали, что актоксумаб, в отличие от безлотоксумаба, не обладает выраженной терапевтической эффективностью в отношении рецидивирующей инфекции у добровольцев. Безлотоксумаб, вводимый в виде однократной внутривенной инфузии в дозе 10 мг/кг, снижал частоту рецидивов инфекции *C. difficile* у испытуемых на 38% по сравнению с плацебо [29].

У множества штаммов *C. difficile* наблюдаются значительные различия в генах *tcdA* и *tcdB* [30]. Недавние исследования показали, что TcdB претерпел серьезные эволюционные изменения за последние годы [31]. Несмотря на то, что безлотоксумаб нейтрализовал токсин TcdB у 81 клинического изолята *C. difficile* из разных стран, значения ЕС₅₀ для риботипов 027 и 078 были выше [32]. В исследованиях *in vitro* с использованием очищенных препаратов TcdB было показано, что безлотоксумаб нейтрализует TcdB штаммов риботипов 027, 036 и 078 со значительно более низкой эффективностью по сравнению с нейтрализацией TcdB

других штаммов [32]. Это заставляет усомниться в том, что эффективность безлтоксумаба против клинически значимых штаммов *C. difficile* сохраняется в будущем.

Точные причины отсутствия явной терапевтической эффективности актоксумаба у людей остаются неизвестными. Низкая эффективность актоксумаба может навести на мысль о том, что TcdA является неподходящей терапевтической мишенью. Однако такой вывод не совсем верен. Вопрос о том, какой из токсинов, TcdA или TcdB, является основным фактором патогенности при инфекции *C. difficile*, остается открытым. Было показано, что TcdA(–)TcdB(+) штаммы *C. difficile* вызывают тяжелое повреждение тканей кишечника у хомяков [33, 34]. Клинически значимые TcdA(–)TcdB(+) штаммы *C. difficile* также способны вызывать диарею и колит у людей [35]. Данные другого исследования свидетельствуют о том, что как TcdA(–)TcdB(+) штаммы *C. difficile*, так и TcdA(+)TcdB(–) штаммы *C. difficile* способны вызвать фульминантный колит у хомяков [20]. Эксперименты с введением хомякам очищенных препаратов токсинов вместе и по отдельности показали, что TcdA и TcdB действуют синергетически [36]. Ввиду неустоановленной роли каждого из токсинов в патогенезе инфекции *C. difficile* у человека нельзя считать, что TcdA является неподходящей мишенью для разработки терапевтических антитоксинных антител.

Основными препятствиями на пути к внедрению моноклональных антител в клиническую практику являются их высокая стоимость и сложное производство. Безлтоксумаб доступен по средней оптовой цене 4560 долларов США за флакон, что сопоставимо со стоимостью антибиотика фидаксомицина (4418 долларов США) – единственного противомикробного препарата, снижающего частоту рецидивов после первого эпизода инфекции *C. difficile* [37]. Несмотря на то, что безлтоксумаб имеет преимущество перед фидаксомицином в удобстве применения (однократное внутривенное введение по сравнению с пероральным приемом 2 раза в день в течение 10 дней), стоимость обоих этих препаратов снижает их доступность для населения.

В качестве альтернативы моноклональным антителам для антитоксинной иммунотерапии инфекции *C. difficile* в последние годы рассматривают наноантитела, которые выделяют из IgG представителей семейства *Camelidae*. Антигенсвязывающий паратоп этих антител состоит только из 1 переменного домена тяжелой цепи (VHH) [38].

Наноантитела сохраняют многие характеристики обычных моноклональных антител, в том числе высокую аффинность к антигену-мишени [39]. При этом наноантитела обладают рядом преимуществ по сравнению с полноразмерными моно-

клональными антителами. К их достоинствам относятся: небольшой размер (12–14 кДа), высокая стабильность, сильное сродство к антигенам, высокая растворимость, простота генноинженерных манипуляций, возможность скрининга и отбора с применением технологии фагового дисплея [40], [41]. Наноантитела отличаются продолжительным сроком годности при хранении в температурном диапазоне от +4 °C до –20 °C, что делает их более доступными для транспортировки и применения в медицинских учреждениях [42].

