(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 366 626**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05857759 .4**
(96) Fecha de presentación : **04.02.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1766093**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

(54) Título: **Anticuerpos contra toxinas de *Clostridium difficile* y usos de los mismos.**

(30) Prioridad: **06.02.2004 US 542357 P**
28.09.2004 US 613854 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

(73) Titular/es: **University of Massachusetts**
One Beacon Street, 26th Floor
Boston, Massachusetts 02108, US
MEDAREX, Inc.

(72) Inventor/es: **Ambrosino, Donna;**
Babcock, Gregory, J.;
Broering, Theresa;
Graziano, Robert;
Hernández, Hector, Javier;
Lowy, Israel;
Mandell, Robert;
Molrine, Deborah;
Thomas, William, D. y
Zhang, Hui-Fen

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 626 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra toxinas de Clostridium difficile y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

Clostridium difficile (*C. difficile*) es una bacteria gram-negativa que produce enfermedad gastrointestinal en seres humanos. *C. difficile* es la causa más común de diarrea infecciosa en pacientes hospitalizados y es una de las infecciones nosocomiales más comunes en conjunto (Kelly y col., New Eng. J. Med., 330:257-62, 1994). En realidad, la enfermedad asociada a este patógeno puede aquejar a hasta tres millones de pacientes hospitalizados al año en Estados Unidos (McFarland y col., New Eng. J. Med., 320:204-10, 1989; Johnson y col., Lancet, 336:97-100, 1990).

El tratamiento con antibióticos tales como ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas y clindamicina que altera la flora intestinal normal puede permitir la colonización del intestino con *C. difficile* y conduce a enfermedad por *C. difficile* (Kelly y Lamont, Annu. Rev. Med., 49:375-90, 1998). La aparición de enfermedad por *C. difficile* se produce normalmente cuatro a nueve días después de empezar el tratamiento con antibiótico, pero también puede producirse después de retirar la terapia con antibiótico. *C. difficile* puede producir síntomas que oscilan de diarrea y colitis leve a grave que incluye colitis pseudomembranosa (PMC), una forma grave de colitis caracterizada por dolor abdominal, diarrea líquida y enfermedad sistémica (por ejemplo, fiebre, náuseas). La enfermedad recurrente puede producirse en hasta el 20 % de los pacientes tratados de un primer episodio enfermedad, y aquellos que recayeron tienen un mayor riesgo de recaídas adicionales (Kelly y Lamont, Annu. Rev. Med., 49:375-90, 1998).

Se cree que la enfermedad por *C. difficile* es producida por las acciones de dos exotoxinas, la toxina A y la toxina B, sobre el epitelio intestinal. Ambas toxinas son proteínas de alto peso molecular (280-300 kDa) que catalizan la modificación covalente de proteínas Rho, proteínas pequeñas de unión a GTP que participan en la polimerización de actina, en células huésped. La modificación de proteínas Rho por las toxinas las inactiva, conduciendo a despolimerización de filamentos de actina y muerte celular. Ambas toxinas son mortales para ratones cuando se inyectan parenteralmente (Kelly y Lamont, Annu. Rev. Med., 49:375-90, 1998).

La enfermedad por *C. difficile* puede diagnosticarse por ensayos que detectan la presencia o actividad de toxina A o toxina B en muestras de heces, por ejemplo, inmunoensayos enzimáticos. Los ensayos de citotoxinas pueden usarse para detectar la actividad de la toxina. Para realizar un ensayo de citotoxina, las heces se filtran para eliminar bacterias y se determinan los efectos de toxinas citopáticas sobre las células cultivadas (Merz y col., J. Clin. Microbiol., 32:1142-47, 1994).

El tratamiento de *C. difficile* se complica por el hecho de que los antibióticos desencadenan enfermedad asociada a *C. difficile*. Sin embargo, los antibióticos son actualmente la opción de tratamiento primaria. Frecuentemente se usan antibióticos que es menos probable que produzcan enfermedad asociada a *C. difficile* tal como vancomicina y metronidazol. La resistencia a vancomicina que se desarrolla en otros microorganismos es un motivo de preocupación en el uso de este antibiótico para el tratamiento, ya que es el único tratamiento eficaz para infección por otros microorganismos (Gerding, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 250:127-39, 2000). También se usan enfoques probióticos en los que a un sujeto se le administran microorganismos no patógenos que supuestamente compiten por nichos con las bacterias patógenas. Por ejemplo, se ha informado del tratamiento con una combinación de vancomicina y *Saccharomyces boulardii* (McFarland y col., JAMA., 271(24):1913-8, 1994. Errata en: JAMA, 272(7):518, 1994).

Se han desarrollado vacunas que protegen a los animales de la exposición mortal en modelos infecciosos de enfermedad (Torres y col., Infect. Immun. 63(12):4619-27,1995). Además, se ha mostrado que los anticuerpos policlonales protegen a los hámsteres de la enfermedad cuando se administran mediante inyección o la comida (Giannasca y col., Infect. Immun. 67(2):527-38, 1999; Kink y Williams, Infect. Immun., 66(5):2018-25, 1998). Se han aislado anticuerpos monoclonales murinos que se unen a toxinas de *C. difficile* y neutralizan sus actividades *in vivo* e *in vitro* (Corthier y col., Infect. Immun., 59(3):1192-5, 1991). Hay algunos informes de que los anticuerpos policlonales humanos que contienen anticuerpos neutralizantes de toxina pueden prevenir la recaída por *C. difficile* (Salcedo y col., Gut., 41(3):366-70, 1997). La respuesta de anticuerpos contra la toxina A ha guardado relación con la evolución de la enfermedad, que indica la eficacia de respuestas humorales en el control de la infección. Los individuos con respuestas robustas de ELISA a la toxina A tuvieron enfermedad menos grave en comparación con individuos con bajos niveles de anticuerpo para la toxina A (Kyne y col., Lancet, 357(9251):189-93, 2001).

La función individual de la toxina A y la toxina B en la patogénesis de enfermedades y la función de anticuerpos anti-toxina en la protección de enfermedad por *C. difficile* son controvertidas y pueden depender del huésped. En seres humanos, la respuesta de anticuerpos anti-toxina A ha guardado relación con la evolución de la enfermedad, sugiriendo un requisito para la respuesta de anti-toxina A para la protección. Esta observación es a diferencia de informes de organismos de *C. difficile* causantes de enfermedad que sólo expresan la toxina B, implicando que la toxina B puede contribuir a una enfermedad en seres humanos. Estas cepas negativas para toxina A también pueden producir enfermedad en hámsteres (Sambol y col., J. Infect. Dis., 183(12):1760-6, 2001).

Kink y col. (Infection and Immunity, 1998, vol. 66, nº 5: 2018-2025) examinaron la función de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* en patogénesis y la capacidad de anticuerpos aviares administrados por vía oral contra epítopes

recombinantes de toxina A y toxina B para tratar enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD).

Corthier y col. (Infection and Immunity, 1991, vol. 59, nº 3: 1192-1195) describieron el uso de anticuerpos monoclonales contra toxina A de *C. difficile* para la protección contra colitis pseudomembranosa en ratones gnotobióticos.

Resumen de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de anticuerpos contra la toxina A de *C. difficile* a un sujeto puede proteger al sujeto de la recaída de enfermedad mediada por *C. difficile in vivo.* La administración de anticuerpos a una o ambas de la toxina A y la toxina B puede prevenir la enfermedad mediada por *C. difficile* primaria. Los anticuerpos de alta afinidad contra toxinas de *C. difficile* pueden producirse, por ejemplo, en ratones tales como ratones transgénicos que expresan segmentos del gen de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos pueden neutralizar la citotoxicidad de toxinas *in vitro* y neutralizar la enterotoxicidad de toxinas *in vivo.* Los anticuerpos que reconocen la toxina A y/o la toxina B pueden inhibir y proteger de la enfermedad *in vivo.*

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente y neutraliza la toxina A de *Clostridium difficile* (*C. difficile*), en el que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende:

(a) una región de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 7 a 9 y una región de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 16 a 18;
(b) una región de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 10 a 12 y una región de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 19 a 21; o
(c) una región de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 13 a 15 y una región de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 22 a 24.

Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos neutralizan la toxina A *in vitro,* inhiben la unión de toxina A a células de mamífero e/o inhiben enfermedad mediada por *C. difficile in vivo.*

En diversas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos tienen una o más de las siguientes características: cuando se administran a un ratón, protegen al ratón de la administración de una toxina de *C. difficile* en una cantidad que sería mortal para un ratón de control al que no se le administra el anticuerpo; protegen de o inhiben colitis mediada por *C. difficile*, colitis asociada a antibióticos o colitis pseudomembranosa (PMC) en un sujeto; protegen de o inhiben diarrea en un sujeto; e/o inhiben la recaída de enfermedad mediada por *C. difficile*.

Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden unirse específicamente a un epítope dentro de la mitad del extremo N de la toxina A, por ejemplo, un epítope entre los aminoácidos 1-1256 de la toxina A. En otras realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a un epítope dentro del dominio de unión al receptor del extremo C de la toxina A, por ejemplo, un epítope entre los aminoácidos 1853-2710 de la toxina A, o un epítope entre los aminoácidos 659-1852, por ejemplo, un epítope dentro de los residuos de aminoácidos 900-1852, 900-1200 ó 920-1033 de la toxina A. En otras realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a un epítope dentro de los aminoácidos 1-600, 400-600 ó 415-540 de la toxina A. Otros anticuerpos particulares o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden unirse específicamente a un epítope dentro de los residuos de aminoácidos 1-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 900-1000, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1800-1900, 1900-200, 2100-2200 ó 2200-2300, 2300-2400, 2400-2500, 2500-2600, 2600-2710 de la toxina A, o cualquier intervalo, porción o límite de los mismos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a la toxina A con una K_D inferior a aproximadamente 20 x 10^{-6} M. En una realización particular, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la toxina A con una K_D inferior a aproximadamente 10 x 10^{-7} M, inferior a aproximadamente 10 x 10^{-8} M, inferior a aproximadamente 10 x 10^{-9} M, o inferior a aproximadamente 10 x 10^{-10} M. En otras realizaciones particulares, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la toxina A con una K_D inferior a aproximadamente 50 x 10^{-10} M, inferior a aproximadamente 20 x 10^{-10} M, inferior a aproximadamente 15 x 10^{-10} M, inferior a aproximadamente 8 x 10^{-10} M o inferior a aproximadamente 5 x 10^{-10} M.

En diversas otras realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos incluyen una región de la cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 3D8 (SEC ID Nº:1), 1B11 (SEC ID Nº:2) o 3H2 (SEC ID Nº:3).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos incluyen una región de la

cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena ligera variable del anticuerpo producido por el clon 3D8 (SEC ID Nº:4), 1B11 (SEC ID Nº:5) o 3H2 (SEC ID Nº:6).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos incluyen cada uno tanto una región de la cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 3D8 (SEC ID Nº:1), 1B11 (SEC ID Nº:2), o 3H2 (SEC ID Nº:3) como una región de la cadena ligera variable que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena ligera variable del clon 3D8 (SEC ID Nº:4), 1B11 (SEC ID Nº:5) o 3H2 (SEC ID Nº:6).

En ciertas realizaciones, la región de la cadena ligera variable y la región de la cadena pesada variable del anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo son idénticas a una región de la cadena ligera variable y región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 3D8 (SEC ID Nº:1, SEC ID Nº:4), 1B11 (SEC ID Nº:2, SEC ID Nº:5) o 3H2 (SEC ID Nº:3, SEC ID Nº:6).

Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden ser anticuerpos de longitud completa, pueden incluir un dominio efector, por ejemplo, un dominio Fc, pueden ser anticuerpos de isotipo inmunoglobulina gamma, anticuerpos monocatenarios o fragmentos Fab. Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden incluir adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una marca.

En diversas realizaciones, las composiciones que incluyen los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos están libres de otros polipéptidos humanos (por ejemplo, contienen menos del 5 % de polipéptidos humanos distintos de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos).

En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos aislados o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención: (a) incluyen una región de la cadena pesada variable que es el producto de o se deriva de un gen VH 3-33 humano; e/o (b) incluyen una región de la cadena ligera variable que es el producto de o se deriva de un gen Vκ humano seleccionado del grupo que consiste en Vκ L19, Vκ L6 y Vκ L15. Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden incluir otras características descritas en este documento.

En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos aislados o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención: (a) incluyen una región de la cadena pesada variable que es el producto de o se deriva de un gen VH 5-51 humano; e/o (b) incluyen una región de la cadena ligera variable que es el producto de o se deriva de un gen Vκ A27 humano. Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos también pueden incluir otras características descritas en este documento.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende:

(a) el anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo de la invención, que se une específicamente y neutraliza la toxina A de *C. difficile*, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano; y
(b) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a y neutraliza la toxina B de *C. difficile*.

En una realización, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina B de *C. difficile* es policlonal.

En otro aspecto, la invención caracteriza composiciones que incluyen: (a) un anticuerpo monoclonal humano aislado o porción de unión a antígeno del mismo de la invención que se une específicamente a y neutraliza toxinas A de *C. difficile*; y (b) un anticuerpo monoclonal humano aislado o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a y neutraliza la toxina B de *C. difficile*.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a y neutralizan la toxina B neutralizan la toxina B *in vitro*, inhiben la unión de toxina B a células de mamífero y/o neutralizan la toxina B *in vivo*.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a y neutralizan la toxina B se unen específicamente a un epítope en una porción del extremo C de la toxina B (por ejemplo, entre los aminoácidos 1777-2366 de la toxina B). Otros anticuerpos particulares o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden unirse específicamente a un epítope dentro de los residuos de aminoácidos 1-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 900-1000, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1800-1900, 1900-200, 2100-2200 ó 2200-2366 de la toxina B, o cualquier intervalo, porción o límite de los mismos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a la toxina B con una K_D inferior a aproximadamente 20 x 10^{-6} M. En una realización particular, el anticuerpo o porción

de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la toxina B con una K_D inferior a aproximadamente 10 x 10^{-7} M, inferior a aproximadamente 10 x 10^{-8} M, inferior a aproximadamente 10 x 10^{-9} M o inferior a aproximadamente 10 x 10^{-10} M. En otras realizaciones particulares, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la toxina B con una K_D inferior a aproximadamente 50 x 10^{-10} M, inferior a aproximadamente 20 x 10^{-10} M, inferior a aproximadamente 15 x 10^{-10} M, inferior a aproximadamente 8 x 10^{-10} M o inferior a aproximadamente 5 x 10^{-10} M.

En diversas otras realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B incluyen una región de la cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (es decir, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº:54), 2A11 ó 1G10.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B incluyen una región de la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (es decir, la secuencia de aminoácidos mostrada en (SEC ID Nº:58), 2A11 ó 1G10.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B incluyen cada uno tanto una región de la cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (es decir, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº:54), 2A11 ó 1G10 como una región de la cadena ligera variable que incluye una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia de aminoácidos de la región de la cadena ligera variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (es decir, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº:58), 2A11 ó 1G10.

En diversas realizaciones, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B se unen específicamente a un epítope que se solapa con un epítope unido por un anticuerpo producido por el clon 124-152, 2A11 ó 1G10 y/o compite por la unión a la toxina B con un anticuerpo producido por el clon 124-152, 2A11 ó 1G10.

Una región de la cadena pesada variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B puede incluir una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % o más a una CDR del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 62, 64 ó 66), 2A11 ó 1G10 (Tabla 3).

Una región de la cadena ligera variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B puede incluir una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % o más a una CDR del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 68, 70 ó 72), 2A11 ó 1G10 (Tabla 4).

Una región de la cadena pesada variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B puede incluir una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % o más a una CDR del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 62, 64 ó 66), 2A11 ó 1G10, y una región de la cadena ligera variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos puede incluir una o más CDR que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más a una CDR de una región de la cadena ligera variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 68, 70 ó 72), 2A11 ó 1G10.

Una región de la cadena pesada variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B puede incluir tres CDR que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % o más a una CDR de una región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 62, 64 ó 66), 2A11 ó 1G10.

En ciertas realizaciones, la región de la cadena ligera variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B incluye tres CDR que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más a una CDR de una región de la cadena ligera variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 68, 70 ó 72), 2A11 ó 1G10.

En otras realizaciones, la región de la cadena ligera variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B incluye una o más CDR que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % o más a una CDR de una región de la cadena ligera variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 68, 70 ó 72), 2A11 ó 1G10, y una región de la cadena pesada variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos incluye tres CDR que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % o más a una CDR de una región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 62, 64 ó 66), 2A11 ó 1G10. La región de la cadena ligera variable puede incluir tres

CDR que son idénticas al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % o más a una CDR de una región de la cadena ligera variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 68, 70 ó 72), 2A11 ó 1G10.

En todavía otras realizaciones, la región de la cadena pesada variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina B incluye tres CDR que son idénticas a una CDR de una región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 62, 64 ó 66), 2A11 ó 1G10, y una región de la cadena ligera variable de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos incluye tres CDR que son idénticas a una CDR de una región de la cadena ligera variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 68, 70 ó 72), 2A11 ó 1G10, por ejemplo, una región de la cadena ligera variable y una región de la cadena pesada variable del anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo son idénticas a una región de la cadena ligera variable y una región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (SEC ID Nº: 62, 64 ó 66), 2A11 ó 1G10.

En otro aspecto, la composición de la invención puede comprender polipéptidos aislados que incluyen un porción de unión a antígeno de un anticuerpo producido por los clones de hibridoma 124-152, 2A11 ó 1G10 (también denominados en este documento “124-152”, “2A11” y “1G10”).

En una realización, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos de mamífero (por ejemplo, humanos) o porciones de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden incluir otras características descritas en este documento.

En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que incluyen una secuencia que codifica polipéptidos que comprenden SEC ID Nº:1, 2, 3, 4, 5 ó 6. La invención también proporciona vectores de expresión que incluyen un ácido nucleico de la invención, además de células huésped, por ejemplo, células bacterianas, por ejemplo, células de *E. coli* que incluyen un ácido nucleico de la invención.

Las células huésped también pueden ser células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0 o células de mieloma.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende: (a) el anticuerpo monoclonal de la invención o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente y neutraliza la toxina A; y (b) (i) una marca; (ii) un agente terapéutico; (iii) un agente para acoplar el anticuerpo a una marca o agente terapéutico; o (iv) un dispositivo para administrar el anticuerpo a un sujeto.

El kit puede incluir un anticuerpo policlonal o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una exotoxina de *C. difficile*. En una realización, el anticuerpo policlonal o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la toxina B de *C. difficile*.

En otra realización, el kit puede incluir un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une específicamente a la toxina B de *C. difficile*.

La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado o porción de unión a antígeno del mismo de la invención que se une específicamente a y neutraliza la toxina A o una composición de la invención para su uso en un procedimiento para tratar el cuerpo humano o animal mediante terapia o en un procedimiento de diagnóstico llevado a cabo en el cuerpo humano o animal. El anticuerpo o composición de la invención también se proporciona para su uso en un procedimiento para tratar enfermedad mediada por *C. difficile* en un sujeto, por ejemplo, colitis mediada por *C. difficile*, colitis asociada a antibióticos, colitis pseudomembranosa (PMC) mediada por *C. difficile* o diarrea, o recaída de enfermedad mediada por *C. difficile*. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo para su uso en los procedimientos descritos en este documento puede administrarse, por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente al sujeto.

El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo para su uso en los procedimientos descritos en este documento puede administrarse solo o en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, un segundo anticuerpo monoclonal humano o porción de unión a antígeno del mismo. En un ejemplo, el segundo anticuerpo monoclonal humano o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la toxina B de *C. difficile*. En otro ejemplo, el segundo agente es un antibiótico, por ejemplo, vancomicina, metronidazol o bacitracina. El segundo agente puede ser gamma-globulina policlonal (por ejemplo, gamma-globulina humana), un agente probiótico tal como *Saccharomyces boulardii* o una vacuna contra *C. difficile* tal como una vacuna de toxoide.

En una realización particular, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo para administración incluye una región de la cadena ligera variable y una región de la cadena pesada variable idéntica a la región de la cadena ligera variable y la región de la cadena pesada variable del anticuerpo producido por el clon 3D8 (es decir, que incluye una secuencia de la región de la cadena ligera variable idéntica a SEC ID Nº:4 y una secuencia de la región de la cadena pesada variable idéntica a SEC ID Nº:1).

En otra realización, este anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo es para administración en combinación con un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que incluye una región de la cadena ligera variable y una región de la cadena pesada variable idéntica a la región de la cadena ligera variable y la región de la cadena pesada

variable del anticuerpo producido por el clon 124-152 (es decir, que incluye una secuencia de la región de la cadena ligera variable idéntica a SEC ID Nº:58 y una secuencia de la región de la cadena pesada variable idéntica a SEC ID Nº:54).

En otra realización más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno producido por el clon 3D8 (es decir, que incluye una secuencia de la región de la cadena ligera variable idéntica a SEC ID Nº:4 y una secuencia de la región de la cadena pesada variable idéntica a SEC ID Nº:1) es para administración en combinación con un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo producido por el clon 124-152 (es decir, que incluye una secuencia de la región de la cadena ligera variable idéntica a SEC ID Nº:58 y una secuencia de la región de la cadena pesada variable idéntica a SEC ID Nº:54).

En este documento también se describen procedimientos para preparar un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención inmunizando un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humana con una composición que incluye una exotoxina inactivada, y aislar un anticuerpo del animal. La exotoxina puede inactivarse, por ejemplo, mediante tratamiento con UDP-dialdehído o por mutación (por ejemplo, usando procedimientos recombinantes). El procedimiento puede incluir adicionalmente evaluar la unión del anticuerpo a la exotoxina.

En este documento también se describen procedimientos para preparar un anticuerpo monoclonal humano o porción de unión a antígeno del mismo proporcionando un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal humano o porción de unión a antígeno del mismo de la invención y que expresa el ácido nucleico en una célula huésped.

En este documento también se describe un hibridoma o transfectoma que incluye un ácido nucleico que codifica porciones de unión a antígeno (por ejemplo, CDR o regiones variables) del anticuerpo producido por el clon 3D8, 1B11 ó 3H2.

En este documento también se describe un hibridoma o transfectoma que incluye un ácido nucleico que codifica porciones de unión a antígeno (por ejemplo, CDR o regiones variables) del anticuerpo producido por el clon 124-152, 2A11 ó 1G10.

En este documento también se describe un procedimiento para preparar un hibridoma que expresa un anticuerpo de la invención inmunizando un animal no humano transgénico que tiene un genoma que incluye un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana con una composición que incluye la exotoxina, en el que la toxina se inactiva; aislando esplenocitos del animal; generando hibridomas de los esplenocitos; y seleccionando un hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente a la exotoxina.

El tratamiento de seres humanos con anticuerpos monoclonales humanos ofrece varias ventajas. Por ejemplo, es probable que los anticuerpos sean menos inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos no humanos. La terapia es rápida; la inactivación de toxinas puede producirse tan pronto como el anticuerpo llega a los sitios de infección y neutraliza directamente la(s) toxina(s) causante(s) de la enfermedad. Los anticuerpos humanos se localizan en sitios apropiados en seres humanos más eficientemente que los anticuerpos no humanos. Además, el tratamiento es específico para *C. difficile,* y es poco probable que altere la flora intestinal normal, a diferencia de las terapias con antibióticos tradicionales.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La ***Figura 1*** es una tabla que enumera las secuencias de aminoácidos de las cadenas de VH y VL codificadas por secuencias de ARNm de cada clon. Las letras en minúsculas representan aminoácidos en el péptido líder. Las CDR están subrayadas. El clon 3D8, que expresa 6 regiones V de cadenas ligeras únicas, solo expresaron la secuencia de aminoácidos del grupo I.

La ***Figura 2A*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VL expresada por el clon 3D8. Los genes del segmento V y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.

La ***Figura 2B*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VH expresada por el clon 3D8. Los genes del segmento V, del segmento D y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.

La ***Figura 3A*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VL expresada por el clon 1B11. Los genes del segmento V y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.

La ***Figura 3B*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VH expresada por el clon 1B11. Los genes del segmento V, del segmento D y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.

La ***Figura 4A*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VL expresada por el clon 33.3H2 (denominado en este documento 3H2; 33.3H2 y 3H2, se usan indistintamente en este documento). Los genes del segmento V y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos y

de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.

La ***Figura 4B*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VH expresada por el clon 33.3H2. Los genes del segmento V y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.

La ***Figura 5*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de ELISA que midieron la unión de anticuerpos monoclonales anti-toxina A a toxina A.

La ***Figuras 6A-B*** son un conjunto de gráficas que representa los resultados de ensayos de neutralización *in vitro* en presencia y ausencia de anticuerpos monoclonales anti-toxina A. La FIG. 6A representa los resultados de ensayos realizados con células IMR-90. La FIG. 6B representa los resultados de ensayos realizados con células T-84.

La ***Figura 7*** es una representación esquemática del polipéptido de la toxina A que indica fragmentos que se analizaron para estudios de mapeo de epítopes.

La ***Figura 8A-B*** son representaciones esquemáticas de fragmentos de toxina A analizados para estudios de mapeo de epítopes.

La ***Figura 9*** es una tabla que enumera los resultados de ensayos *in vivo* para determinar la protección de ratones de la exposición mortal a toxina A por anticuerpos monoclonales anti-toxina A.

La ***Figura 10*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de acumulación de fluido en el asa ileal de ratón para medir la eficacia de la neutralización de anticuerpos anti-toxina *in vivo.*

La ***Figura 11A*** es un diagrama esquemático del periodo de administración de diversos agentes a hámsteres en un modelo de recaída de hámster.

La ***Figura 11B*** es una gráfica que representa los resultados de los ensayos como el porcentaje de hámsteres que sobreviven a tratamiento con clindamicina seguido de exposición a *C. difficile*.

La ***Figura 12*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de recaída de hámster como el porcentaje de hámsteres que sobreviven al tratamiento con clindamicina seguido de exposición a *C. difficile*.

La ***Figura 13*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos en los que se midió la neutralización *in vitro* de toxina A y toxina B en presencia y ausencia de antisueros policlonales de cabras inmunizadas con toxoide B. “G330” se refiere a muestras en las que se probaron los sueros de la cabra nº 330. “G331” se refiere a muestras en las que se probaron los sueros de la cabra nº 331.

La ***Figura 14*** es un diagrama esquemático del periodo de administración de diversos agentes a hámsteres en un modelo de recaída de hámster.

La ***Figura 15*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de recaída de hámster como el porcentaje de hámsteres que sobreviven al tratamiento con clindamicina seguido de exposición a *C. difficile*. Los hámsteres se trataron con vancomicina, vancomicina y 3D8, vancomicina y antisueros de la cabra nº 331, o vancomicina, 3D8 y antisueros de la cabra nº 331.

La ***Figura 16*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de recaída de hámster como el porcentaje de animales sanos después del tratamiento con clindamicina seguido de exposición a *C. difficile*. “Goa 331” se refiere a antisueros de la cabra nº 331.

La ***Figura 17*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de recaída de hámster como el porcentaje de hámsteres que sobreviven al tratamiento con clindamicina seguido de exposición a *C. difficile*. Los hámsteres se inmunizaron con un fragmento de la toxina B antes del tratamiento con clindamicina. Los hámsteres se trataron con vancomicina, vancomicina y 3D8, o no recibieron tratamiento.

La ***Figura 18*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de recaída de hámster como el porcentaje de animales sanos después de tratamiento con clindamicina seguido de exposición a *C. difficile*. Los hámsteres se inmunizaron con un fragmento de toxina B antes del tratamiento con clindamicina.

La ***Figura 19*** es un diagrama esquemático del periodo de administración de diversos agentes a hámsteres en un modelo de exposición directa a *C. difficile*. “331” se refiere a antisueros de la cabra nº 331. “Clinda” se refiere a tratamiento con clindamicina.

La ***Figura 20*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de exposición directa como el porcentaje de hámsteres que sobreviven a exposición directa a *C. difficile*.

La ***Figura 21*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de exposición directa como el porcentaje de animales sanos después de exposición directa a *C. difficile.*

La ***Figura 22*** es una representación de la secuencia de aminoácidos de toxina A de *C. difficile*.

La ***Figura 23*** es una representación de la secuencia de aminoácidos de toxina B de *C. difficile*.

La ***Figura 24*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de exposición primaria como el porcentaje de hámsteres que sobreviven a exposición directa a *C. difficile*.

La ***Figura 25*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de exposición primaria como el porcentaje de hámsteres que sobreviven a exposición directa a *C. difficile*.

La ***Figura 26*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos de exposición primaria como el porcentaje de hámsteres que sobreviven a exposición directa a *C. difficile*.

La ***Figura 27*** es una gráfica que representa los resultados de ensayos en los que se midió la neutralización *in vitro* de toxina A y toxina B en presencia de anticuerpos monoclonales para toxina B o sueros policlonales de cabra contra toxina B.

La ***Figura 28*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VH expresada por el clon 124-152. Los genes del segmento V, del segmento D y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.

La ***Figura 29*** es una representación de secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la cadena de VL expresada por el clon 124-152. Los genes del segmento V y del segmento J se enumeran encima de las secuencias

de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Las CDR están subrayadas por encima.
La ***Figura 30*** es una representación de la secuencia de aminoácidos y de la línea germinal relacionada de la cadena de VH expresada por el clon 124-152. Los genes del segmento V, del segmento D y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos. Las CDR están subrayadas por encima.
La ***Figura 31*** es una representación de la secuencia de aminoácidos y de la línea germinal relacionada de la cadena de VL expresada por el clon 124-152. Los genes del segmento V y del segmento J se enumeran encima de las secuencias de aminoácidos. Las CDR están subrayadas por encima.
La ***Figura 32*** es una representación esquemática del polipéptido de la toxina B que indica fragmentos que se analizaron para estudios de mapeo de epítopes.

Símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de proporcionar un claro entendimiento de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las siguientes definiciones se proporcionan convenientemente a continuación.

Definiciones

El término "toxina A" se refiere a la proteína de la toxina A codificada por *C. difficile*. La secuencia de aminoácidos de la toxina A de *C. difficile* (SEC ID Nº:41) se proporciona en GenBank® bajo el número de acceso A37052, versión GI 98593 (véase también la Figura 22). "Toxina B" se refiere a la proteína de la toxina B codificada por *C. difficile.* La secuencia de aminoácidos de la toxina B de *C. difficile* (SEC ID Nº: 42) se proporciona en GenBank® bajo el número de acceso S70172, versión GI 7476000 (véase también la Figura 23). "Proteína" se usa indistintamente con "polipéptido".

Un "anticuerpo anti-*C. difficile*" es un anticuerpo que interactúa con (por ejemplo, se une a) una proteína u otro componente producido por bacterias *C. difficile*. Un "anticuerpo anti-toxina" es un anticuerpo que interactúa con una toxina producida por *C. difficile* (por ejemplo, toxina A o toxina B). Un anticuerpo anti-proteína de toxina puede unirse a un epítope, por ejemplo, un epítope conformacional o lineal, o a un fragmento de la proteína de toxina de longitud completa.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos descritos en este documento pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

Un anticuerpo anti-toxina o porción de unión a antígeno del mismo puede administrarse solo o en combinación con un segundo agente. El sujeto puede ser un paciente infectado por *C. difficile* o que tiene un síntoma de enfermedad asociada a *C. difficile* ("CDAD"; por ejemplo, diarrea, colitis, dolor abdominal) o una predisposición hacia enfermedad asociada a *C. difficile* (por ejemplo, que está sometiéndose a tratamiento con antibióticos, o que ha estado sometido a enfermedad asociada a *C. difficile* y en riesgo de recaída de la enfermedad). El tratamiento puede ser para curar, sanar, aliviar, calmar, alterar, remediar, mejorar, paliar o afectar la infección y la enfermedad asociada a la infección, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Una cantidad de un anticuerpo anti-toxina eficaz para tratar una CDAD, o una "cantidad terapéuticamente eficaz", es una cantidad del anticuerpo que es eficaz, tras una administración de dosis únicas o múltiples a un sujeto, en la inhibición de CDAD en un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una a la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. La capacidad de un anticuerpo para inhibir un parámetro medible puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en seres humanos. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo anti-toxina para proteger ratones de la exposición mortal a *C. difficile* puede predecir la eficacia en seres humanos. Otros modelos animales predictivos de la eficacia se describen en este documento, tales como el modelo de ligadura intestinal descrito en los ejemplos. Alternativamente, esta propiedad de un anticuerpo o composición de anticuerpo puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para modular tal modulación *in vitro* por ensayos conocidos para el médico experto. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos de unión tales como ELISA y ensayos de neutralización.

Una cantidad de un anticuerpo anti-toxina eficaz para prevenir un trastorno o una "cantidad profilácticamente eficaz" del anticuerpo es una cantidad que es eficaz, tras una administración de dosis únicas o múltiples al sujeto, en prevenir o retrasar el acontecimiento de la aparición o recaída de CDAD, o inhibir un síntoma del mismo. Sin embargo, si se desean intervalos de tiempo de protección más largos, pueden administrarse dosis elevadas.

Los términos "agonizar", "inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir" o similares, por ejemplo, que denotan diferencias cuantitativas entre dos estados, se refieren a una diferencia, por ejemplo, una diferencia

estadística o clínicamente significativa, entre los dos estados.

Como se usa en este documento, “unión específica” o “se une específicamente a” se refiere a la capacidad de un anticuerpo para: (1) unirse a una toxina de *C. difficile* con una afinidad de al menos 1 x 10^7 M^{-1}, y (2) unirse a una toxina de *C. difficile* con una afinidad que es al menos dos veces superior a su afinidad por un antígeno no específico.

Un “anticuerpo” es una proteína que incluye al menos una o dos regiones variables de las cadenas pesadas (H) (abreviadas en este documento VHC, y al menos una o dos regiones variables de las cadenas ligeras (L) (abreviadas en este documento VLC). Las regiones VHC, y VLC pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas “regiones determinantes de la complementariedad” (“CDR, intercalas con regiones que están más conservadas llamadas “regiones estructurales” (FR). El grado de la región estructural y las CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, publicación NIH nº 91-3242, 1991, y Chothia, C. y col., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Preferentemente, cada VHC y VLC está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino a extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La cadena de VHC o VLC del anticuerpo puede incluir adicionalmente toda o parte de una región constante de las cadenas pesadas o ligeras. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, estando las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina interconectadas por, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de las cadenas pesadas incluye tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de las cadenas ligeras comprende un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos normalmente median en la unión del anticuerpo a tejidos huésped o factores que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico. El término “anticuerpo” incluye inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (además de los subtipos de las mismas), pudiendo ser las cadenas ligeras de la inmunoglobulina de los tipos kappa o lambda.

“Inmunoglobulina” se refiere a una proteína constituida por uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humanos reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 y IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu, además de los genes de la región variable de inmunoglobulina de miríadas. Las “cadenas ligeras” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 KD y 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH_2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las “cadenas pesadas” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 KD y 446 aminoácidos) están similarmente codificadas por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los genes de la región constante anteriormente mencionados, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). El término “inmunoglobulina” incluye una inmunoglobulina que tiene: CDR de una fuente humana o no humana. La región estructural de la inmunoglobulina puede ser humana, humanizada o no humana, por ejemplo, una región estructural murina modificada para disminuir la antigenicidad en seres humanos, o una región estructural sintética, por ejemplo, una secuencia consenso.

Como se usa en este documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG_1) que es codificada por genes de la región constante de las cadenas pesadas.

El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo” o “porción”) como se usa en este documento se refiere a una parte de un anticuerpo que se une específicamente a una toxina de *C. difficile* (por ejemplo, la toxina A), por ejemplo, una molécula en la que una o más cadenas de inmunoglobulina no es de longitud completa, pero que se une específicamente a una toxina. Ejemplos de porciones de unión englobadas dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por los dominios VLC, VHC, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd constituido por los dominios VHC y CH1; (iv) un fragmento Fv constituido por los dominios VLC y VHC de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., Nature 341:544-546,1989) que consiste en un dominio VHC; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada que tiene suficiente región estructural para unirse específicamente, por ejemplo, una porción de unión a antígeno de una región variable. Un porción de unión a antígeno de una región variable de las cadenas ligeras y un porción de unión a antígeno de una región variable de las cadenas pesadas, por ejemplo, los dos dominios del fragmento Fv, VLC y VHC, pueden unirse usando procedimientos recombinantes por un ligador sintético que les permite prepararse como una única cadena de proteínas en la que el par de regiones VLC y VHC para formar moléculas monovalentes (conocidas como una única cadena Fv (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios también están englobados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estas porciones de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia, y las porciones se criban para la utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

El término “anticuerpo monoespecífico” se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y afinidad por una diana particular, por ejemplo, epítope. Este término incluye un “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” que como se usa en este documento se refiere a una preparación de anticuerpos o porciones de los mismos con una única composición molecular.

El término anticuerpo “recombinante” como se usa en este documento se refiere a anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humanos o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica cortar y empalmar secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos recombinantes incluyen anticuerpos humanizados, injertados en CDR, quiméricos, generados *in vitro* (por ejemplo, por expresión en fago), y opcionalmente pueden incluir regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

Como se usa en este documento, el término “sustancialmente idéntico” (o “sustancialmente homólogo”) se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas) a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de forma que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos tengan actividades similares. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y tiene al menos el 50 % de la afinidad del primer anticuerpo.

Los cálculos de “homología” entre dos secuencias se realizan del siguiente modo. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para los fines de comparación). La longitud de una secuencia de referencia alineada para los fines de comparación es al menos el 50 % de la longitud de la secuencia de referencia. Entonces se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Si una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en este documento, “identidad” de aminoácidos o de ácidos nucleicos es equivalente a “homología” de aminoácidos o de ácidos nucleicos). La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que necesita introducirse para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación de la homología en porcentaje entre dos secuencias pueden llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. La homología en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970, que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG usando una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización extendida por hueco de 4 y un hueco de desplazamiento de marco de 5.

Como se usa en este documento, el término “se hibrida bajo condiciones de baja rigurosidad, media rigurosidad, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad” describe condiciones para la hibridación y el lavado. La orientación para realizar las reacciones de hibridación puede encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. 6.3.1-6.3.6, 1989. Los procedimientos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y puede usarse cualquiera. Las condiciones de hibridación específicas citadas en este documento son del siguiente modo: 1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad: 6X cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 ºC, seguido de dos lavados en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS al menos a 50 ºC (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55 ºC para condiciones de baja rigurosidad); 2) condiciones de hibridación de media rigurosidad: 6X SSC a aproximadamente 45 ºC, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 60 ºC; 3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad: 6X SSC a aproximadamente 45 ºC, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 65 ºC; y 4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad: fosfato de sodio 0,5 M, 7 % de SDS a 65 ºC, seguido de uno o más lavados a 0,2X SSC, 1 % de SDS a 65 ºC.

Se entiende que los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos descritos en este documento pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas o no esenciales adicionales que no tienen un efecto sustancial sobre las funciones del polipéptido. Tanto si se tolera como si no una sustitución particular, es decir, no se afectarán adversamente las propiedades biológicas deseadas tales como la actividad de unión, puede determinarse como se describe en Bowie y col., Science, 247:1306-1310, 1990. Una “sustitución de aminoácidos conservativa” es una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la materia. Estos familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas

(por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede alterarse de la secuencia natural de un polipéptido tal como un agente de unión, por ejemplo, un anticuerpo sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido “esencial” produce un cambio tal.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque procedimientos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los procedimientos y los materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones, dominará. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos sólo son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Visión general

C. difficile es una bacteria gram-positiva productora de toxina que produce diarrea y colitis asociada a antibióticos en seres humanos. En este documento se proporcionan anticuerpos y composiciones para el tratamiento y la prevención de enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD). Las composiciones incluyen anticuerpos que reconocen proteínas y otros componentes moleculares (por ejemplo, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos) de bacterias *C. difficile* incluyendo anticuerpos que reconocen toxinas producidas por *C. difficile* (por ejemplo, toxina A y toxina B). En particular se proporcionan anticuerpos monoclonales humanos. En ciertas realizaciones, estos anticuerpos monoclonales humanos se producen en ratones que expresan segmentos de genes de inmunoglobulina humana (descritos más adelante). También se proporcionan combinaciones de anticuerpos anti-toxina.