Мономерная структура наноантител и отсутствие посттрансляционных модификаций позволяют экспрессировать их в бактериях и дрожжах, включая *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, что снижает стоимость их производства [43]. Использование микробных экспрессионных систем позволяет производить наноантитела в количестве несколько миллиграммов на литр культуры [44]. Такое производство является доступным и низкочастотным. Наноантитела также имеют низкий риск иммуногенности, поэтому разработка терапевтических антител может не включать в себя этап гуманизации [45].

Вариабельные домены тяжелых цепей наноантител имеют исключительно длинные и гибкие пальцевидные выступы петель так называемой определяющей комплементарности области 3 (CDR3). Образующий ими выпуклый паратоп может простирается в структурные карманы или активные центры белковых антигенов, недоступные для обычных антител [51]. Данные структурные свойства наноантител могут быть полезны для нейтрализации тех токсинов *C. difficile*, которые имеют карманы в рецептор-связывающем домене. Так, наноантитела, разработанные Unger et al., способны эффективно нейтрализовать бинарный токсин гипервирулентных штаммов *C. difficile* за счет блокирования глубокого NAD⁺-связывающего кармана токсина (по предварительным данным молекулярного моделирования) [46]. Известно, что рецептор-связывающий домен TcdA содержит 7 карманов для связывания углеводов, которые, как считается, участвуют во взаимодействии с клеточными рецепторами [47]. Эти структуры могут быть потенциальной мишенью для CDR3 наноантител.

Сообщается о нескольких разработках наноантител, специфичных к TcdA и TcdB *C. difficile*. Hussack et al. иммунизировали *Lama glama* рекомбинантным рецептор-связывающим фрагментом домена CROPs TcdA или TcdB. Полученные методом фагового дисплея наноантитела проявляли специфичность к рецептор-связывающему домену TcdA и TcdB, включая некоторые регионы повторяющихся углевод-связывающих доменов на С-конце. 6 из 7 полученных наноантител ингиби-

рвали цитотоксичность TcdA, но ни одно из них не могло блокировать цитотоксичность TcdB. Применение комбинации наноантител, специфичных к различным эпитопам TcdA, в низких концентрациях позволяло добиться усиления нейтрализации TcdA по сравнению с их использованием по отдельности [48].

В исследовании Murase et al. наноантитело, проявляющее мощную нейтрализующую активность в отношении TcdA, было способно распознавать уникальный для TcdA эпитоп на С-конце, который не относится к связывающим углеводы повторам в рецептор-связывающем домене [49]. Результаты этой работы указывают на особую роль С-конца домена CROPs TcdA в патогенезе инфекции *C. difficile* и могут стать основой для разработки терапевтических наноантител, нацеленных на эту структурную область TcdA.

Zhiyong Yang et al. создали четырехвалентное биспецифическое антитело, нейтрализующее одновременно TcdA и TcdB. Однократная инъекция этого поливалентного антитела облегчала симптомы фульминантного колита у мышей, инфицированных эпидемическим штаммом 027. Несмотря на то, что поливалентное антитело нейтрализовало токсины из клинических изолятов *C. difficile*, экспрессирующих как TcdA, так и TcdB, оно не смогло нейтрализовать токсин из штаммов TcdA(-)TcdB(+) [50].

Низкая эффективность существующей терапии рецидивирующей формы инфекции *C. difficile*, риск возникновения в будущем высокопатогенных штаммов *C. difficile*, изменчивость генов TcdA и TcdB и высокая стоимость безлуксумба диктуют потребность в разработке новых доступных терапевтических противотоксинных антител, эффективных против широкого спектра штаммов *C. difficile*. Наноантитела обладают рядом коммерческих и структурно-функциональных преимуществ по сравнению с обычными моноклональными антителами. Поэтому наноантитела, нацеленные на TcdA и TcdB, являются перспективными кандидатными средствами для разработки симптоматической терапии инфекции *C. difficile*, в особенности ее рецидивирующей формы.

Можно предположить, что исследование взаимодействия TcdA и TcdB с клеточными рецепторами, изучение структурных особенностей связывания наноантител с токсинами TcdA и TcdB, а также разработка противотоксинных наноантител, обладающих защитной активностью против широкого спектра штаммов *C. difficile*, станут задачами будущих исследований, посвященных иммунотерапии связанных с *C. difficile* заболеваний.