Los anticuerpos descritos en este documento (y porciones de unión a antígeno de los mismos) que se unen a una toxina de *C. difficile* pueden inhibir CDAD en un sujeto. Por ejemplo, los anticuerpos anti-toxina A monoclonales humanos descritos en este documento pueden neutralizar la toxina A e inhibir la recaída de la enfermedad mediada por *C. difficile*. En otros ejemplos, combinaciones de anticuerpos anti-toxina A (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-toxina A) y anticuerpos anti-toxina B pueden ser para su uso en la inhibición de la enfermedad primaria y reducción de la incidencia de recaída de la enfermedad. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden localizarse en sitios de enfermedad (por ejemplo, el intestino) *in vivo*.

1. Generación de anticuerpos

Inmunógenos

En general, los animales se inmunizan con antígenos expresados por *C. difficile* para producir anticuerpos. Para producir anticuerpos anti-toxina, los animales se inmunizan con toxinas inactivadas, o toxoides. Las toxinas pueden inactivarse, por ejemplo, mediante tratamiento con tratamiento con formaldehído, glutaraldehído, peróxido u oxígeno (véase, por ejemplo, Relyveld y col., Methods in Enzymology, 93:24, 1983; Woodrow y Levine, eds., New Generation Vaccines, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1990). Las toxinas mutantes de *C. difficile* con toxicidad reducida pueden producirse usando procedimientos recombinantes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.085.862; 5.221.618; 5.244.657; 5.332.583; 5.358.868; y 5.433.945). Por ejemplo, pueden prepararse mutantes que contienen deleciones o mutaciones puntuales en el sitio activo de la toxina. Los fragmentos recombinantes de las toxinas pueden usarse como inmunógenos. Otro enfoque es activar la toxina mediante tratamiento con UDP-dialdehído (Genth y col., Inf. and Immum, 68(3):1094-1101, 2000). Este procedimiento preserva la estructura nativa de la toxina más fácilmente que otros tratamientos y, por tanto, puede provocar anticuerpos más reactivos para las toxinas nativas. Este procedimiento también se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

Los anticuerpos anti-toxina que se unen y neutralizan la toxina A pueden interactuar con epítopes específicos de la toxina A. Por ejemplo, un anticuerpo anti-toxina A puede unirse a un epítope en una región del extremo N de la toxina A (por ejemplo, entre los aminoácidos 1-1033 de la toxina A) o una región del extremo C (por ejemplo, entre los aminoácidos 1853-2710 de la toxina A). En un ejemplo, un anticuerpo que se une y neutraliza la toxina A se une a un epítope, dentro de los aminoácidos 1853-2710 de la toxina A.

De manera similar, anticuerpos anti-toxina B pueden reconocer un epítope específico de la toxina B, por ejemplo, un epítope del extremo N o un epítope del extremo C. En un ejemplo, un anticuerpo que se une y neutraliza la toxina B se une a un epítope dentro de los aminoácidos 1777-2366 de la toxina B.

Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones HuMAb

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse de un modo no posible con anticuerpos policlonales. Los antisueros policlonales varían de animal a animal, mientras que las preparaciones monoclonales presentan una especificidad antigénica uniforme. Los sistemas de animales murinos son útiles para generar anticuerpos monoclonales, y los protocolos de inmunización, técnicas para aislar y fusionar esplenocitos y procedimientos y reactivos para producir hibridomas son muy conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante diversas técnicas que incluyen metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica

convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature, 256: 495, 1975. Véase, generalmente, Harlow, E. y Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Aunque estas técnicas convencionales son conocidas, se desea usar anticuerpos humanizados o humanos en vez de anticuerpos murinos para tratar sujetos humanos debido a que los seres humanos organizan una respuesta inmunitaria a anticuerpos de ratones y otras especies. La respuesta inmunitaria a anticuerpos murinos se llama una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón o HAMA (Schroff, R. y col., Cancer Res., 45, 879-885, 1985) y es una afección que produce enfermedad del suero en seres humanos y produce la rápida eliminación de los anticuerpos murinos de la circulación de un individuo. Se ha mostrado que la respuesta inmunitaria en seres humanos es tanto contra las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas murinas. Los anticuerpos monoclonales humanos son más seguros para la administración a seres humanos que los anticuerpos derivados de otros animales y anticuerpos policlonales humanos.

Un tipo útil de animal en el que se generan anticuerpos monoclonales humanos es un ratón transgénico que expresa genes de inmunoglobulina humana en vez de sus propios genes de inmunoglobulina de ratón. Tales ratones transgénicos, por ejemplo, ratones “HuMAb™” contienen minisitios de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humana sin transponer junto con mutaciones elegidas como diana que inactivan los sitios de la cadena μ y κ endógena (véase, por ejemplo, Lonberg, N. y col., Nature 368(6474): 856-859, 1994, y la patente de EE.UU. 5.770.429). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM de ratón o κ y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humana introducidos se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgGκ humana de alta afinidad (Lonberg, N. y col., antes*;* revisado en Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93, 1995, y Harding, F. y Lonberg, N. , Ann. N.Y. Acad. Sci., 764:536-546, 1995).

La preparación de tales ratones transgénicos se describe en más detalle en Taylor, L. y col., Nucleic Acids Research, 20:6287-6295, 1992; Chen, J. y col., International Immunology 5: 647-656, 1993; Tuaillon y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:3720-3724, 1993; Choi y col., Nature Genetics, 4:117-123, 1993; Chen, J. y col., EMBO J.,12: 821-830, 1993; Tuaillon y col., J. Immunol., 152:2912-2920, 1994; Taylor, L. y col., International Immunology, 6: 579-591, 1994; y Fishwild, D. y col., Nature Biotechnology, 14: 845-851, 1996. Véanse además la patente de EE.UU. 5.545.806; la patente de EE.UU. 5.569.825, la patente de EE.UU. 5.625.126, la patente de EE.UU. 5.633.425, la patente de EE.UU. 5.661.016, la patente de EE.UU. 5.770.429, la patente de EE.UU. 5.789.650, la patente de EE.UU. 5.814.318, la patente de EE.UU. 5.874.299 y la patente de EE.UU. 5.877.397, todas de Lonberg y Kay, y las publicaciones PCT nº WO 01/14424, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/122 y WO 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para un antígeno, ratones HuMAb pueden inmunizarse con un inmunógeno como se describe por Lonberg, N. y col., Nature, 368(6474): 856-859, 1994; Fishwild, D. y col., Nature Biotechnology, 14: 845-851, 1996 y el documento WO 98/24884. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad tras la primera inmunización. Por ejemplo, una preparación purificada de toxina A inactivada puede usarse para inmunizar intraperitonealmente los ratones HuMAb. Para generar anticuerpos contra proteínas, lípidos y/o moléculas de hidratos de carbonos de *C. difficile*, los ratones pueden inmunizarse con organismos de *C. difficile* inactivados o no viables.

Los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente intraperitonealmente (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse, por ejemplo, por ELISA o citometría de flujo, y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-toxina pueden usarse para las fusiones. Los ratones pueden reforzarse intravenosamente con antígeno 3 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo. Se espera que puedan necesitar realizarse 2-3 fusiones para cada antígeno. Para cada antígeno se inmunizan normalmente varios ratones.

Los esplenocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con PEG con una línea de células de mieloma de ratón basándose en protocolos convencionales. Entonces, los hibridomas resultantes se criban para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, suspensiones celulares individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionan con un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras de P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50 % de PEG. La células se siembran en placa a aproximadamente $2x10^5$ en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene 20 % de suero de clon fetal, 18 % de medios acondicionado “653”, 5 % de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, L-glutamina 1 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de dos semanas, las células se cultivan en medio en el que el HAT se reemplaza por HT. Los sobrenadantes de pocillos individuales se criban entonces por ELISA para anticuerpos monoclonales de IgM e IgG de células anti-toxina humanas. Los hibridomas secretores de anticuerpo se vuelven a sembrar, se criban de nuevo y, si todavía son positivos para anticuerpos anti-toxina monoclonales de IgG humana, pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Entonces, los subclones estables se cultivan *in vitro* para generar pequeñas

cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para la caracterización.

En una realización, el animal transgénico usado para generar anticuerpos humanos para la toxina contiene al menos una, normalmente 2-10, y algunas veces 25-50 o más copias del transgén descrito en el Ejemplo 12 del documento WO 98/24884 (por ejemplo, pHCl o pHC2) generado con un animal que contiene una única copia de un transgén de cadena ligera descrito en los Ejemplos 5, 6, 8 ó 14 del documento WO 98/24884, y la reproducción de crías con el animal delecionado en J_H descrito en el Ejemplo 10 del documento WO 98/24884. Los animales se reproducen para homocigosidad para cada uno de estos tres rasgos. Tales animales tienen el siguiente genotipo: una única copia (por conjunto haploide de cromosomas) de un minisitio sin transposición de la cadena pesada humana (descrito en el Ejemplo 12 del documento WO 98/24884), una única copia (por conjunto haploide de cromosomas) de una construcción de la cadena ligera K humana transpuesta (descrita en el Ejemplo 14 del documento WO 98/24884) y una deleción en cada sitio de la cadena pesada de ratón endógena que elimina todos los segmentos de J_H funcionales (descrito en el Ejemplo 10 del documento WO 98/24884). Tales animales se crían con ratones que son homocigotos para la deleción de los segmentos J_H (Ejemplo 10 del documento WO 98/24884) para producir crías que son homocigotos para la deleción J_H y hemicigotos para las construcciones de cadena pesada y ligera humana. Los animales resultantes se inyectan con antígenos y se usan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos contra esos antígenos.

Linfocitos B aislados de un animal tal son monoespecíficos con respecto a las cadenas pesadas y ligeras humanas debido a que sólo contienen una única copia de cada gen. Además, serán monoespecíficos con respecto a las cadenas pesadas humanas o de ratón debido a que ambas copias del gen de cadena pesada de ratón endógena son no funcionales en virtud de la deleción que atraviesa la región J_H introducida como se describe en los Ejemplos 9 y 12 del documento WO 98/24884. Además, una fracción sustancial de los linfocitos B será monoespecífica con respecto a las cadenas ligeras humanas o de ratón debido a que la expresión de la única copia de la cadena ligera kappa humana transpuesta excluirá alélicamente e isonormalmente la transposición de los genes de la cadena kappa y lambda de ratón endógena en una fracción significativa de linfocitos B.

En una realización, el ratón transgénico presentará la producción de inmunoglobulina con un repertorio significativo, idealmente sustancialmente similar al de un ratón nativo. Por tanto, por ejemplo, en realizaciones en las que los genes de Ig endógena se han inactivado, los niveles de inmunoglobulina total oscilarán de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml de suero, por ejemplo, 0,5 a 5 mg/ml, o al menos aproximadamente 1,0 mg/ml. Si un transgén que puede efectuar un cambio a una IgG de IgM se ha introducido en el ratón transgénico, la relación de ratón adulto de IgG con respecto a IgM de suero es preferentemente aproximadamente 10:1. La relación de IgG con respecto a IgM será mucho menor en el ratón inmaduro. En general, más de aproximadamente el 10 %, por ejemplo, aproximadamente del 40 al 80 % de los linfocitos B del bazo y del ganglio linfático expresarán exclusivamente proteína de IgG humana.

El repertorio en el ratón transgénico se aproximará idealmente al mostrado en un ratón no transgénico, normalmente al menos aproximadamente el 10 % como mucho, preferentemente del 25 al 50 % o más como mucho. Generalmente se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferentemente 10^4 a 10^6 o más, dependiendo principalmente de número de regiones V, J, y D diferentes introducidas en el genoma del ratón. Normalmente, las inmunoglobulinas presentarán una afinidad por antígenos preseleccionados de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1}, 10^9 M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1} 10^{12} M^{-1}, o mayor, por ejemplo, hasta 10^{13} M^{-1} o mayor.

Los ratones HuMAb pueden producir linfocitos B que se someten a cambio de clase mediante recombinación de cambio de intratransgén (cambio a cis) y expresan inmunoglobulinas reactivas con la toxina. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos de secuencias humanas en los que los polipéptidos de las cadenas pesadas y ligeras están codificados por secuencias de transgenes humanos que pueden incluir secuencias derivadas por mutación somática y uniones combinatorias de la región V, además de secuencias codificadas por la línea germinal. Estas inmunoglobulinas de secuencia humana pueden denominarse en lo sucesivo sustancialmente idénticas a una secuencia de polipéptidos codificada por un segmento del gen VL o VH humano y un segmento del JL o JL humano, aún cuando otras secuencias que no son de la línea germinal puedan estar presentes como resultado de mutación somática y uniones de recombinación V-J y V-D-J diferenciales. Con respecto a tales anticuerpos de secuencia humana, las regiones variables de cada cadena tienen normalmente al menos el 80 por ciento codificado por la línea germinal humana V, J, y, en el caso de cadenas pesadas, D, segmentos de genes. Frecuentemente al menos el 85 por ciento de las regiones variables están codificadas por secuencias de la línea germinal humana presentes en el transgén. Frecuentemente, el 90 o el 95 por ciento o más de las secuencias de la región variable están codificadas por secuencias de la línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, como las secuencias que no son de la línea germinal se introducen por mutación somática y unen VJ y VDJ, los anticuerpos de la secuencia humana tendrán frecuentemente algunas secuencias de la región variable (y menos frecuentemente secuencias de la región constante) que no están codificadas por segmentos de genes V, D o J humanos como se encuentran en el (los) transgén (transgenes) humano(s) en la línea germinal de los ratones. Normalmente, tales secuencias que no son de la línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o próximas a CDR, o en regiones en las que se sabe que se agrupan las mutaciones somáticas.

Los anticuerpos de la secuencia humana que se unen a la toxina pueden resultar de cambio de isotipo de forma que se producen anticuerpos humanos que comprenden una cadena gamma de la secuencia humana (tal como gamma

1, gamma 2 o gamma 3) y una cadena ligera de la secuencia humana (tal como K). Tales anticuerpos de secuencia humana de cambio de isotipo frecuentemente contienen una o más mutaciones somáticas, normalmente en la región variable y frecuentemente en o dentro de aproximadamente 10 residuos de una CDR) como resultado de maduración por afinidad y selección de linfocitos B por antígeno, particularmente posteriormente a la exposición a antígeno secundaria (o posterior). Estos anticuerpos de secuencia humana de alta afinidad tienen afinidades de unión de al menos aproximadamente 1 x 10^9 M^{-1}, normalmente al menos 5 x 10^9 M^{-1}, frecuentemente superiores a 1 x 10^{10} M^{-1}, y algunas veces 5 x 10^{10} M^{-1} a 1 x 10^{11} M^{-1} o mayores.

Los anticuerpos anti-toxina también pueden producirse en otros mamíferos que incluyen ratones no transgénicos, seres humanos, conejos y cabras.

Anticuerpos anti-toxina A

Los anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a la toxina A incluyen anticuerpos producidos por los clones 3D8, 1B11 y 3H2 descritos en este documento. Los anticuerpos con regiones de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que son idénticas al menos el 80 %, o más, a las regiones de la cadena pesada y ligera variable de 3D8, 1B11 y 3H2 también pueden unirse a la toxina A. Los anticuerpos anti-toxina A incluyen las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables de 3D8, 1B11 ó 3H2. Las CDR de las regiones de la cadena pesada variable de estos clones se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadenas pesadas variables

Clon	Cadena	CDR	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº:
3D8	H	CDR1	NYGMH	7
1B11	H	CDR1	SYGMH	10
3H2	H	CDR1	KYGMH	13
3D8	H	CDR2	LIWYDGSNEDYTDSVKG	8
1B11	H	CDR2	VIWASGNKKYYIESVEG	11
3H2	H	CDR2	VIWYDGTNKYYADSMKG	14
3D8	H	CDR3	WGMVRGVIDVFDI	9
1B11	H	CDR3	ANFDY	12
3H2	H	CDR3	DPPTANY	15

Las CDR de las regiones de la cadena ligera variable de estos clones se muestran en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadenas ligeras variables

Clon	Cadena	CDR	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº:
3D8	L	CDR1	RASQGISSWLA	16
1B11	L	CDR1	RASQSVSSYLA	19
3H2	L	CDR1	RASQGISSWLA	22
3D8	L	CDR2	AASSLQS	17
1B11	L	CDR2	DASNRAT	20
3H2	L	CDR2	AASSLQS	23
3D8	L	CDR3	QQANSFPWT	18
1B11	L	CDR3	QQRSNWSQFT	21
3H2	L	CDR3	QQYKSYPVT	24

Las CDR son las porciones de inmunoglobulinas que determinan la especificidad para un antígeno particular.

Los anticuerpos humanos anti-toxina pueden incluir regiones variables que son el producto de, o se derivan de, genes de inmunoglobulina humana específica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden incluir una región de la cadena pesada variable que es el producto de, o se deriva de, un gen VH3-33 humano. Numerosas secuencias para anticuerpos derivados de este gen están disponibles en GenBank® (véase, por ejemplo, nº de acceso: AJ555951, nº GI: 29836865; nº de acceso: AJ556080, nº GI: 29837087; nº de acceso: AJ556038, nº GI: 29837012 y otros segmentos de genes transpuestos VH3-33 humanos proporcionados en GenBank®). Los anticuerpos también pueden incluir o alternativamente incluyen una región de la cadena ligera variable que es el producto de, o se deriva de, un gen Vκ L29 humano (véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank® AJ556049, nº GI: 29837033 para una secuencia parcial de un segmento del gen Vκ L29 humano transpuesto). Como se conoce en la técnica y se describe en esta sección, anteriormente, las regiones variables de inmunoglobulina de anticuerpos recombinados se derivan mediante un procedimiento de recombinación *in vivo* en el que la variabilidad se introduce a segmentos genómicos que codifican las regiones. Por consiguiente, regiones variables derivadas de un gen VH-33 o Vκ L19 humano pueden incluir nucleótidos que son diferentes de aquellos hallados en el gen en tejidos no linfoides. Estas diferencias de nucleótidos se concentran normalmente en las CDR.

Anticuerpos anti-toxina B

Los anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a la toxina B incluyen anticuerpos producidos por los clones 124-152, 2A11 y 1G10 descritos en este documento. Los anticuerpos con regiones de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable que son idénticas al menos el 80 %, o más, a las regiones variables de la cadena pesada y ligera de -152, 2A11 y 1G10 también pueden unirse a la toxina B. En realizaciones relacionadas, los anticuerpos anti-toxina B incluyen, por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadenas pesadas variables y/o cadenas ligeras variables de -152, 2A11 ó 1G10. Las CDR de las regiones de cadenas pesadas variables de estos clones se muestran en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadenas pesadas variables

Clon	Cadena	CDR	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº: (a.a.)	SEC ID Nº: (n.t.)
124-152	H	CDR1	SYWIG	62	63
124-152	H	CDR2	IFYPGDSSTRYSPSFQG	64	65
124-152	H	CDR3	RRNWGNAFDI	66	67

Las CDR de las regiones de cadenas ligeras variables de estos clones se muestran en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadenas ligeras variables

Clon	Cadena	CDR	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº: (a.a.)	SEC ID Nº: (n.t.)
124-152	L	CDR1	RASQSVSSSYLAW	68	69
124-152	L	CDR2	GASSRAT	70	71
124-152	L	CDR3	QQYGSSTWT	72	73

Las CDR son las porciones de inmunoglobulinas que determinan la especificidad para un antígeno particular. En ciertas realizaciones, las CDR correspondientes a las CDR en las Tablas 3 y 4 que tienen variaciones de secuencias (por ejemplo, sustituciones conservativas) pueden unirse a la toxina B. Por ejemplo, las CDR en las que 1, 2, 3, 4 ó 5 residuos, menos del 20 % de los residuos totales en la CDR, están sustituidos o delecionados pueden estar presentes en un anticuerpo (o porción de unión a antígeno del mismo) que se une a la toxina B.

Los anticuerpos humanos anti-toxina B pueden incluir regiones variables que son el producto de, o se derivan de, genes humanos específicos de inmunoglobulina (véanse las Figs. 28-31). Por ejemplo, los anticuerpos pueden incluir una región de cadenas pesadas variables que es el producto de, o se deriva de, un gen VH 5-51 humano. Los anticuerpos también pueden incluir o alternativamente incluyen una región de cadenas ligeras variables que es el producto de, o se deriva de, un gen Vκ A27 humano y/o gen JK1. Como se conoce en la técnica y se describe en esta sección, anteriormente, las regiones variables de inmunoglobulina de anticuerpos recombinados se derivan mediante un procedimiento de recombinación *in vivo* en el que la variabilidad se introduce a segmentos genómicos que codifican las regiones. Por consiguiente, las regiones variables se derivan de un gen VH-5-51 o Vκ A27/JK1 humano que puede incluir nucleótidos que son diferentes de aquellos en el gen encontrado en tejidos no linfoides. Estas diferencias de nucleótidos se concentran normalmente en las CDR.

2. Producción y modificación de anticuerpos

Muchas formas diferentes de anticuerpos anti-toxina pueden ser útiles en la inhibición de CDAD. Los anticuerpos pueden ser de los diversos isotipos, que incluyen: IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE). Preferentemente, el anticuerpo es un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1. Las moléculas de anticuerpo pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden incluir sólo un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, $F(ab')_2$, Fv o Fv de una sola cadena). Éstos incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, además de porciones de unión a antígeno de los anteriores.

Los anticuerpos anti-toxina o porciones de los mismos útiles en la presente invención también pueden ser anticuerpos recombinantes producidos por células huésped transformadas con ADN que codifica cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas de un anticuerpo deseado. Los anticuerpos recombinantes pueden producirse por técnicas de ingeniería genética conocidas. Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes pueden producirse clonando una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, un ADNc o ADN genómico que codifica las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas del anticuerpo deseado. La secuencia de nucleótidos que codifica aquellos polipéptidos se inserta luego en un vector de expresión de manera que ambos genes estén operativamente ligados a sus propias secuencias de control de la expresión transcripcional y transduccional. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la expresión de la célula huésped usada. Normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Pueden usarse células huésped procariotas o eucariotas.

Se prefiere la expresión en células huésped eucariotas debido a que es más probable que tales células se ensamblen y secreten un anticuerpo activo adecuadamente plegado e inmunológicamente activo que las células procariotas. Sin embargo, cualquier anticuerpo producido que es inactivo debido a un plegamiento inapropiado puede renaturalizarse según procedimientos muy conocidos (Kim y Baldwin, Ann. Rev. Biochem., 51:459-89, 1982). Es posible que las células huésped produzcan porciones de anticuerpos intactos tales como dímeros de cadena ligera o dímeros de cadena pesada que también son homólogos de anticuerpos según la presente invención.

Los anticuerpos descritos en este documento también pueden producirse en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección de genes como es muy conocido en la técnica (Morrison, S., Science, 229:1202,1985). Por ejemplo, en una realización, el (los) gen(es) de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos humanos, puede(n) ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como se usa en un sistema de expresión de genes de GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841, o en otros sistemas de expresión muy conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpos clonados puede introducirse en células huésped eucariotas tales como células CHO o células NSO o alternativamente otras células eucariotas como células derivadas de plantas, hongos o células de levadura. El procedimiento usado para introducir estos genes puede ser cualquier procedimiento descrito en la materia tal como electroporación, lipofectina, lipofectamina o transfección balística en el que las células son bombardeadas con micropartículas que llevan el ADN de interés (Rodin, y col. Immunol. Lett., 74(3):197-200, 2000). Después de introducir estos genes de anticuerpo en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que entonces pueden amplificarse para su nivel de expresión y escalado para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse de estos sobrenadantes de cultivo y/o células usando técnicas convencionales.

Se entenderá que variaciones en los procedimientos anteriores son útiles en la presente invención. Por ejemplo, puede desearse transformar una célula huésped con ADN que codifica tanto la cadena ligera como la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para eliminar algo o todo el ADN que codifica tanto una como ambas de las cadenas ligera y pesada que no son necesarias para la unión, por ejemplo, la región constante puede modificarse, por ejemplo, delecionando aminoácidos específicos. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas son útiles en los procedimientos descritos en este documento. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera se unen a una toxina, y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de la toxina, u otro epítope de la toxina.

Los anticuerpos quiméricos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal murino (u otra especie) se digiere con enzimas de restricción para eliminar la región que codifica la Fc murina, y se sustituye la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana (véanse Robinson y col., solicitud de patente internacional PCT/US86/02269; Akira, y col., solicitud de patente europea 184, 187; Taniguchi, M., solicitud de patente europea 171,496; Morrison y col., solicitud de patente europea 173,494; Neuberger y col., solicitud internacional WO 86/01533; Cabilly y col., patente de EE.UU. 4,816,567; Cabilly y col., solicitud de patente europea 125,023; Better y col. (1988 Science, 240:1041-1043); Liu y col. (1987) PNAS, 84:3439-3443; Liu y col., 1987, J. Immunol., 139:3521-3526; Sun y col. (1987) PNAS 84:214-218; Nishimura y col., 1987, Canc. Res., 47:999-1005; Wood y col. (1985) Nature, 314:446-449; y Shaw y col., 1988, J. Natl. Cancer Inst., 80:1553-1559). Los anticuerpos quiméricos también puede crearse por técnicas de ADN recombinante en las que el ADN que codifica regiones V murinas puede ligarse a ADN que codifica las regiones constantes humanas.

Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina pueden humanizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez se obtienen los anticuerpos murinos, las regiones variables pueden secuenciarse. Puede determinarse la localización de las CDR y los residuos de la región estructural (véase, Kabat, E.A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de salud y de servicios humanos de Estados Unidos, publicación NIH nº 91-3242, y Chothia, C. y col. (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917). Las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas pueden ligarse opcionalmente a regiones constantes correspondientes. De hecho, se entiende que cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento, que incluye anticuerpos completamente humanos, puede alterarse (por ejemplo, por mutación, sustitución) para contener una región constante sustituta, por ejemplo, región Fc, o porción (porciones) de la misma para lograr, por ejemplo, una estructura de anticuerpo deseada, función (por ejemplo, función efectora), subtipo, alotipo, subclase o similares. Los anticuerpos anti-toxina pueden secuenciarse usando técnicas reconocidas en la técnicas. Las moléculas de anticuerpo injertadas en CDR o las inmunoglobulinas pueden producirse por injerto en CDR o sustitución de CDR en la que pueden sustituirse una, dos o todas las CDR de una cadena de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.225.539; Jones y col., 1986, Nature, 321:552-525; Verhoeyan y col., 1988, Science, 239:1534; Beidler y col., 1988, J. Immunol., 141:4053-4060; y Winter, patente de EE.UU. 5.225.539.

Winter describe un procedimiento de injerto en CDR que puede usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención (solicitud de patente de RU GB 2188638A presentada el 26 de marzo de 1987; Winter, patente de EE.UU. 5.225.539). Por ejemplo, todas las CDR de un anticuerpo particular pueden sustituirse con al menos una parte de una CDR humana (por ejemplo, una CDR del clon 3D8 como se muestra en la Tablas 1 y 2 y/o clon 124-152 como se muestra en la Tablas 3 y 4, anteriormente) o sólo pueden sustituirse algunas de las CDR. Solo es necesario sustituir el número de CDR requerido para la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado (por ejemplo, una exotoxina de *C. difficile*).

Los anticuerpos humanizados pueden generarse reemplazando secuencias de la región variable Fv que no participan directamente en la unión a antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Los procedimientos generales para generar anticuerpos humanizados se proporcionan por Morrison, S. L., 1985, Science, 229:1202-1207, por Oi y col., 1986, Biotechniques, 4:214, y por Queen y col., patente de EE.UU. 5.585.089, patente de EE.UU. 5.693.761 y patente de EE.UU. 5.693.762. Aquellos procedimientos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican toda o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de tal ácido nucleico son muy conocidas para aquellos expertos en la materia y, por ejemplo, pueden obtenerse de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada como se ha descrito anteriormente. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o fragmento del mismo, puede entonces clonarse en un vector de expresión apropiado. Otras técnicas para humanizar anticuerpos se describen en Padlan y col., documento EP 519596 A1 publicado el 23 de diciembre de 1992.

También están dentro del alcance de la invención anticuerpos en los que aminoácidos específicos han sido sustituidos, delecionados o añadidos. En particular, anticuerpos preferidos tienen sustituciones de aminoácidos en la región estructural tales como para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, un pequeño número seleccionado de residuos de región estructural aceptora de la cadena de inmunoglobulina puede sustituirse con los aminoácidos donantes correspondientes. Las localizaciones preferidas de las sustituciones incluyen residuos de aminoácidos adyacentes a la CDR o que pueden interaccionar con una CDR (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.585.089). Los criterios para seleccionar aminoácidos del donante se describen en la patente de EE.UU. 5.585.089 (por ejemplo, columnas 12-16). La región estructural aceptora puede ser una secuencia de región estructural humana de anticuerpo maduro o una secuencia consenso.

Una “secuencia consenso” es una secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se producen más frecuentemente en una familia de secuencias relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que entonces se produce más frecuentemente en la posición en la familia. Si dos aminoácidos se producen con igual frecuencia, cualquiera de los dos puede incluirse en la secuencia consenso. Una “región estructural consenso” de una inmunoglobulina se refiere a una región estructural en la secuencia consenso de la inmunoglobulina.

Un anticuerpo anti-toxina, o porción de unión a antígeno del mismo, puede derivatizarse o ligarse a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, un anticuerpo puede ligarse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o varias entidades moleculares tales como otro anticuerpo, un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una marca de polihistidina).

Un tipo de proteína derivatizada se produce reticulando dos o más proteínas (del mismo tipo o de diferentes tipos). Reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales que tienen dos grupos reactivos distintos separados por un separador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales ligadores están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Agentes detectables útiles con los que una proteína puede derivatizarse (o marcarse) incluyen compuestos fluorescentes, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Agentes detectables fluorescentes a modo de ejemplo incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina y ficoeritrina. Una proteína o anticuerpo también puede derivatizarse con enzima detectable tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucosa-oxidasa y similares. Si una proteína se derivatiza con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, si el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado que es detectable. Una proteína también puede derivatizarse con un grupo prostético (por ejemplo, estreptavidina/biotina y avidina/biotina). Por ejemplo, un anticuerpo puede derivatizarse con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina.

Pueden usarse proteínas y anticuerpos marcados, por ejemplo, diagnósticamente y/o experimentalmente en varios contextos que incluyen (i) aislar un antígeno predeterminado por técnicas convencionales tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación; y (ii) detectar un antígeno predeterminado (por ejemplo, una toxina, por ejemplo, en un lisado celular o una muestra de paciente) con el fin de monitorizar niveles de proteínas en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento dada.

Un anticuerpo anti-toxina o fragmento de unión a antígeno del mismo puede conjugarse con otra entidad molecular tal como una marca.

3. Procedimientos de cribado

Los anticuerpos anti-toxina pueden caracterizarse para la unión a la toxina mediante diversas técnicas conocidas. Los anticuerpos se caracterizan primero normalmente por ELISA. Brevemente, placas de microtitulación pueden recubrirse con el antígeno de toxina o de toxoide en PBS y luego bloquearse con proteínas irrelevantes tales como albúmina de suero bovino (BSA) diluida en PBS. Las diluciones de plasma de ratones inmunizados con toxina se añaden a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 ºC. Las placas se lavan con PBS/Tween 20 y luego se incuban con un reactivo policlonal de cabra específico de Fc dirigido contra IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 ºC. Después de lavar, las placas se revelan con sustrato ABTS y se analizan a DO de 405. Preferentemente, los ratones que desarrollan los mayores títulos se usarán para fusiones.

Un ensayo de ELISA como se ha descrito anteriormente puede usarse para cribar anticuerpos y, por tanto, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con la toxina. Los hibridomas que producen anticuerpos que se unen, preferentemente con alta afinidad, a la toxina pueden entonces subclonarse y caracterizarse adicionalmente. Un clon de cada hibridoma que retiene la reactividad de las células parentales (por ELISA) puede entonces elegirse para preparar un banco de células y para la purificación de anticuerpos.

Para la pureza de los anticuerpos anti-toxina, el hibridoma seleccionado puede cultivarse en botellas rotatorias, matraces con agitación centrífuga de dos litros u otros sistemas de cultivo. Los sobrenadantes pueden alterarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.) para la pureza de la proteína. Después del intercambio de tampón a PBS, la concentración puede determinarse por procedimientos espectrofotométricos.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados se unen a epítopes únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, III). La unión de MAb biotinilados puede detectarse con una zona marcada con estreptavidina. Los anticuerpos anti-toxina pueden probarse adicionalmente para la reactividad con la toxina por transferencia Western.

Otros ensayos para medir la actividad de los anticuerpos anti-toxina incluyen ensayos de neutralización. Los ensayos de neutralización *in vitro* pueden medir la capacidad de un anticuerpo para inhibir un efecto citopático sobre células en cultivo (véase el Ejemplo 3, más adelante). Los ensayos *in vivo* para medir la neutralización de toxina se describen en los Ejemplos 5, 6 y 7, más adelante.

4. Composiciones farmacéuticas y kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen una molécula de anticuerpo descrita en este documento o porción de unión a antígeno del mismo de la presente invención que se une específicamente y neutraliza toxina A de *C. difficile* formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

"Vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Los vehículos pueden ser adecuados para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, rectal, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

Las composiciones de la presente invención pueden estar en diversas formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables

e infusibles), dispersiones o suspensiones, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Composiciones útiles están en forma de disoluciones inyectables o infusibles. Un modo útil de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Por ejemplo, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser para administración por infusión o inyección intravenosa. En otra realización, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo es para administración por inyección intramuscular o subcutánea.

Los términos “administración parenteral” y “administrado parenteralmente” como se usan en este documento significan modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada para alta concentración de anticuerpos. Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (es decir, el anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación útiles son secado a vacío y liofilización que da un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez apropiada de una disolución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo descritas en este documento pueden ser para administración mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, y para su uso en muchas aplicaciones terapéuticas. Como será apreciado por el experto, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo del mismo puede ser para administración por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros componentes, si se desea) también pueden encerrarse en una cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención por administración distinta de parenteral puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica.

Las pautas de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas durante el tiempo, o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La memoria descriptiva para las formas de dosificación unitarias de la invención son dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la materia del mezclado por incorporación de un compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante a modo de ejemplo para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,1-60 mg/kg, por ejemplo, 0,5-25 mg/kg, 1-2 mg/kg o 0,75-10 mg/kg. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, pautas de dosificación específicas deberán ajustarse con el tiempo según las necesidades del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en este documento solo son a modo de ejemplo y no pretenden limitar ni el alcance ni la práctica de la composición reivindicada.

También están dentro del alcance de la invención kits que incluyen el anticuerpo anti-toxina A de la presente invención o porción de unión a antígeno del mismo. Los kits pueden incluir uno o varios elementos que incluyen: instrucciones para su uso; otros reactivos, por ejemplo, una marca, un agente terapéutico o un agente útil para quelar, o de otro modo acoplar, un anticuerpo a una marca o agente terapéutico, u otros materiales para preparar el

anticuerpo para su administración; vehículos farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para la administración a un sujeto.

Las diversas combinaciones de anticuerpos pueden envasarse juntas. Por ejemplo, un kit puede incluir anticuerpos que incluyen las regiones de cadenas pesadas y ligeras variables de anticuerpos 3D8) y que se unen a la toxina B (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-toxina B humanos, por ejemplo, 124-152, 2A11 y/o 1G10, o antisueros policlonales reactivos con la toxina B). Los anticuerpos pueden mezclarse juntos, o envasarse por separado dentro del kit.

Las instrucciones para su uso pueden incluir instrucciones para aplicación terapéutica que incluyen dosificaciones sugeridas y/o modos de administración, por ejemplo, en un paciente con un síntoma de CDAD. Otras instrucciones pueden incluir instrucciones sobre el acoplamiento del anticuerpo a un quelante, una marca o un agente terapéutico, o para la purificación de un anticuerpo conjugado, por ejemplo, de componentes de conjugación sin reaccionar.

El kit puede incluir una marca detectable, un agente terapéutico y/o un reactivo útil para quelar o de otro modo acoplar una marca o agente terapéutico al anticuerpo. Los agentes de acoplamiento incluyen agentes tales como N-hidroxisuccinimida (NHS). En tales casos, el kit puede incluir uno o más de un recipiente de reacción para llevar a cabo la reacción o un dispositivo de separación, por ejemplo, una columna cromatográfica para su uso en la separación del producto final a partir de materiales de partida o productos intermedios de reacción.

El kit puede contener adicionalmente al menos un reactivo adicional tal como un agente de diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, un agente de diagnóstico o terapéutico como se describe en este documento y/o uno o más anticuerpos anti-toxina o anti-*C. difficile* adicionales (o porciones de los mismos), formulados según sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

Otros kits pueden incluir ácidos nucleicos optimizados que codifican anticuerpos anti-toxina e instrucciones para la expresión de los ácidos nucleicos.

5. Procedimientos y composiciones terapéuticas

Las nuevas proteínas y anticuerpos tienen utilidades terapéuticas, profilácticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplos, estos anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo.* Los anticuerpos también puede ser para su uso *in vivo*, para tratar, inhibir, prevenir recaída y/o diagnóstico de *C. difficile* en un sujeto y enfermedad asociada a *C. difficile.*

Como se usa en este documento, el término “sujeto” pretende incluir animales humanos y no humanos. El término “animales no humanos” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos tales como primates no humanos, pollos, ratones, perros, gatos, cerdos, vacas y caballos.

Las proteínas y anticuerpos pueden usarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo.* Por ejemplo, las células pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y la etapa de poner en contacto puede efectuarse añadiendo el anticuerpo anti-toxina o fragmento del mismo al medio de cultivo. Los procedimientos pueden realizarse en viriones o células presentes en un sujeto como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). Si los anticuerpos son para su uso *in vivo,* la etapa de poner en contacto se efectúa en un sujeto e incluye administrar un anticuerpo anti-toxina o porción del mismo al sujeto en condiciones eficaces para permitir la unión del anticuerpo, o porción, a cualquier toxina expresada por bacterias en el sujeto, por ejemplo, en el intestino.

Se describen en este documento procedimientos de administrar moléculas de anticuerpo. Dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y del peso del sujeto y el fármaco particular usado. Las moléculas de anticuerpo pueden usarse como agentes competitivos para la unión de ligandos para inhibir o reducir una interacción no deseable, por ejemplo, para inhibir la unión de toxinas al epitelio gastrointestinal.

Los anticuerpos anti-toxina (o porciones de unión a antígeno de los mismos) pueden ser para administración en combinación con otro anticuerpos anti-*C. difficile* (por ejemplo, otros anticuerpos monoclonales, gamma-globulina policlonal). El anticuerpo anti-toxina A o porción de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede combinarse con un anticuerpo anti-toxina B o porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-toxina A puede ser 3D8, un anticuerpo que incluye las regiones variables de 3D8 o un anticuerpo con las CDR de 308 y regiones variables idénticas al menos el 90 % a las regiones variables de 3D8. El anticuerpo anti-toxina B puede ser 124-152, 2A11, 1G10 o un anticuerpo con regiones variables idénticas al menos el 90 % a las regiones variables de los anteriores, por ejemplo, 124-152. Las combinaciones de anticuerpos anti-toxina A (por ejemplo, 3D8) y anti-toxina B (por ejemplo, 124-152) puede proporcionar una inhibición potente de CDAD.