Благодарность

Бочкаевой Занде Владимировне за ценные критические замечания.

Литература

1. Buddle J.E., Fagan R.P. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile* // *Virulence*. 2023. Vol. 14, № 1.
2. Hota S.S. et al. Determining Mortality Rates Attributable to *Clostridium difficile* Infection // *Emerg. Infect. Dis.* 2012. Vol. 18, № 2. P. 305–307.
3. Czepiel J. et al. *Clostridium difficile* infection: review // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019. Vol. 38, № 7. P. 1211–1221.
4. Dobson G., Hickey C., Trinder J. *Clostridium difficile* colitis causing toxic megacolon, severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome // *Intensive Care Med.* 2003. Vol. 29, № 6. P. 1030–1030.
5. Guery B. *Clostridium difficile* infection trials: what is the primary endpoint? // *Lancet Infect. Dis.* 2019. Vol. 19, № 3. P. 219–220.
6. Bartlett J.G. Narrative Review: The New Epidemic of *Clostridium difficile* – Associated Enteric Disease // *Ann. Intern. Med.* 2006. Vol. 145, № 10. P. 758.
7. Marra A.R. et al. Incidence and Outcomes Associated With *Clostridium difficile* Infections // *JAMA Netw. Open.* 2020. Vol. 3, № 1. P. e1917597.
8. Hall A.J. et al. The Roles of *Clostridium difficile* and Norovirus Among Gastroenteritis-Associated Deaths in the United States, 1999–2007 // *Clin. Infect. Dis.* 2012. Vol. 55, № 2. P. 216–223.
9. Dubberke E.R., Olsen M.A. Burden of *Clostridium difficile* on the Healthcare System // *Clin. Infect. Dis.* 2012. Vol. 55, № suppl_2. P. S88–S92.
10. Филь Т.С. Стратификация факторов риска развития антибиотикоассоциированной диареи: автореф. дис. ... канд. наук 2017.
11. Nikolaeva I. V. et al. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection. Review of current clinical guidelines // *Pract. Med.* 2020. Vol. 18, № 6. P. 106–112.
12. Hensgens M.P.M. et al. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics // *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. Vol. 67, № 3. P. 742–748.
13. Theriot C.M., Young V.B. Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 69, № 1. P. 445–461.
14. Theriot C.M. et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5, № 1. P. 3114.
15. Owens, Jr. R.C. et al. Antimicrobial-Associated Risk Factors for *Clostridium difficile* Infection // *Clin. Infect. Dis.* 2008. Vol. 46, № s1. P. S19–S31.
16. Surawicz C.M. et al. Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infections // *Am. J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 108, № 4. P. 478–498.
17. Debast S.B., Bauer M.P., Kuijper E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* Infection // *Clin. Microbiol. Infect.* 2014. Vol. 20. P. 1–26.
18. McFarland L. V. et al. Recurrent *Clostridium Difficile* Disease: Epidemiology and Clinical Characteristics // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1999. Vol. 20, № 01. P. 43–50.
19. Ghantaji S.S. et al. Economic healthcare costs of *Clostridium difficile* infection: a systematic review // *J. Hosp. Infect.* 2010. Vol. 74, № 4. P. 309–318.
20. Kuehne S.A. et al. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection // *Nature*. 2010. Vol. 467, № 7316. P. 711–713.
21. Aktories K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. Vol. 9, № 7. P. 487–498.