Se entiende que cualquiera de los agentes descritos en este documento, por ejemplo, anticuerpos anti-toxina A o anti-toxina B, o fragmentos de los mismos, pueden combinarse, por ejemplo, en diferentes relaciones o cantidades para mejorar el efecto terapéutico. De hecho, los agentes pueden formularse como una mezcla, o químicamente o genéticamente ligados usando técnicas reconocidas en la técnica, resultados mediante estas anticuerpos covalentemente ligados (o fragmentos de anticuerpos covalentemente ligados) que tiene tanto propiedades de unión a anti-toxina A como a anti-toxina B. La formulación combinada puede guiarse por una determinación de uno o más

parámetros tales como la afinidad, avidez o eficacia biológica del agente solo o en combinación con otro agente. Los agentes descritos en este documento también pueden ser para administración en combinación con otros agentes que potencian el acceso, la semivida o la estabilidad del agente terapéutico en la elección como diana, purificación y/o secuestro de *C. difficile* o un antígeno de la misma.

Tales terapias de combinación son preferentemente aditivas e incluso sinérgicas en su actividad terapéutica, por ejemplo, en la inhibición, prevención (por ejemplo, de recaída) y/o tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con *C. difficile* (véase, por ejemplo, el Ejemplo 16 que muestra la eficacia de terapias de anticuerpos individuales y combinadas). La administración de tales terapias de combinación puede disminuir la dosificación del agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo o mezcla de fragmentos de anticuerpo, o anticuerpo biespecífico reticulado o genéticamente hibridado o fragmento de anticuerpo) necesario para lograr el efecto deseado.

Se describen en este documento composiciones inmunogénicas que contienen una cantidad inmunógenicamente eficaz de una toxina, o fragmentos de la misma, y pueden usarse en la generación de anticuerpos anti-toxina. Los epítopes inmunogénicos en una secuencia de toxina pueden identificarse según procedimientos conocidos en la técnica, y proteínas o fragmentos que contienen aquellos epítopes pueden administrarse por diversos medios en una composición de vacuna. Las composiciones adecuadas pueden incluir, por ejemplo, lipopéptidos (por ejemplo, Vitiello y col., J. Clin. Invest. 95:341 (1995)), composiciones de péptido encapsuladas en microesferas de poli(DL-lactida-co-glicolida) ("PLG") (véase, por ejemplo, Eldridge y col., Molec. Immunol. 28:287-94 (1991); Alonso y col., Vaccine 12:299-306 (1994); Jones y col., Vaccine 13:675-81 (1995)), composiciones de péptidos contenidas en complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (véase, por ejemplo, Takahashi y col., Nature 344:873-75 (1990); Hu y col., Clin. Exp. Immunol. 113:235-43 (1998)) y sistemas de péptidos de múltiples antígenos (MAP) (véase, por ejemplo, Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5409-13 (1988); Tam, J. Immunol. Methods 196:17-32 (1996)).

Vehículos útiles que pueden usarse con composiciones inmunogénicas de la invención son muy conocidos e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas tales como albúmina de suero humano, toxoide tetánico, poliaminoácidos tales como poli L-lisina, ácido poli-L-glutámico, proteína de la gripe, del núcleo del virus de la hepatitis B y similares. Las composiciones pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable (es decir, aceptable) tal como agua o solución salina, normalmente solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones y vacunas también incluyen normalmente un adyuvante. Adyuvantes tales como adyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre son ejemplos de materiales muy conocidos en la técnica. Adicionalmente, las respuestas a CTL pueden cebarse conjugando toxinas (o fragmentos, derivados inactivos o análogos de las mismas) con lípidos tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P_3CSS).

Los anticuerpos anti-toxina pueden ser para administración en combinación con otros agentes tales como composiciones para tratar CDAD. Por ejemplo, agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con anticuerpos anti-toxina incluyen antibióticos usados para tratar CDAD tales como vancomicina, metronidazol o bacitracina. Los anticuerpos pueden ser para su uso en combinación con agentes probióticos tales como *Saccharomyces boulardii.* Los anticuerpos también pueden ser para administración en combinaciones con una vacuna de *C. difficile*, por ejemplo, una vacuna de toxoide.

6. Otros procedimientos

Un anticuerpo anti-toxina (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) puede usarse para aislar toxinas por técnicas convencionales tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, un anticuerpo anti-toxina puede usarse para detectar la toxina (por ejemplo, en una muestra de heces), por ejemplo, para cribar muestras para la presencia de *C. difficile.* Los anticuerpos anti-toxina pueden usarse diagnósticamente para monitorizar niveles de la toxina en tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para, por ejemplo, determinar la eficacia de una pauta de tratamiento dada.

Ejemplificación

En todos los ejemplos se usaron los siguientes materiales y procedimientos, a menos que se establezca de otro modo.

Materiales y procedimientos

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas convencionales en la preparación de polipéptidos. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y col., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons (1992).

EJEMPLOS

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos monoclonales anti-toxina A

La toxina A de *C. difficile* se obtuvo tanto de Techlab, Inc. (Blacksburg, Va) como por producción recombinante. La toxina se purificó y se inactivó antes de la inmunización. La inactivación se realizó mediante tratamiento con UDP-dialdehído reactivo que produce la alquilación de residuos catalíticos a la vez que preserva la estructura de toxinas nativas. Para el protocolo detallado véase Genth y col., Inf and Immun. 68(3):1094-1101, 2000. Brevemente, la toxina A purificada se incubó con UDP-2',3'-dialdehído (0,1-1,0 mM) en tampón durante 18 horas a 37 ºC, se filtró a través de un filtro de 100 kDa de corte para eliminar el UDP-2',3'-dialdehído sin reaccionar y se lavó con tampón. La toxina A inactivada (toxoide A) se usó para la inmunización.

Ratones transgénicos HCo7, generados como se ha descrito anteriormente en la sección titulada “Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones HuMAb” y suministrados por Medarex, Milpitas, CA, se inmunizaron intraperitonealmente 6-12 veces cada uno con 10 µg de toxoide en adyuvante RIBI. En los ratones transgénicos HCo7, el gen de la cadena ligera kappa de ratón endógena se ha alterado homocigóticamente como se describe en Chen y col. (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen de la cadena pesada de ratón endógena se ha alterado homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Los ratones transgénicos HCo7 llevan un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild y col., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, y el transgén de la cadena pesada humana de HCo7 como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. El suero se recogió de cada ratón y se sometió a ensayo para determinar la reactividad para la toxina A por ELISA y la neutralización de citotoxicidad en células IMR-90. A los ratones que dieron positivo para el antisuero reactivo para la toxina A y neutralizante se les inyectaron 5-10 µg de toxoide A mediante la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron y los bazos se aislaron para la fusión con hibridomas aproximadamente 3 días después de realizarse la inyección en la vena de la cola.

Se generaron hibridomas clónicos y se cribaron por ELISA. Los porcentajes de los clones positivos para la cadena ligera kappa/gamma, específicos para antígeno y neutralizantes identificados cribando clones generados a partir de cuatro fusiones de hibridomas separadas se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5

Fusión	% de positivos para kappa/gamma	% de específicos para antígeno	% de neutralizantes
1	5,7 (94/1632)	3,4 (56/1632)	0,7 (12/1632)
2	0,2 (1/384)	0 (0/384)	0 (0/384)
3		1,8 (14/768)	0,39 (3/768)
4		4,4 (43/960)	1,7 (17/960)

Se seleccionaron tres clones de hibridomas para el posterior análisis: 3D8, 1B11 y 33.3H2. Los ADNc de cada clon se amplificaron por RT-PCR a partir de ARNm, se clonaron y se secuenciaron. Se encontró una secuencia consenso de la región V de la cadena pesada para cada clon. Los tres clones usaron una región VH derivada del mismo gen de la región V de la línea germinal (VH 3-33), pero se usaron secuencias de J diferentes. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de cada clon se muestran en la Figura 1 (SEC ID Nº: 1-6). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas por encima en la figura.

El análisis de secuencias de los genes V kappa (de la cadena ligera Vκ) revelaron que el HuMAb 1B11 y 33.3H2 expresan cada uno una secuencia consenso de V de la cadena kappa. El hibridoma 1B11 expresó una cadena ligera de Vκ derivada del gen de la línea germinal Vκ L6, mientras que el hibridoma 33.3H2 expresa una cadena ligera de Vκ derivada del gen de la línea germinal Vκ L15. Tras el análisis de los clones de Vκ del HuMAb 3D8, 6 (I-VI) cadenas ligeras se expresaron al nivel de ARNm (Figura 1). Para determinar cuáles de las cadenas ligeras se expresaron al nivel de proteínas se realizaron espectroscopía de masas y secuenciación del extremo N del anticuerpo 3D8 purificado. Cuando las cadenas ligeras se aislaron de la proteína celular y se analizaron por espectroscopía de masas se observó una única cadena ligera con una masa de 23.569 Dalton. Esto se correspondió con la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos del grupo I representada en la Figura 1 que se deriva del gen de la línea germinal Vκ L19. La secuenciación de la cadena ligera del extremo N confirmó este resultado. Las Figuras 2A, 3A y 4A representan el nucleótido y las secuencias de aminoácidos de la Vκ de cada 3D8 (grupo I; SEC ID Nº: 4, y 30-34), 1B11 (SEC ID Nº: 5) y 33.3H2 (SEC ID Nº:6), respectivamente. Las CDR están subrayadas por encima y se muestran Vκ y Jκ de la línea germinal.

Por tanto, el anticuerpo 3D8 comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen VH 3-33 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen Vκ L19 humano. El anticuerpo 1B11 comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen VH 3-33 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen Vκ L6 humano. El anticuerpo 33.3H2 comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen VH 3-33 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen Vκ L15 humano.

Los anticuerpos 3D8 y 1B11 expresan regiones constantes de IgG1 humana y el anticuerpo 33.3H2 expresa regiones constantes de IgG3 humana. Los anticuerpos descritos en los Ejemplos 2-7 se aislaron de estos hibridomas y, por tanto, expresan las secuencias variables mostradas en la Figura 1 junto con regiones constantes humanas. El ADN que codifica la porción de unión a antígeno de cada clon se clonó en un vector para expresarse como un anticuerpo humano para su administración a seres humanos.

Ejemplo 2. Actividad de unión de anticuerpos anti-toxina A

La unión de cada anticuerpo a la toxina A se determinó por ELISA usando técnicas convencionales. Los resultados de este ensayo se representan en la Figura 5. Los anticuerpos producidos por 3D8, 1B11 y 33.3H2 se compararon con un cuarto anticuerpo monoclonal humano con actividad de unión de toxina A, 8E6. La Figura 5 muestra que los anticuerpos se unen a la toxina A con afinidades comparables.

La afinidad de los anticuerpos 3D8 y 1B11 por la toxina A también se midió con el instrumento Biacore® que detecta interacciones de unión biomolecular con tecnología de resonancia de plasmones superficiales. Cada anticuerpo se añadió a chips sensores recubiertos de proteína A y se dejó que la toxina A fluyera sobre el chip para medir la unión. 3D8 tuvo una K_D de 14,6 x 10^{-10}M. 1B11 tuvo una K_D de 7,38 x 10^{-10}M. Por tanto, los anticuerpos se unen con alta afinidad a la toxina A. Estas constantes de unión indican que los anticuerpos tienen afinidades adecuadas para su uso en terapia humana.

Ejemplo 3. Neutralización de toxinas por anticuerpos anti-toxina A

Los anticuerpos expresados por los hibridomas 1B11, 3D8 y 33.3H2 se sometieron a ensayo para determinar la actividad de neutralización de la toxina A *in vitro.* Las células se incubaron en presencia de concentraciones variables de la toxina A que hace que las células se redondeen y pierdan la adherencia a las placas de cultivo celular. El efecto citopático (CPE) se determinó por inspección visual de las células. Se determinó una puntuación CPE de 0-4 basándose en los resultados de la inspección visual (4 = 100 % de citotoxicidad, 0 = 0 % de toxicidad). Los resultados de estos ensayos se representan en las Figuras 6A y 6B. Se determinó la neutralización de la toxicidad contra una línea celular de fibroblasto de pulmón humano, IMR-90, y una línea de células epiteliales del intestino humano, T-84. La Figura 6A muestra que todos los anticuerpos tuvieron capacidad neutralizante hacia las células IMR-90. La actividad neutralizante relativa de la citotoxicidad de la toxina A en células IMR-90 fue 1B11 > 3H2 > 3D8. Interesantemente, las actividad neutralizante relativa fue 3D8 ≥1B11 > 3H2 contra células T-84, que son células epiteliales colónicas humanas (Fig. 6A). Se cree que las células T-84 son más sensibles a la toxina A que otros tipos de células. Las células T-84 pueden proporcionar una célula diana más relevante para determinar la citotoxicidad de la toxina A.

Ejemplo 4. Mapeo de epítopes de anticuerpos anti-toxina A

El epítope de la toxina A unido por cada anticuerpo monoclonal se determinó por transferencia Western. Se construyeron clones recombinantes de *E. coli* que expresan cuatro fragmentos de la toxina A que representan el dominio enzimático (es decir, los aminoácidos 1-659 de la toxina A), el dominio de unión a receptor (es decir, los aminoácidos 1853-2710 de la toxina A) y las dos regiones entremedias (es decir, los aminoácidos 660-1255 y 1256-1852 de la toxina A). Los segmentos apropiados del gen de la toxina A se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico preparado a partir de la cepa ATCC 43255 de *C. difficile*. Los fragmentos se clonaron usando un vector pET y se transformaron en células BL21 DE3 para la expresión. El vector proporciona expresión inducible y dominios de afinidad para la purificación (es decir, una marca His) y detección (es decir, una marca V5 de epítope). La expresión se indujo con IPTG y los fragmentos se purificaron por cromatografía de afinidad. Se midió la unión a cuatro fragmentos de la toxina A diferentes: el fragmento 1 se correspondió con los aminoácidos 1-659; el fragmento 2 se correspondió con los aminoácidos 660-1255; el fragmento 3 se correspondió con los aminoácidos 1256-1852; y el fragmento 4 se correspondió con los aminoácidos 1853-2710 (Figura 7). 1B11 reaccionó con los fragmentos 1 y 2. 33.3H2 reaccionó con el fragmento 2. 3D8 y otro anticuerpo monoclonal humano, 6B4, reaccionaron con el fragmento 4 (el dominio de unión a receptor). Un antisuero policlonal de conejos inmunizados con toxoide A reaccionó con los cuatro fragmentos.

Los epítopes 1B11 y 33.3H2 se mapearon en más detalle. Para mapear el epítope 1B11 se generaron subfragmentos del fragmento 1 (aminoácidos 1-659) correspondientes a los aminoácidos 1-540, 1-415, 1-290 y 1-165 (Figura 8A). 1B11 se unió al fragmento 1 y al fragmento que contiene los aminoácidos 1-540. 1B11 no se unió a los otros subfragmentos. Por tanto, el epítope unido por 1B11 se mapea entre los aminoácidos 415-540 de la toxina A.

Para mapear el 33.3H2 se generaron los subfragmentos del fragmento 2 (aminoácidos 660-1255) correspondientes a los aminoácidos 660-1146, 660-1033, 660-920 y 660-807 (Figura 8B). 33.3H2 se unió a los fragmentos correspondientes a los aminoácidos 660-1255, 660-1146 y 660-1033. 33.3H2 no se unió a los otros subfragmentos. Por tanto, el epítope unido por 33.3H2 se mapea entre los aminoácidos 920-1033 de la toxina A.

Ejemplo 5. Protección de ratones de la exposición a la toxina A mortal por administración de anticuerpos anti-toxina A

Cada anticuerpo se sometió a ensayo para determinar la capacidad para proteger ratones de la exposición a una dosis mortal de la toxina A. A ratones hembra Swiss Webster, que pesan cada uno 10-20 gramos, se les inyectaron intraperitonealmente hasta 250 µg de 3D8, 1B11 ó 33.3H2, o un anticuerpo de control (anticuerpo anti-virus respiratorio sincitial, MedImmune) antes de la exposición a la toxina A. Aproximadamente 24 horas después de la inyección, los ratones se expusieron a una dosis de la toxina A superior a 10 veces la dosis mortal (DM_{50}), normalmente 100 ng. Los animales se observaron para signos de toxicidad durante los 7 días siguientes. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 9. Los datos se expresan como supervivencia en porcentaje. Los números entre paréntesis se refieren a dosis de anticuerpo, si se administró una dosis distinta de 250 µg. La Figura 9 muestra que cada uno de los anticuerpos pudo proteger hasta cierto punto los ratones de la exposición a la toxina A mortal. El porcentaje de ratones que sobrevivieron cuando se trataron con 3D8 osciló del 10-100 por ciento. El porcentaje de ratones que sobrevivieron cuando se trataron con 33.3H2 osciló del 20-100 por ciento. El porcentaje de ratones que sobrevivieron cuando se trataron con 1B11 osciló del 0-60 por ciento. La capacidad relativa de estos monoclonales para proteger los ratones fue 3H2 ≥ 3D8 > 1B11.

Ejemplo 6. Neutralización de enterotoxicidad de la toxina A de asas intestinales de ratón ligadas con anticuerpos anti-toxina A

Los anticuerpos 3D8 y 33.3H2 se sometieron a ensayo para determinar la neutralización de la enterotoxicidad de la toxina A en un modelo de ratón de asa ileal. Este modelo mide la acumulación de fluido inducido por la toxina A en el intestino de ratón. Para realizar estos experimentos, cada ratón se privó durante 16 horas, se anestesió y se expuso el íleo próximo al ciego. Un asa de 3 a 5 centímetros se ligó doblemente en cada extremo y se inyectó con 10 µg de la toxina A. El asa ileal se devolvió a la cavidad abdominal, la herida se cerró y se dejó que el animal se recuperara. Cuatro horas después de la cirugía, el animal se sometió a eutanasia y el asa se extirpó del animal. Se volvió a medir la longitud de cada segmento y se extrajo el fluido intraluminal. El volumen del fluido y la relación volumen con respecto a longitud (V:L) en milímetros por centímetro se calculó para cada asa. A los ratones de ensayo se les inyectó anticuerpo parenteralmente 1-2 días antes de la cirugía. Los resultados de estos experimentos se representan en la Figura 10. La inyección con toxina A aumentó el 50 % la relación de peso con respecto a longitud del fluido intestinal. Tanto 3D8 como 33.3H2 previnieron este aumento en la acumulación de fluido. Los ratones a los que se les administró cualquier anticuerpo tenían una relación de peso con respecto a longitud comparable a la de ratones que no recibieron ninguna inyección de toxina A. Por tanto, 3D8 y 33.3H2 protegen de la acumulación de fluido intestinal *in vivo.*

Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales anti-toxina A protegen de la enterotoxicidad mediada por toxina A *in vivo.* Los datos del asa ligada de ratón muestran que estos anticuerpos monoclonales pueden proteger de la lesión de la mucosa cuando se administran sistémicamente.

Ejemplo 7. Protección de hámsteres de la recaída de *C. difficile* con anticuerpos anti-toxina A

3D8 se probó en un modelo de recaída de hámster. Los hámsteres son sensibles a los efectos tóxicos de toxinas de *C. difficile* y normalmente mueren en el transcurso de 2-3 días desde que recibieron una dosis única de clindamicina en presencia de *C. difficile.* Para probar la eficacia de 3D8 en hámsteres se usó un modelo de recaída. En este modelo, a los hámsteres se les administró una dosis de clindamicina y una dosis de esporas B1 de *C. difficile* un día después. Un conjunto de hámsteres de control no recibió antibiótico ni anticuerpo adicional. Un segundo conjunto de hámsteres de control se trató con 10 mg/kg/día de vancomicina. La vancomicina es un antibiótico usado en el tratamiento de enfermedad por *C. difficile*. Como se muestra en la Figura 11A, un conjunto de prueba de hámsteres recibió 10 mg/kg/día de vancomicina y 2 mg/kg/día de un antisuero policlonal de conejo producido contra la toxina A cada día durante siete días después de la exposición a *C. difficile* como se indica por las flechas en la figura. Un segundo conjunto de prueba de hámsteres recibió 10 mg/kg/día de vancomicina y 50 mg/kg/día de 3D8 a los mismos intervalos de tiempo. La supervivencia de los hámsteres se representó frente al tiempo y se muestra en la Figura 11B.