22. Pruitt R.N. et al. Structural organization of the functional domains of Clostridium difficile toxins A and B // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 30. P. 13467 – 13472.
23. Kordus S.L., Thomas A.K., Lacy D.B. Clostridioides difficile toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. Vol. 20, № 5. P. 285 – 298.
24. Chen P. et al. Structural basis for CSPG4 as a receptor for TcdB and a therapeutic target in Clostridioides difficile infection // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 3748.
25. Kyne L. et al. Asymptomatic Carriage of Clostridium difficile and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 342, № 6. P. 390 – 397.
26. Kyne L. et al. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea // *Lancet.* 2001. Vol. 357, № 9251. P. 189 – 193.
27. Leav B.A. et al. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent Clostridium difficile infection (CDI) // *Vaccine.* 2010. Vol. 28, № 4. P. 965 – 969.
28. Raeisi H. et al. Application of recombinant antibodies for treatment of Clostridioides difficile infection: Current status and future perspective // *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13.
29. Wilcox M.H. et al. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection // *N. Engl. J. Med.* 2017. Vol. 376, № 4. P. 305 – 317.
30. Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of Clostridium difficile toxinotypes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. Vol. 32, № 3. P. 541 – 555.
31. Shen E. et al. Subtyping analysis reveals new variants and accelerated evolution of Clostridioides difficile toxin B // *Commun. Biol.* 2020. Vol. 3, № 1. P. 347.
32. Hernandez L.D. et al. Broad Coverage of Genetically Diverse Strains of Clostridium difficile by Actoxumab and Bezlotoxumab Predicted by In Vitro Neutralization and Epitope Modeling // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. Vol. 59, № 2. P. 1052 – 1060.
33. Orrell K.E., Melnyk R.A. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021. Vol. 85, № 3.
34. Lyras D. et al. Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile // *Nature.* 2009. Vol. 458, № 7242. P. 1176 – 1179.
35. Drudy D., Fanning S., Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile // *Int. J. Infect. Dis.* 2007. Vol. 11, № 1. P. 5 – 10.
36. Lyerly D.M. et al. Effects of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals // *Infect. Immun.* 1985. Vol. 47, № 2. P. 349 – 352.
37. Lee Y. et al. Bezlotoxumab (Zinplava) for Clostridium Difficile Infection: The First Monoclonal Antibody Approved to Prevent the Recurrence of a Bacterial Infection. // *P T.* 2017. Vol. 42, № 12. P. 735 – 738.
38. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. Vol. 82, № 1. P. 775 – 797.
39. Koide A. et al. Exploring the Capacity of Minimalist Protein Interfaces: Interface Energetics and Affinity Maturation to Picomolar KD of a Single-domain Antibody with a Flat Paratope // *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 373, № 4. P. 941 – 953.
40. Jovčevska I., Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies // *BioDrugs.* 2020. Vol. 34, № 1. P. 11 – 26.
41. Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Isolation of Monoclonal Antibody Fragments from Phage Display Libraries. 2009. P. 341 – 364.
42. De Vos J. et al. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013. Vol. 13, № 8. P. 1149 – 1160.
43. Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies // *Cancer Metastasis Rev.* 2005. Vol. 24, № 4. P. 501 – 519.
44. Dmitriev O.Y., Lutsenko S., Muyldermans S. Nanobodies as Probes for Protein Dynamics in Vitro and in Cells // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 8. P. 3767 – 3775.
45. Ackaert C. et al. Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12.
46. Unger M. et al. Selection of Nanobodies that Block the Enzymatic and Cytotoxic Activities of the Binary Clostridium Difficile Toxin CDT // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 7850.
47. Greco A. et al. Carbohydrate recognition by Clostridium difficile toxin A // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. Vol. 13, № 5. P. 460 – 461.
48. Hussack G. et al. Neutralization of Clostridium difficile Toxin A with Single-domain Antibodies Targeting the Cell Receptor Binding Domain // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 11. P. 8961 – 8976.
49. Murase T. et al. Structural Basis for Antibody Recognition in the Receptor-binding Domains of Toxins A and B from Clostridium difficile // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 4. P. 2331 – 2343.
50. Yang Z. et al. A Novel Multivalent, Single-Domain Antibody Targeting TcdA and TcdB Prevents Fulminant Clostridium difficile Infection in Mice // *J. Infect. Dis.* 2014. Vol. 210, № 6. P. 964 – 972.

References

1. Buddle J.E., Fagan R.P. Pathogenicity and virulence of Clostridioides difficile // *Virulence.* 2023. Vol. 14, № 1.
2. Hota S.S. et al. Determining Mortality Rates Attributable to Clostridium difficile Infection // *Emerg. Infect. Dis.* 2012. Vol. 18, № 2. P. 305 – 307.
3. Czepl J. et al. Clostridium difficile infection: review // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019. Vol. 38, № 7. P. 1211 – 1221.
4. Dobson G., Hickey C., Trinder J. Clostridium difficile colitis causing toxic megacolon, severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome // *Intensive Care Med.* 2003. Vol. 29, № 6. P. 1030 – 1030.
5. Guery B. Clostridium difficile infection trials: what is the primary endpoint? // *Lancet Infect. Dis.* 2019. Vol. 19, № 3. P. 219 – 220.
6. Bartlett J.G. Narrative Review: The New Epidemic of Clostridium difficile – Associated Enteric Disease // *Ann. Intern. Med.* 2006. Vol. 145, № 10. P. 758.
7. Marra A.R. et al. Incidence and Outcomes Associated With Clostridium difficile Infections // *JAMA Netw. Open.* 2020. Vol. 3, № 1. P. e1917597.
8. Hall A.J. et al. The Roles of Clostridium difficile and Norovirus Among Gastroenteritis-Associated Deaths in the United States, 1999 – 2007 // *Clin. Infect. Dis.* 2012. Vol. 55, № 2. P. 216 – 223.
9. Dubberke E.R., Olsen M.A. Burden of Clostridium difficile on the Healthcare System // *Clin. Infect. Dis.* 2012. Vol. 55, suppl_2. P. S88 – S92.
10. Fil' T.S. Stratifikaciya faktorov riska razvitiya antibiotikoassociirovannoj diarei: avtoref. dis. ... kand. nauk 2017.
11. Nikolaeva I. V. et al. Clostridioides (Clostridium) difficile infection. Review of current clinical guidelines // *Pract. Med.* 2020. Vol. 18, № 6. P. 106 – 112.
12. Hensgens M.P.M. et al. Time interval of increased risk for Clostridium difficile infection after exposure to antibiotics // *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. Vol. 67, № 3. P. 742 – 748.
13. Theriot C.M., Young V.B. Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and Clostridium difficile // *Annu. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 69, № 1. P. 445 – 461.