La Figura 11B muestra que todos los hámsteres que sólo recibieron clindamicina y *C. difficile* (diamantes) murieron en el transcurso de dos días desde la exposición a las bacterias. El doce por ciento (2/17) de los hámsteres tratados con vancomicina (cuadrados) sobrevivió a la exposición a bacterias; el ochenta y ocho por ciento (15/17) murió en el transcurso de ocho días. El cuarenta y uno por ciento (7/17) de los hámsteres tratados con vancomicina y 3D8 (cruces) sobrevivieron a la exposición; el cincuenta y nueve (10/17) por ciento murió en el transcurso de siete días. El sesenta y cuatro por ciento (7/11) de los hámsteres tratados con vancomicina y suero de conejo policlonal (triángulos) sobrevivieron a la exposición a bacterias; el treinta y seis por ciento (4/11) murió en el transcurso de nueve días. Estos datos también se representan en la Figura 12 como el porcentaje de supervivientes totales en

cada grupo de tratamiento. Como se muestra en la figura, el porcentaje de supervivientes fue el mayor (sesenta y cuatro por ciento) en el grupo que recibió vancomicina y suero de conejo policlonal. El grupo que recibió 3D8 y vancomicina tuvo la segunda tasa de supervivencia mayor (cuarenta y uno por ciento). Sólo sobrevivió el doce por ciento de los hámsteres tratados con vancomicina. Murieron todos aquellos sin tratamiento. Estos datos muestran que los anticuerpos anti-toxina policlonales y monoclonales protegen de la recaída de la enfermedad por *C. difficile in vivo* cuando se administran después de la infección.

Ejemplo 8. Producción de anticuerpos anti-toxina A para administración en seres humanos

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y cadenas ligeras variables del anticuerpo 3D8 se clonaron en un vector pIE-Ugamma1F usando metodología convencional de ADN recombinante. El vector se amplificó en *E. coli*, se purificó y se transfectó en células CHO-dg44. Las células transfectadas se sembraron en placa a 4 x 10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se seleccionaron para el vector transfección con G418. Un clon, designado 1D3, se seleccionó originariamente por la resistencia a G418, luego se ensayó junto con otros transfectomas para la producción de IgG. 1D3 tuvo un mayor nivel de producción de IgG con respecto a otros transfectantes durante varias rondas de expansión. La expresión del anticuerpo 3D8 se amplificó por crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Se eligió un cultivo que podía crecer en metotrexato 175 nM para clonar células individuales para el desarrollo adicional. La siembra del cultivo en placas de 96 pocillos a baja densidad permitió la generación de cultivos que se produjeron a partir de una única célula o clones. Los cultivos se cribaron para la producción de IgG humana, y la célula que produce el mayor nivel de IgG se seleccionó para su uso posterior. El clon amplificado por metotrexato se expandió para producir un banco de células que incluye múltiples viales congelados de células.

Para preparar anticuerpos de células transfectadas, las células de un clon aisladas de las etapas se cultivan y se expanden como un inóculo para un biorreactor. El biorreactor contiene normalmente un volumen de 500 litros de medio de cultivo. Las células se cultivan en el biorreactor hasta que cae la viabilidad celular, que indica que se ha producido una concentración máxima de anticuerpo en el cultivo. Las células se eliminan por filtración. El filtrado se aplica a una columna de proteína A. Los anticuerpos se unen a la columna y se eluyen con un lavado a bajo pH. A continuación, los anticuerpos se aplican a una columna de Q-Sepharose para eliminar contaminantes residuales tales como proteínas de células CHO, ADN y otros contaminantes (por ejemplo, contaminantes víricos, si están presentes). Los anticuerpos se eluyen de la columna de Q-Sepharose, se nanofiltran, se concentran y se lavan en un tampón tal como PBS. Entonces, la preparación se separa asépticamente en alícuotas en viales para administración.

Ejemplo 9. Preparación y caracterización de anticuerpos policlonales anti-toxina B

A dos cabras nubias (nº 330 y nº 331) se les inyectaron intramuscularmente 50 µg de toxina B inactivada con UDP dialdehído (Techlab) y adyuvante completo de Freund. Las dosis de refuerzo de 25 µg de toxoide B con adyuvante incompleto de Freund se administraron intramuscularmente a intervalos de dos semanas. Los sangrados de prueba se obtuvieron después de 4 inmunizaciones. La reactividad de ELISA y la neutralización de citotoxicidad contra tanto la toxina A como la toxina B se ensayaron para medir la especificidad y la reactividad cruzada de los sueros.

Ambos animales respondieron bien a la toxina B y a un menor grado a la toxina A como se mide por ELISA. Los sueros de la cabra nº 331 tuvieron menos reactividad cruzada con la toxina A y se eligieron para la mayoría de los experimentos posteriores. La neutralización de la citotoxicidad para las células IMR-90 se determinó como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados de la neutralización de la citotoxicidad se representan en la Figura 13, que muestra que sueros de ambos animales mostraron buenos títulos de anticuerpos neutralizantes de la toxina B y títulos de anticuerpos neutralizantes de la toxina A muy bajos, pero detectables. También se confirmó la capacidad de los sueros de cabra para proteger ratones de una exposición intraperitoneal mortal a toxina B (100 ng) (datos no mostrados).

Ejemplo 10. Protección de hámsteres de recaída de *C. difficile* con anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B

Los grupos de hámsteres (n = 20) se expusieron a clindamicina y *C. difficile* y luego se trataron con vancomicina como se describe en el modelo de hámster de recaída en el Ejemplo 7. Los anticuerpos (tanto 3D8, suero de la cabra nº 331 como 3D8 y suero de la cabra nº 331) se administraron dos veces al día después del tratamiento con vancomicina (Figura 14). Los animales se monitorizaron para supervivencia (Figura 15) o enfermedad (Figura 16). Las dosis de anticuerpo fueron 1 ml dos veces al día para el suero de la cabra nº 331 y 3 mg para 3D8 administrado dos veces al día. Los animales que sólo recibieron vancomicina (es decir, sin tratamiento con anticuerpo) sirvieron de controles negativos. Como se ha observado previamente, el tratamiento con 3D8 y vancomicina solo demostró un efecto protector parcial, protegiéndose 10 de los 20 animales de la letalidad (Fig. 15). El cincuenta por ciento de los animales en este grupo siguieron sanos (Fig. 16). Sólo se protegieron seis de los 20 animales que recibieron tratamiento con vancomicina (Fig. 15). El treinta por ciento siguió sano (Fig. 16). También se observó protección parcial (9/20 animales protegidos) cuando se usó el suero de cabra solo (Fig. 15). El cuarenta por ciento siguió sano. La protección aumentó a casi el 100 % cuando tanto el suero de cabra como 3D8 se administraron juntos (18/20) y la aparición de la enfermedad se retrasó (Fig. 15). El noventa por ciento de estos animales siguió sano (Fig. 16). Claramente, la protección de la enfermedad siguió un patrón similar a la protección de la letalidad. Estos datos

demuestran que 3D8 puede ser completamente protector en el modelo de enfermedad de hámster cuando también se neutraliza la toxina B.

Ejemplo 11. Protección de hámsteres de recaída de *C. difficile* en hámsteres inmunizados con la toxina B

Se inmunizaron intraperitonealmente hámsteres con 10 µg del fragmento del extremo COOH de la toxina B (correspondiente a los aminoácidos 1777-2366 de la toxina B) expresada en *E .coli y* usando RIBI como adyuvante. Los animales recibieron 7 dosis del antígeno de la toxina B. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes se observaron en los animales que se probaron. Los grupos de hámsteres inmunizados se expusieron a clindamicina y *C. difficile*, luego se trataron con vancomicina como se describe en el modelo de hámster de recaída en el Ejemplo 7. El anticuerpo (3D8, 3 mg/dosis) se administró dos veces al día después del tratamiento con vancomicina a 19 animales y en comparación con un grupo de control negativo (n=20) que no recibió tratamiento (Figuras 17 y 18). Se expusieron seis animales sin tratamiento a vancomicina para garantizar que los hámsteres inmunizados con el antígeno de la toxina B fueran susceptibles a la infección por *C. difficile*. Los animales se monitorizaron para la supervivencia (Figura 17) o enfermedad (Figura 18). La Figura 17 muestra que los animales inmunizados a los que no se les administró 3D8 recayeron a una tasa similar a la observada previamente (65 % de recaída). Los animales inmunizados con la toxina B que recibieron 3D8 se protegieron más completamente de la recaída que los observados previamente (10 % de recaída con respecto a aproximadamente el 50 % de recaída en animales no previamente inmunizados con la toxina B en otros experimentos).

La Figura 18 muestra que algunos de los animales inmunizados que recibieron 3D8 enfermaron, pero se recuperaron de su diarrea. Sólo siguieron sanos el treinta y cinco por ciento de los animales inmunizados que recibieron vancomicina. En experimentos en los que los sueros reactivos de la toxina B no estuvieron presentes en animales, prácticamente todos los animales que tuvieron diarrea murieron después. Estos datos proporcionan pruebas adicionales de que 3D8 puede ser completamente protector en el modelo de enfermedad del hámster cuando la toxina B también se neutraliza. La neutralización de la toxina B, además de la toxina A, se requirió para la protección óptima de la enfermedad por *C. difficile* en este modelo.

Ejemplo 12. Protección de hámsteres de la exposición primaria a *C. difficile* usando 3D8 en hámsteres tratados con sueros de cabra anti-toxina B

La prevención de recaída de la enfermedad por *C. difficile* en los hámsteres fue más fácil de demostrar que la protección de la exposición directa (es decir, exposición sin administración de vancomicina). Los experimentos con sueros de conejo sólo demostraron una débil protección de la exposición directa y 3D8 no tuvo efecto detectable sobre la exposición directa. Como 3D8 fue más protector en un fondo de anticuerpos neutralizantes de la toxina B, se determinó si la administración combinada de 3D8 y antisueros anti-toxina B podría prevenir la enfermedad debida a exposición directa. Grupos de 5 hámsteres se expusieron después de recibir una vez dosis diarias de 3D8 (3 mg), sueros combinados de 3D8 (3 mg) y de cabra nº 331 (1 ml), o sin anticuerpos durante los 3 días antes de la exposición como se representa en la Figura 19. Los datos en la Figura 20 muestran que todos los animales que no recibieron anticuerpos o ni 3D8 ni sueros de cabra solos murieron a las 48 horas de la exposición a *C. difficile*. La mayoría de los animales (80 %) que recibieron tanto 3D8 como sueros de cabra sobrevivieron y los animales afectados sobrevivieron durante 10 días después de la exposición. La Figura 21 muestra que animales tratados con 3D8 y sueros de cabra enfermaron, pero se recuperaron. Estos datos proporcionan pruebas adicionales de que 3D8 puede ser completamente protector en el modelo de enfermedad de hámster cuando la toxina B también se neutraliza. La neutralización de la toxina B, además de la toxina A, se requirió para la protección óptima de enfermedad por *C. difficile* en este modelo.

La protección satisfactoria de hámsteres directamente expuestos a *C. difficile* ofrece varias ventajas para el cribado de nuevos candidatos a toxina B. Pueden usarse números de animales más pequeños ya que muere el 100 % de los animales sin tratar. Los anticuerpos tales como los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos) pueden cribarse directamente en hámsteres debido a que el procedimiento requiere 100 mg o menos del anticuerpo de prueba. Otros modos de ensayo tales como el modelo de recaída requieren el esfuerzo de producir cantidades de gramos debido a la baja velocidad de ataque en el modelo de recaída, que necesita probar número más grandes de animales. Los experimentos de exposición directa también son de duración más corta con una lectura definitiva en el plazo de 3-4 días desde la exposición a *C. difficile* en comparación con 7-10 en el modelo de recaída. Además, la eliminación del tratamiento con vancomicina del procedimiento de cribado reduce el número de veces que se manipulan los animales.

Ejemplo 13. Generación de anticuerpos monoclonales anti-toxina B

La toxina B de *C. difficile* se obtuvo tanto de Techlab, Inc. (Blacksburg, Va) como por producción recombinante. La toxina se purificó y se inactivó antes de la inmunización. La inactivación se realizó mediante tratamiento con UDP-dialdehído reactivo que produce la alquilación de residuos catalíticos a la vez que preserva la estructura de toxinas nativas. Brevemente, la toxina B purificada se incubó con UDP-2',3'-dialdehído (0,1-1,0 mM) en tampón durante 18 horas a 37 ºC, se filtró a través de un filtro de 100 kDa de corte para eliminar el UDP-2',3'-dialdehído sin reaccionar y se lavó con tampón. La toxina B inactivada (toxoide B) o los fragmentos de la toxina B recombinante se usaron como inmunógenos. Un dominio de unión a receptor de la toxina B (residuos de aminoácidos 1777-2366) se expresó en *E.*

coli como una proteína de fusión que contenía una inmunomarca (hexahistadina) para la purificación por afinidad usando cromatografía de afinidad con quelato de níquel (fragmento designado 4; véase el Ejemplo 11).

Ratones transgénicos Hco12, generados como se ha descrito anteriormente en la sección titulada "Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones HuMAb" y suministrados por Medarex, Milpitas, CA, se inmunizaron intraperitonealmente 6-12 veces cada uno con 10 µg de toxoide en adyuvante RIBI. En los ratones transgénicos Hco12, el gen de la cadena ligera kappa de ratón endógena se ha alterado homocigóticamente como se describe en Chen y col. (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen de la cadena pesada de ratón endógena se ha alterado homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Los ratones transgénicos Hco12 llevan un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild y col., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, y el transgén de la cadena pesada humana de Hco12 como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. El suero se recogió de cada ratón y se sometió a ensayo para determinar la reactividad para la toxina B por ELISA y la neutralización de citotoxicidad en células IMR-90. A los ratones que dieron positivo para el antisuero reactivo para la toxina B y neutralizante se les inyectaron 5-10 µg de toxoide B o el fragmento 4 mediante la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron y los bazos se aislaron para la fusión con hibridomas aproximadamente 3 días después de realizarse la inyección en la vena de la cola.

Se generaron hibridomas clónicos y se cribaron por ELISA. Se seleccionaron tres clones de hibridomas para el posterior análisis: 124-152; 2A11; y 1G10. En particular, los ADNc del clon 124-152 se amplificaron por RT-PCR a partir de ARNm, se clonaron y se secuenciaron. Se determinó que la región V de la cadena pesada se derivaba de la secuencia de la línea germinal VH 5-51, la región D se derivaba de la secuencia de la línea germinal 7-27 y la secuencia J de la región de la línea germinal JH3b. Se determinó que las regiones de la cadena ligera (kappa) se derivaban de A27 y la región J de JK1. Se determinó que el isotipo del clon 124-152 era IgG1. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL del clon 124-152 se muestran en las Figuras 27-28. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se indican en las figuras. Las secuencias de la línea germinal relacionadas de las regiones VH y VL se muestran en las Figuras 30-31.

Los anticuerpos 124-152; 2A11; y 1G10 se aislaron de hibridomas correspondientes y se sometieron a ensayo para determinar sus características de unión (más adelante). El ADN que codifica el clon 124-152 se clonó en un vector que va a expresarse como un anticuerpo humano para la administración a seres humanos.

Ejemplo 14. Actividad de unión de anticuerpos anti-toxina B

La unión de cada anticuerpo a la toxina B se determinó por Biacore usando técnicas convencionales. Los resultados de este ensayo se representan en la Tabla 6. Los anticuerpos producidos por 124-152; 2A11; y 1G10 se compararon con controles apropiados.

En particular, la afinidad de los anticuerpos 124-152; 2A11; y 1G10 para la toxina B se midió con el instrumento Biacore® que detecta interacciones de unión biomolecular con tecnología de resonancia de plasmones superficiales. Cada anticuerpo se añadió a chips sensores recubiertos de proteína A y se dejó que la toxina B fluyera sobre el chip para medir la unión. 124-152 tuvo una K_D de 1,64 x 10^{-10} M; 2A11 tuvo una K_D de 0,24 x 10^{-10} M; y 1G10 tuvo una K_D de 2,98 x 10^{-10} M. Por tanto, los anticuerpos se unen con alta afinidad a la toxina B. Estas constantes de unión indican que los anticuerpos tienen afinidades adecuadas para su uso en aplicación *in vivo*, por ejemplo, terapia humana.

Tabla 6

ID de la muestra	K_D x 10^{-10}(M)	k_a x 10^5(1/Ms)	k_d x 10^{-5}(1/s)
2A11	0,24	21	5,07
124.152	1,64	34,5	56,4
51.1G10	2,98	1,31	3,89

Ejemplo 15. Neutralización de toxina por anticuerpos anti-toxina B

Los anticuerpos expresados por los hibridomas 124-152; 2A11; y 1G10 se sometieron a ensayo para determinar la actividad de neutralización de la toxina B *in vitro.* Las células se incubaron en presencia de concentraciones variables de un anticuerpo monoclonal específico para la toxina B que prevendría que las células se redondearan después de la exposición a la toxina B. El efecto citopático (CPE) se determinó por inspección visual de células. Se determinó una puntuación CPE de 0-4 basándose en los resultados de la inspección visual (4 = 100 % de citotoxicidad, 0 = 0 % de toxicidad). Los resultados de estos ensayos se representan en la Figura 27. Se determinó la neutralización de la toxicidad contra una línea celular de fibroblasto de pulmón humano, IMR-90. La Figura 27 muestra que todos los anticuerpos tuvieron capacidad neutralizante hacia las células IMR-90. La actividad

neutralizante relativa de la citotoxicidad de la toxina A en células IMR-90 fue 124-152 > 1G10 > 2A11.

Ejemplo 16. Protección de hámsteres de la exposición primaria a *C. difficile* usando anticuerpos anti-toxina B

La protección de la exposición directa de un inóculo de *C. difficile* (clindamicina en el día -1 y esporas de *C. difficile* en el día 0 (1/100.000 de dilución)) se realizó durante un periodo de 4 a 10 días en presencia o ausencia de anticuerpos anti-toxina B. Grupos de 5 hámsteres se expusieron después de recibir una vez dosis diarias de 3D8 (20 mg totales durante 4 días), sueros combinados de 3D8 (ídem) y de cabra nº 331 (3 ml), 3D8 en combinación con anticuerpos anti-toxina B 124-152 (18 mg totales durante 4 días), 2A11 (20 mg totales durante 4 días) o 1G10 (20 mg totales durante 4 días) o sin anticuerpos durante 3 días antes de la exposición como se representa en la Figura 24. Los datos en la Figura 24 muestran que todos los animales que no recibieron anticuerpos o ni 3D8 ni sueros de cabra solos murieron en el transcurso de 72 horas desde la exposición a *C. difficile* mientras que los animales que recibieron 3D8 y un anticuerpo anti-toxina B, y preferentemente en combinación con 124-152, tuvieron una tasa de supervivencia del 40 % (Figura 24). Se realizó un estudio de 10 días similar al anterior (pero usando un inóculo de *C. difficile* más diluido) con cantidades crecientes del anticuerpo anti-toxina B 124-152 (0,56 mg, 1,7 mg o 5,0 mg administrado en los días -3, -2, -1 y 0). Los animales que recibieron tanto 3D8 como sueros de cabra sobrevivieron y la mayoría de los animales (60 %-70 %) sobrevivieron durante 10 días después de la exposición si se administró 3D8 en combinación con 124-152. Incluso la dosificación más baja del anticuerpo anti-toxina B 124-152 (0,56 mg en combinación con 3D8) fue altamente eficaz (70 % de supervivencia; véase la Figura 25). Entonces, los resultados muestran que 124-152 y 3D8, solos, son menos eficaces que cuando se usan en combinación cuando se logra un resultado terapéutico más aditivo, de hecho sinérgico (Figs. 24-26). Estos datos proporcionan pruebas adicionales de que el anticuerpo anti-toxina B es altamente eficaz, especialmente en combinación con el anticuerpo anti-toxina A 3D8. La neutralización de la toxina B, además de la toxina A, se determinó para proporcionar la protección de enfermedad por *C. difficile* en este modelo.

Ejemplo 17. Mapeo de epítopes de anticuerpos anti-toxina B

El epítope de la toxina B unido por cada anticuerpo monoclonal se determinó por transferencia Western. Se construyeron clones recombinantes de *E. coli* que expresan cuatro fragmentos de la toxina B que representan diferentes dominios de la toxina B. Los segmentos apropiados del gen de la toxina B se amplificaron por PCR a partir de ADN preparado a partir de una cepa apropiada de *C. difficile*. Los fragmentos se clonaron en un vector de expresión y se expresaron en *E. coli.* El anticuerpo monoclonal humano 152 se usó para cebar el fragmento de la toxina B en transferencias Western con el fin de mapear el epítope de unión. Los fragmentos de la proteína de la toxina B se aislaron de *E. coli* que contenía una parte de los genes de la toxina B y se separaron usando SDS-PAGE. Después de la electroforesis, los fragmentos de la toxina B se transfirieron a nitrocelulosa y se cebaron con anticuerpo monoclonal 152 seguido de fosfatasa alcalina conjugada con cabra anti-humana para detectar la unión al MAb 152. Se determinó que HuMab 152 se unía a la porción del fragmento -COOH de la toxina B entre los aminoácidos 1777 y 2366 (véase, por ejemplo, la Fig. 32).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente y neutraliza la toxina A de *Clostridium difficile (C. difficile)*, en el que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende:

(a) una región de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 7 a 9 y una región de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 16 a 18;
(b) una región de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 10 a 12 y una región de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 19 a 21; o
(c) una región de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 13 a 15 y una región de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 22 a 24.

2. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo. de la reivindicación 1 en el que las regiones de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID Nº: 1 y 4, SEC ID Nº: 2 y 5 o SEC ID Nº: 3 y 6, respectivamente.

3. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2 en el que las regiones de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID Nº: 1 y 4.

4. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

5. La porción de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la porción de unión a antígeno comprende Fab, Fab'2, ScFv o Fv.

6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Una composición terapéutica que comprende:

(a) el anticuerpo monoclonal, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano; y
(b) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a y neutraliza la toxina *B de C. difficile*.

8. La composición de la reivindicación 7, en la que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a y neutraliza la toxina *B de C. difficile* es un anticuerpo monoclonal.

9. La composición de la reivindicación 8 en la que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a y neutraliza la toxina B de *C. difficile* comprende una región de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 62, 64 y 66 y una región de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID Nº: 68, 70 y 72.

10. La composición de la reivindicación 9, en la que las regiones de la cadena pesada y de la cadena ligera variable comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID Nº: 54 y 58 o SEC ID Nº: 56 y 60, respectivamente.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que las regiones de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID Nº: 54 y 58, respectivamente.

12. La composición de la reivindicación 11 en la que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 es el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 3.

13. La composición de la reivindicación 8 en la que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a y neutraliza la toxina B de *C. difficile*:

(a) compite por la unión a la toxina B con un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, como se define en la reivindicación 10 ó 11; y/o
(b) se une específicamente a la toxina B con una K_D inferior a 20×10^{-6} M.

14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la que el anticuerpo que se une específicamente a y neutraliza la toxina B de *C. difficile* es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en la que la porción de unión a antígeno del anticuerpo que se une específicamente a y neutraliza la toxina B de *C. difficile* comprende Fab, Fab'2, ScFv o Fv.

16. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 para su uso en un procedimiento para tratar el cuerpo humano o animal mediante terapia o en un procedimiento de diagnóstico llevado a cabo en el cuerpo humano o animal.

17. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 para su uso en un procedimiento para tratar enfermedad mediada por *C. difficile* en un sujeto.

18. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o la composición de la reivindicación 17, en el que el sujeto es humano.

19. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o la composición de la reivindicación 17 ó 18, en el que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se administran intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente al sujeto.

20. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se administran con otro agente terapéutico.

21. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 20, en el que el agente terapéutico es un antibiótico, gamma-globulina policlonal, agente probiótico o vacuna de *C. difficile*.

22. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 21, en el que el antibiótico es vancomicina, metronidazol o bacitracina, en el que el agente probiótico es *Saccharomyces boulardii* o en el que la vacuna de *C. difficile* es una vacuna de toxoide.

23. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 20, en el que el agente terapéutico es un anticuerpo monoclonal, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la toxina B de *C. difficile*.

24. Un kit que comprende:

(a) el anticuerpo monoclonal, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
(b)

(i) una marca;
(ii) un agente terapéutico;
(iii) un agente para acoplar el anticuerpo a una marca o agente terapéutico; o
(iv) un dispositivo para administrar el anticuerpo a un sujeto.

25. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 6.

26. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 25.

27. Una célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 25.

FIG. 1

Secuencias de ácidos nucleicos de regiones de la cadena ligera variable (L) y regiones de la cadena pesada variable (H) de anticuerpos monoclonales anti-toxina A

Clon	Cadena		Secuencia de aminoácido	SEC ID Nº: (SEC ID Nº: sin secuencia lider)
3D8	L	I	mdmmvpaqllglllwfpgsrcDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQANSFPWTFGQGTKVEIK	SEC ID Nº:43 (SEC ID Nº:4)
		II	mdmrvlaqllglllcfpgarcDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK	SEQH)NO:44 (SEQDDNO:30)
		III	mdmrvpaqllglllwlpgarcVIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSY LAWYQQKPGKAPELLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK	SEC ID Nº:45 (SEC ID Nº:31)
		IV	mdmmvpaqllglllwfpgsrcDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK	SEC ID Nº:46 (SEC ID Nº:32)
		V	mdmmvpaqllglllwfpgsrcDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK	SEC ID Nº:47 (SEC ID Nº:33)
		VI	mdmrvpaqllglllcfpgarcDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSW LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK	SEC ID Nº:48 (SEC ID Nº:34)
	H		mefglswvflvallrgvqcQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVALIWYDGSNEDYTDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGMVRGVIDVFDIWGQGTVVTVS S	SEC ID Nº:49 (SEC ID Nº: 1)
1B11	L		meapaqllfllllwlpdttgEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQRSNWSQFTFGPGTKVDIK	SEC ID Nº:50 (SEC ID Nº:5)
	H		mefglswvflvallrgvqcQMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCEASGFSFNSYG MHWVRQAPGKGLEWVSVIWASGNKKYYIESVEGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARANFDYWGQGTLVTVSS	SEC ID Nº:51 (SEC ID Nº:2)
33.3H2	L		mdmrvlaqllglllcfpgarcDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYKSYPVTFGGGTKVEIK	SEC ID Nº:52 (SEC ID Nº:6)
	H		mefglswvflvallrgvqcQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNKY GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGTNKYYADSMKGRFTISRDNS KNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPPTANYWGQGTLVTVSS	SEC ID Nº:53 (SEC ID Nº:3)

FIG. 2A

Secuencias de VK de 3D8 anti-toxina A

Segmento V: L19

Segmento J: JK1

```
      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   V   S   A   S   V   G   D   R
1     GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC GTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                    CDR1
                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
55    GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                                            CDR2
                                                    ------------------------
      Q   H   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   A   A   S   S   L
109   CAG CAT AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      --------
      Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163   CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                                                    CDR3
                                                                    -------
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAT TGT CAA CAG

          CDR3
      ----------------------------
      A   N   S   F   P   W   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271   GCT AAT AGT TTC CCT TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                      |
                      |→ JK1
```

Secuencia de aminoácidos = SEC ID Nº:4

Secuencia de ácidos nucleicos = SEQ ED NO:35

FIG. 2B

Secuencias de VH de 3D8 anti-toxina A

Segmento V: VH3-33

Segmento D: D3-10

Segmento J: JH3b

```
      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
  1   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                                          CDR1
                                                  ------------------
      R   L   S   C   A   A   S   G   F   S   F   S   N   Y   G   M   H   W
 55   AGA CTC TCC TGT GCG GCG TCT GGA TTC AGC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                                              CDR2
                                                      ------------------
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   L   I   W   Y   D
109   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA TGG TAT GAT

                      CDR2
      ------------------------------------------
      G   S   N   E   D   Y   T   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163   GGA AGT AAT GAG GAC TAT ACA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
217   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                                  CDR3
                                          ------------------------------
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   W   G   M   V   R   G   V   I   D   V
271   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA TGG GGG ATG GTT CGG GGA GTT ATG GAT GTT
                                                D3-10/DXP'1                JH3b
      CDR3
      ------------
      F   D   I   W   G   Q   G   T   V   V   T   V   S   S
325   TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA GTG GTC ACC GTC TCT TCA
```

secuencia de aminoácidos = SEC ID Nº:l

secuencia de ácidos nucléicos =S EC ID Nº:38

FIG. 3A

Secuencias de VK de 1B11 anti-toxina A

Segmento V: L6

Segmento J: JK3

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1     GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                            ----------------------------------------
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                                                CDR2
                                                        -------------------
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N   R
109   CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      --------
      A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163   GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                                                    CDR3
                                                                    -------
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q
217   CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

            CDR3
      ------------------------------
      R   S   N   W   S   Q   F   T   F   G   P   G   T   K   V   D   I   K
271   CGT AGC AAC TGG TCT CAA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
                            └──►  JK3
```

Secuencia de aminoácidos = SEC ID Nº: 5

Secuencia de ácidos nucléicos = SEC ID Nº:36

FIG. 3B

Secuencias de VH de 1B11 anti-toxina A

Segmento V: VH3-33

Segmento D: Desconocido

Segmento J: JH4b

```
      Q   M   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
  1  CAG ATG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGC GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                                          CDR1
                                                  ------------------
      R   L   S   C   E   A   S   G   F   S   F   N   S   Y   G   M   H   W
 55  AGA CTC TCC TGT GAA GCG TCT GGA TTC TCC TTC AAT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

                                                              CDR2
                                                      ------------------
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   V   I   W   A   S
109  GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG TCA GTC ATA TGG GCC AGT

                    CDR2
     ------------------------------------------------
      G   N   K   K   Y   Y   I   E   S   V   E   G   R   F   T   I   S   R
163  GGA AAT AAG AAA TAT TAT ATA GAA TCC GTG GAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
217  GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                        CDR3
                                  ------------------
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   A   N   F   D   Y   W   G   Q   G   T
271  ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GCC AAT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC
                                                 └──→ JH4b

      L   V   T   V   S   S
325  CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Secuencia de aminoácidos = SEC ID Nº: 2

Secuencia de ácidos nucléicos = SEC ID Nº:39

FIG. 4A

Secuencias de VK de 33.3H2 anti-toxina A

Segmento V: L15

Segmento J: JK4

```
      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
  1   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                      CDR1
                          ---------------------------------------------
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
 55   GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                                                CDR2
                                                          ------------------
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109   CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      --------
      Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163   CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                                                      CDR3
                                                                    -------
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

              CDR3
      ----------------------------
      Y   K   S   Y   P   V   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271   TAT AAG AGT TAC CCG GTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                          └──► JK4
```