14. Theriot C.M. et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to Clostridium difficile infection // Nat. Commun. 2014. Vol. 5, № 1. P. 3114.
15. Owens, Jr. R.C. et al. Antimicrobial Associated Risk Factors for Clostridium difficile Infection // Clin. Infect. Dis. 2008. Vol. 46, № 1. P. S19–S31.
16. Surawicz C.M. et al. Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile Infections // Am. J. Gastroenterol. 2013. Vol. 108, № 4. P. 478–498.
17. Debast S.B., Bauer M.P., Kuijper E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for Clostridium difficile Infection // Clin. Microbiol. Infect. 2014. Vol. 20. P. 1–26.
18. McFarland L. V. et al. Recurrent Clostridium Difficile Disease: Epidemiology and Clinical Characteristics // Infect. Control Hosp. Epidemiol. 1999. Vol. 20, № 01. P. 43–50.
19. Ghantaji S.S. et al. Economic healthcare costs of Clostridium difficile infection: a systematic review // J. Hosp. Infect. 2010. Vol. 74, № 4. P. 309–318.
20. Kuehne S.A. et al. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection // Nature. 2010. Vol. 467, № 7316. P. 711–713.
21. Aktories K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases // Nat. Rev. Microbiol. 2011. Vol. 9, № 7. P. 487–498.
22. Pruitt R.N. et al. Structural organization of the functional domains of Clostridium difficile toxins A and B // Proc. Natl. Acad. Sci. 2010. Vol. 107, № 30. P. 13467–13472.
23. Kordus S.L., Thomas A.K., Lacy D.B. Clostridioides difficile toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics // Nat. Rev. Microbiol. 2022. Vol. 20, № 5. P. 285–298.
24. Chen P. et al. Structural basis for CSPG4 as a receptor for TcdB and a therapeutic target in Clostridioides difficile infection // Nat. Commun. 2021. Vol. 12, № 1. P. 3748.
25. Kyne L. et al. Asymptomatic Carriage of Clostridium difficile and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A // N. Engl. J. Med. 2000. Vol. 342, № 6. P. 390–397.
26. Kyne L. et al. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea // Lancet. 2001. Vol. 357, № 9251. P. 189–193.
27. Leav B.A. et al. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent Clostridium difficile infection (CDI) // Vaccine. 2010. Vol. 28, № 4. P. 965–969.
28. Raeisi H. et al. Application of recombinant antibodies for treatment of Clostridioides difficile infection: Current status and future perspective // Front. Immunol. 2022. Vol. 13.
29. Wilcox M.H. et al. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection // N. Engl. J. Med. 2017. Vol. 376, № 4. P. 305–317.
30. Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of Clostridium difficile toxinotypes // FEMS Microbiol. Rev. 2008. Vol. 32, № 3. P. 541–555.
31. Shen E. et al. Subtyping analysis reveals new variants and accelerated evolution of Clostridioides difficile toxin B // Commun. Biol. 2020. Vol. 3, № 1. P. 347.
32. Hernandez L.D. et al. Broad Coverage of Genetically Diverse Strains of Clostridium difficile by Actoxumab and Bezlotoxumab Predicted by In Vitro Neutralization and Epitope Modeling // Antimicrob. Agents Chemother. 2015. Vol. 59, № 2. P. 1052–1060.
33. Orrell K.E., Melnyk R.A. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2021. Vol. 85, № 3.
34. Lyras D. et al. Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile // Nature. 2009. Vol. 458, № 7242. P. 1176–1179.
35. Drudy D., Fanning S., Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile // Int. J. Infect. Dis. 2007. Vol. 11, № 1. P. 5–10.
36. Lyerly D.M. et al. Effects of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals // Infect. Immun. 1985. Vol. 47, № 2. P. 349–352.
37. Lee Y. et al. Bezlotoxumab (Zinplava) for Clostridium Difficile Infection: The First Monoclonal Antibody Approved to Prevent the Recurrence of a Bacterial Infection. // P T. 2017. Vol. 42, № 12. P. 735–738.
38. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies // Annu. Rev. Biochem. 2013. Vol. 82, № 1. P. 775–797.
39. Koide A. et al. Exploring the Capacity of Minimalist Protein Interfaces: Interface Energetics and Affinity Maturation to Picomolar KD of a Single-domain Antibody with a Flat Paratope // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 373, № 4. P. 941–953.
40. Jovčevska I., Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies // BioDrugs. 2020. Vol. 34, № 1. P. 11–26.
41. Arbabi-Gahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Isolation of Monoclonal Antibody Fragments from Phage Display Libraries. 2009. P. 341–364.
42. De Vos J. et al. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target // Expert Opin. Biol. Ther. 2013. Vol. 13, № 8. P. 1149–1160.
43. Arbabi-Gahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies // Cancer Metastasis Rev. 2005. Vol. 24, № 4. P. 501–519.
44. Dmitriev O.Y., Lutsenko S., Muyldermans S. Nanobodies as Probes for Protein Dynamics in Vitro and in Cells // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291, № 8. P. 3767–3775.
45. Ackaert C. et al. Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies // Front. Immunol. 2021. Vol. 12.
46. Unger M. et al. Selection of Nanobodies that Block the Enzymatic and Cytotoxic Activities of the Binary Clostridium Difficile Toxin CDT // Sci. Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 7850.
47. Greco A. et al. Carbohydrate recognition by Clostridium difficile toxin A // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. Vol. 13, № 5. P. 460–461.
48. Hussack G. et al. Neutralization of Clostridium difficile Toxin A with Single-domain Antibodies Targeting the Cell Receptor Binding Domain // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 11. P. 8961–8976.
49. Murase T. et al. Structural Basis for Antibody Recognition in the Receptor-binding Domains of Toxins A and B from Clostridium difficile // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289, № 4. P. 2331–2343.
50. Yang Z. et al. A Novel Multivalent, Single-Domain Antibody Targeting TcdA and TcdB Prevents Fulminant Clostridium difficile Infection in Mice // J. Infect. Dis. 2014. Vol. 210, № 6. P. 964–972.

Авторский коллектив:

Попруга Катерина Эдуардовна — аналитик 2-й категории отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью; тел.: 8(495)540-61-75 доб. 4517, e-mail: KPopruga@cspfmba.ru

Макаров Валентин Владимирович — заместитель директора Института синтетической биологии и геномной инженерии по научно-экспериментальной работе Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, к.б.н.; тел.: 8(495)540-61-75 доб. 4004, e-mail: Makarov@cspfmba.ru