Secuencia de aminoácidos = SEC ID Nº: 6

Secuencia de ácidos nucléicos = SEC ID Nº: 37

FIG. 4B

Secuencias de VH de 33.3H2 anti-toxina A

Segmento V: VH3-33

Segmento D: Desconocido

Segmento J: JH4b

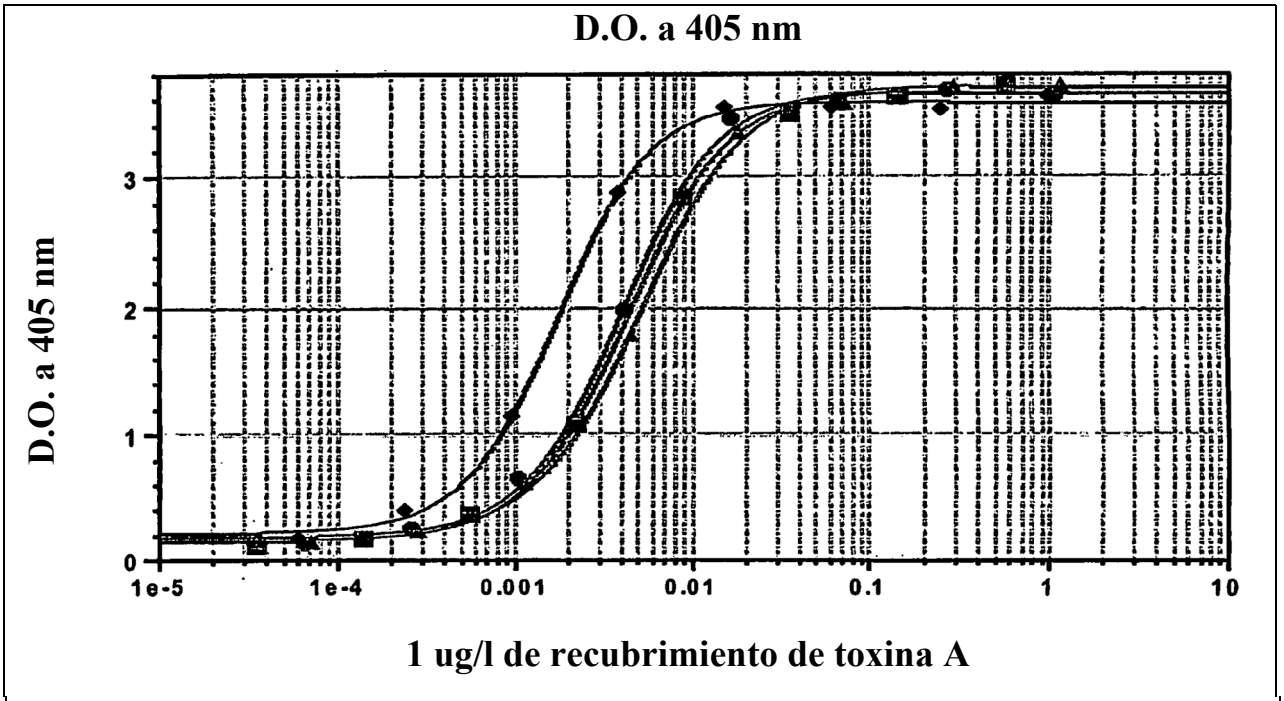
```
      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
1     CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
                                                        CDR 1
                                                    -------------------
      R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   N   K   Y   G   M   H   W
55    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AAT AAA TAT GGC ATG CAC TGG
                                                            CDR 2
                                                        -------------------
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   W   Y   D
109   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT
                    CDR 2
      -----------------------------------------------
      G   T   N   K   Y   Y   A   D   S   M   K   G   R   F   T   I   S   R
163   GGA ACT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC ATG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D   N   S   K   N   M   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
217   GAC AAT TCC AAG AAT ATG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTA AGA GCC GAG GAC
                                            CDR 3
                                        ---------------------------
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   P   P   T   A   N   Y   W   G   Q
271   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CCC CCC ACT GCT AAC TAC TGG GGC CAG
                                                            └► JH4b
      G   T   L   V   T   V   S   S
325   GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Secuencia de aminoácidos = SEC ID Nº: 3

Secuencia de ácidos nucléicos = SEC ID Nº:40

FIG. 5

Comparación de MAb de *C. difficile* en ELISA de unión a toxina A; patrón 8E6.1G12.2G2; 3D8.2A4.2A4; 33.3H2.2H8.2B8; 1B11.2A10.4A7



y=((A-D)/(1+(x/C^B))+D	A	B	C	D	R^2
8E6 patrones:concentración	0,143	1,53	0,004	3,657	0,999
3D8: concentración frente al valor medio	0,173	1,585	0,004	3,66	0,999
3H2: concentración frente al valor medio	0,172	1,478	0,005	3,702	0,999
1B11: concentración frente al valor medio	0,203	1,653	0,002	3,576	0,999

■	8E6.1G12.2G2
•	3D8.2A4.2A4
▲	33.3H2.2H8.2B8
♣	1B11.2A10.4A7

FIG. 6

FIG. 6A

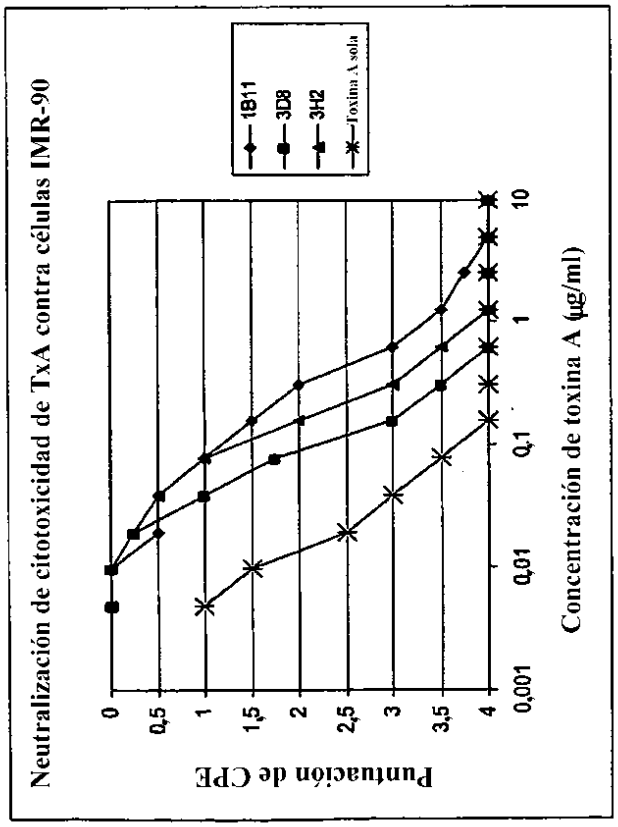


FIG. 6B

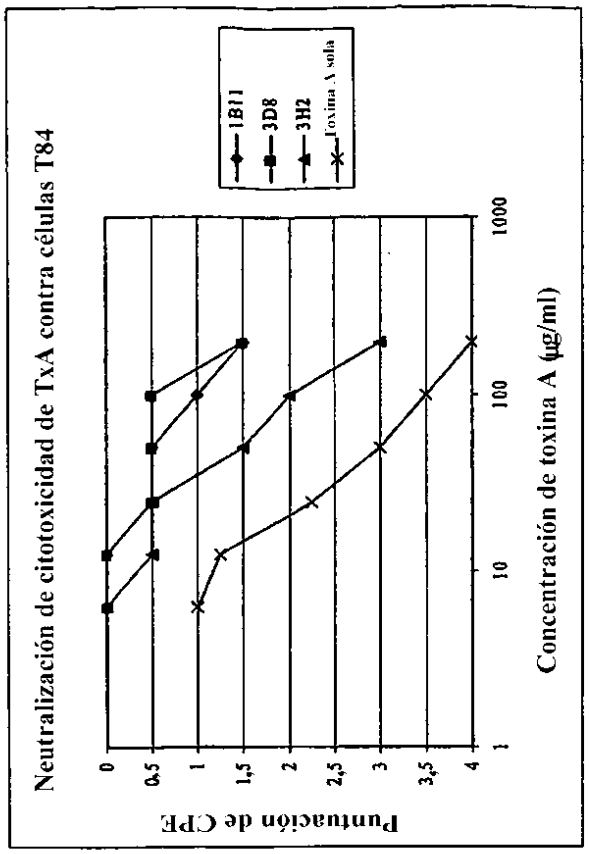


FIG. 7

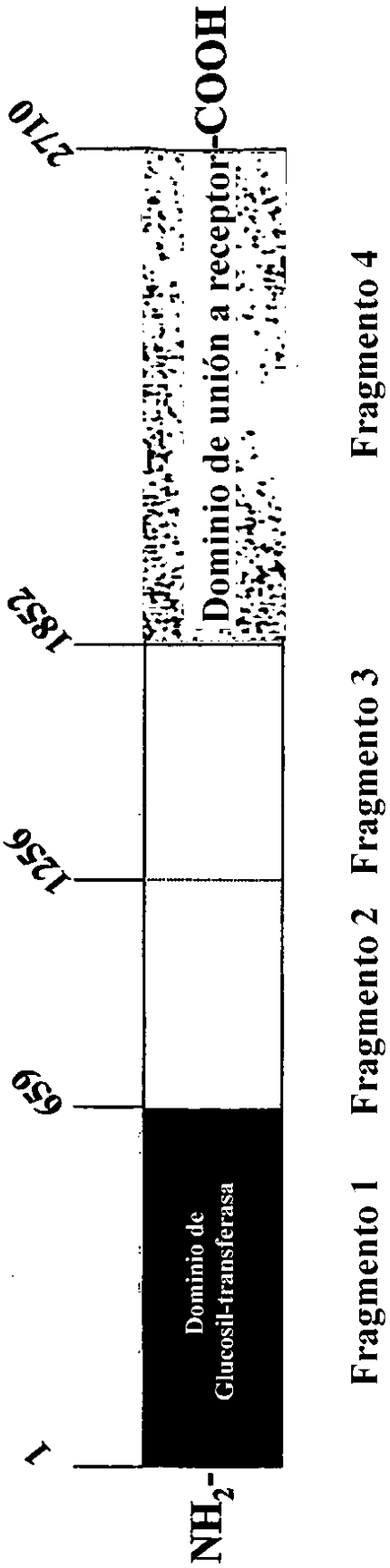
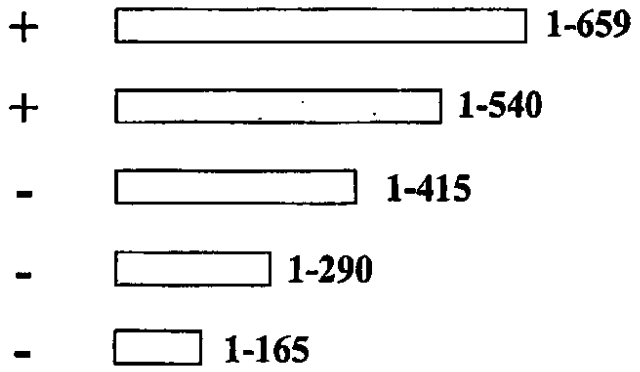

NH2-
1
Dominio de
Glucosil-transferasa
659
1256
1852
Dominio de unión a receptor
2710
-COOH
Fragmento 1
Fragmento 2
Fragmento 3
Fragmento 4

FIG. 8

FIG. 8A

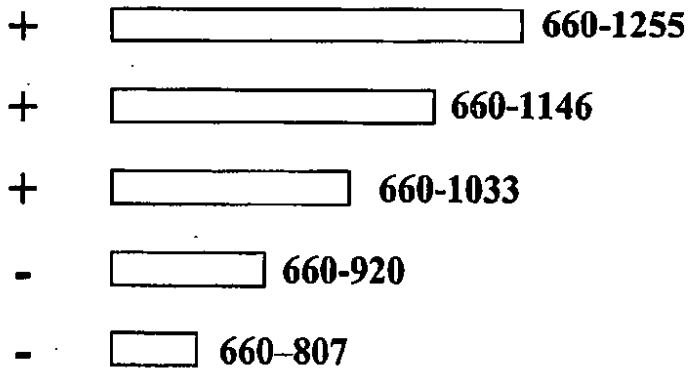
Fragmento 1 - Enzimático



Etítope 1B11 = AA 415-540.

FIG. 8B

Fragmento 2 - Desconocido



Etítope 3H2 = AA 920-1033

FIG. 9

Resumen de la protección de ratón de la mortalidad de toxina A por 1B11, 3D8 y 3H2

Nº de lote de Tx A (dosis)	Control (Synagis)	3D8	3H2	1B11, % de supervivencia (dosis*)
		% de supervivencia (dosis*)	% de supervivencia (dosis*)	
0100005 (100 ng)	10	80		50
0100005 (100 ng)	40	100		
0100005 (100 ng)	0		100	
0100005 (100 ng)	50		100	
0100005 (100 ng)	10	10-50	60	0-60
		(250,50,10)	(50)	(250,50,10)
1002047 (500 ng)	30	10-80	20-40	0-30
		(250,25,2.5)	(250,25,2.5)	(250,25,2.5)
1002047 (300 ng)	20	40,30	90,30	40,20
		(500,50)	(150,15)	(500,50)
1002047 (100 ng)	30	80,70	90,80	
		(250,25)	(250,25)	
1002047 (100 ng)	30	30,40	100,80	
		(250,25)	(250,25)	
1002047 (100 ng)	25	50,10,10	90,40,10	10,10, 30
		(100,10,1)	(100,10,1)	(100,10,1)
1002047 (100 ng)	15	50, 50,20	90,60,60	"»
		(100,10, 1)	(100,10,1)	
1002047 (100 ng)	15	60, 60,40***		
		(100,10,1)		
* La dosis de HuMAb fue 250 µg a menos que se observe de otro modo				
** Los HuMAb se inyectaron 24 horas antes de la exposición				
*** Expresado a partir de células CHO				

FIG. 10

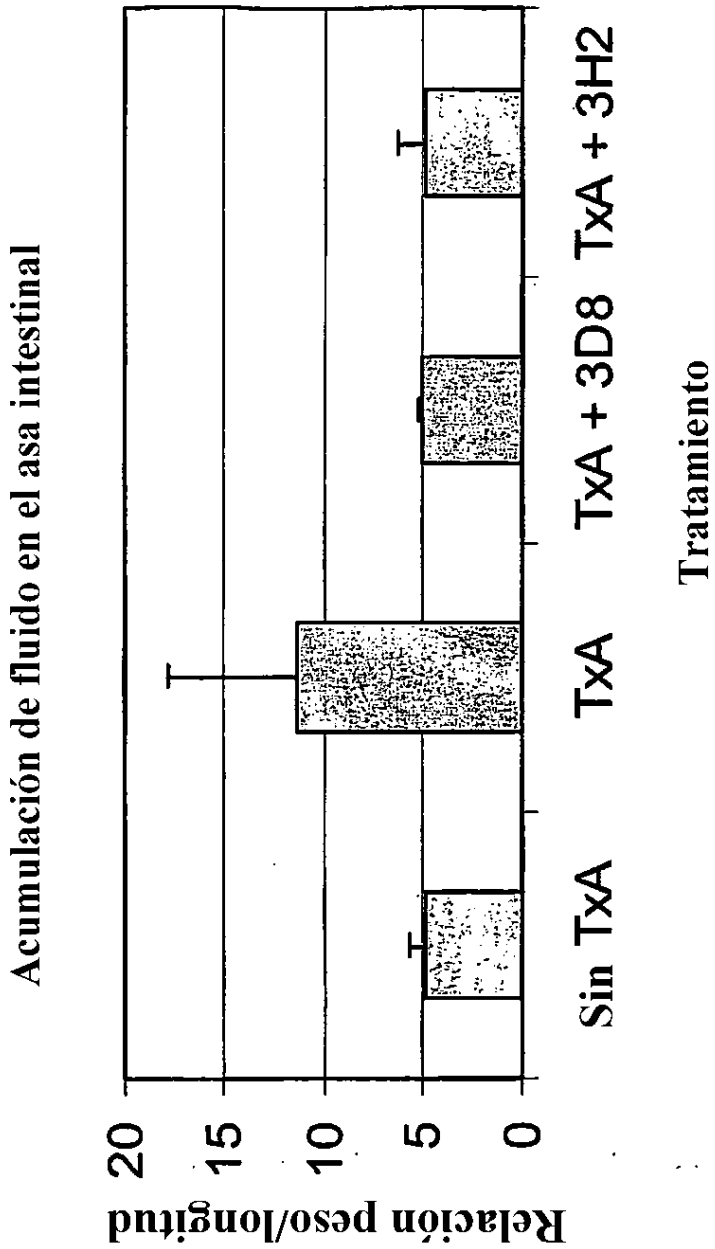

Acumulación de fluido en el asa intestinal
Relación peso/longitud
20
15
10
5
0
Sin TxA
TxA
TxA + 3D8
TxA + 3H2
Tratamiento

FIG. 11A

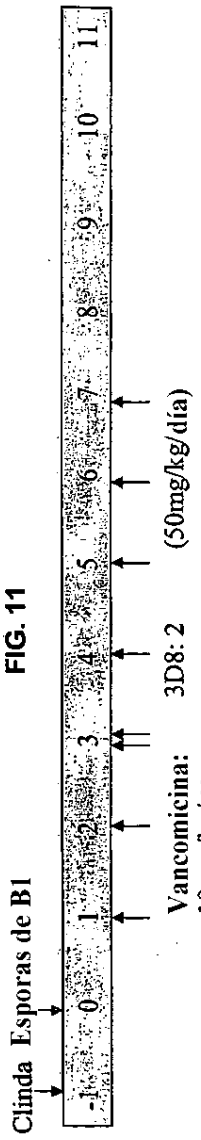


FIG. 11

FIG. 11B

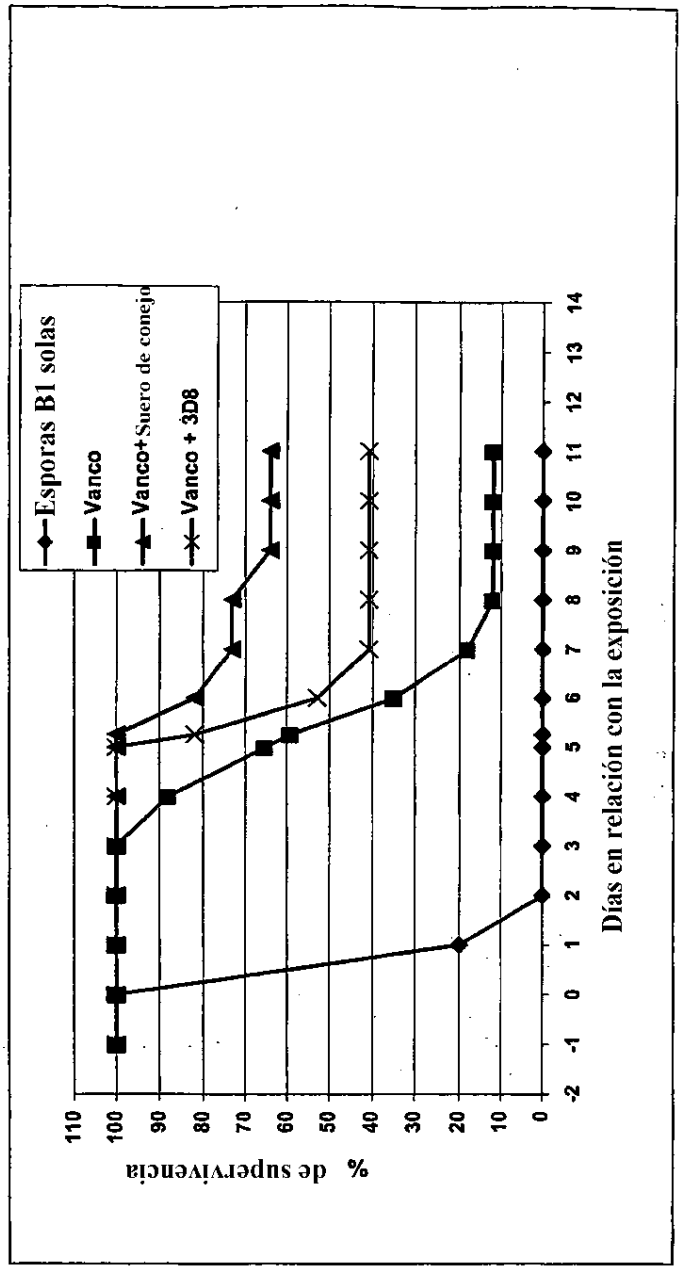


FIG. 12

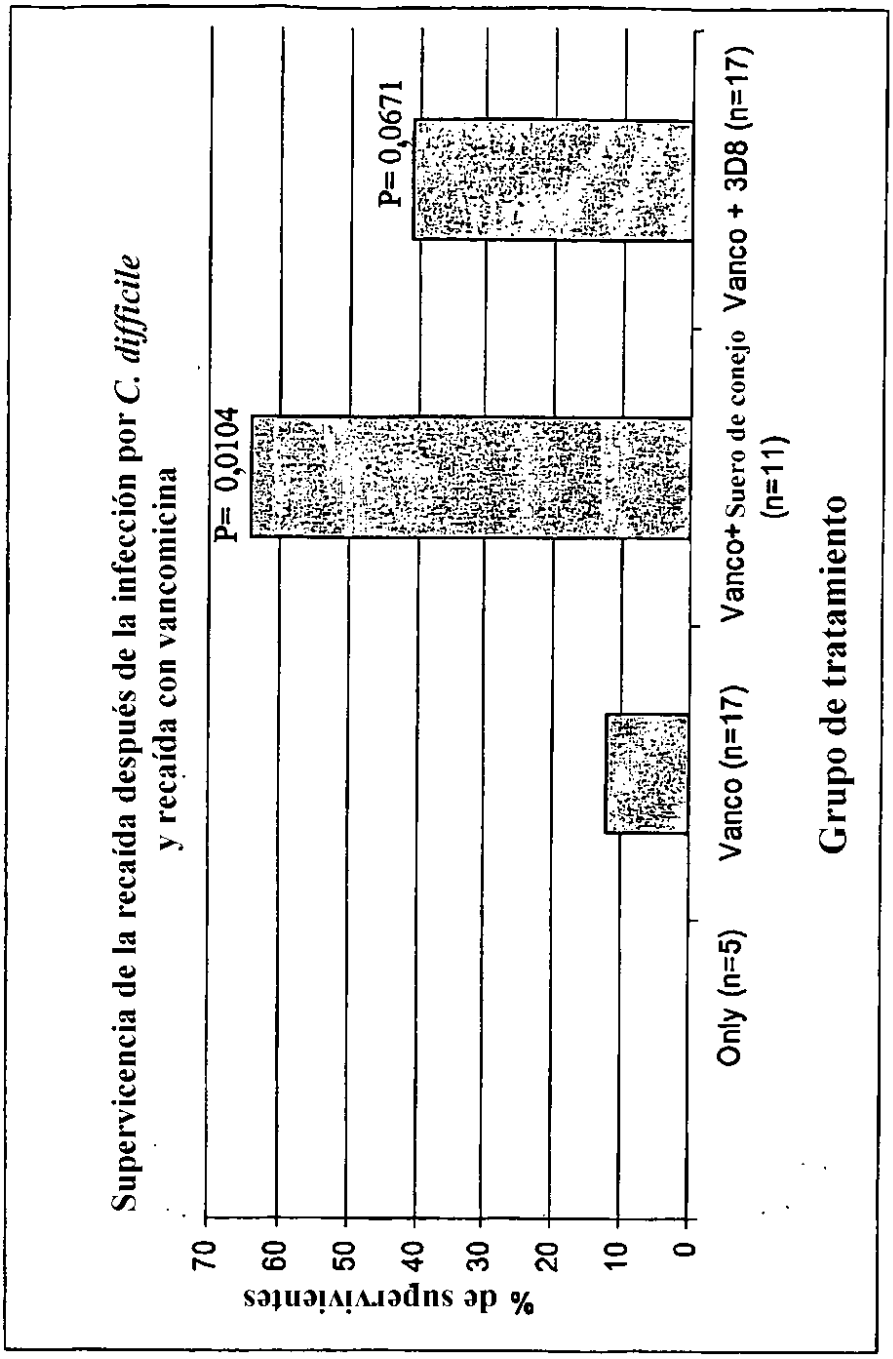

Supervicencia de la recaída después de la infección por C. difficile
y recaída con vancomicina
% de supervivientes
70
60
50
40
30
20
10
0
P= 0,0104
P= 0,0671
Only (n=5)
Vanco (n=17)
Vanco+ Suero de conejo (n=11)
Vanco + 3D8 (n=17)
Grupo de tratamiento

FIG. 13

Neutralización de la citotoxicidad de toxina A y B frente a células IMR-90 por antisueros policlonales

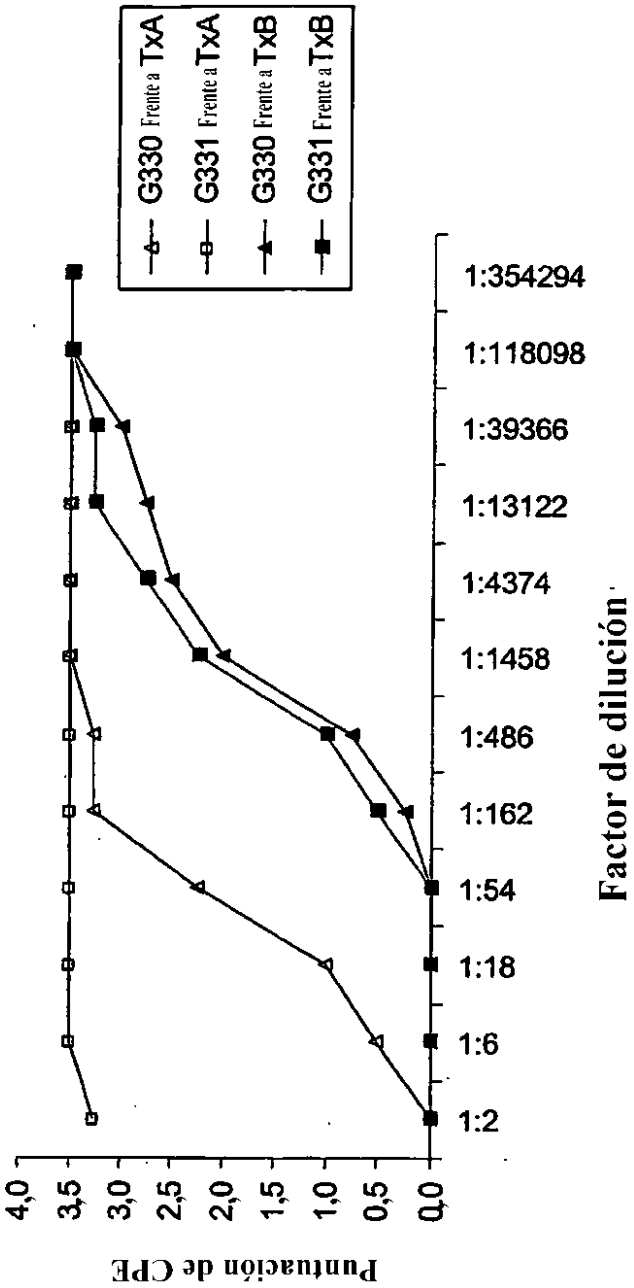


FIG. 14

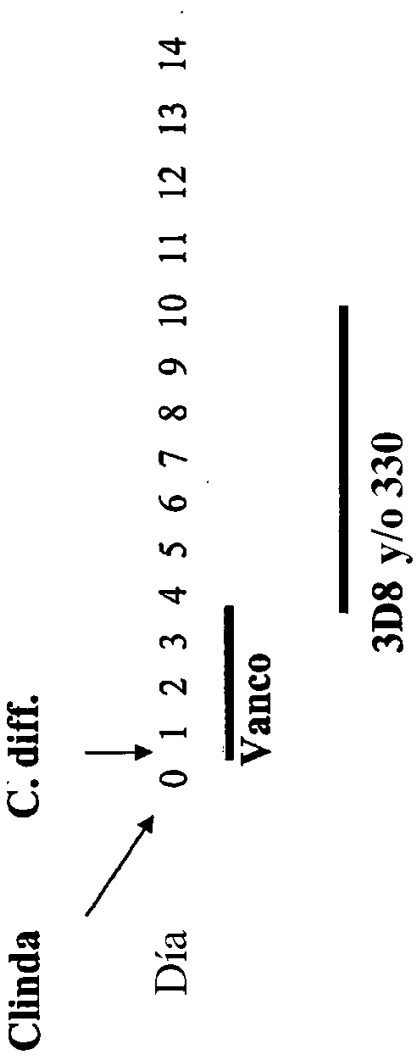


FIG. 15

Supervivencia de la recaída de *C. difficile* en hámsteres después del tratamiento con 3D8, suero de cabra anti-toxina B o ambos

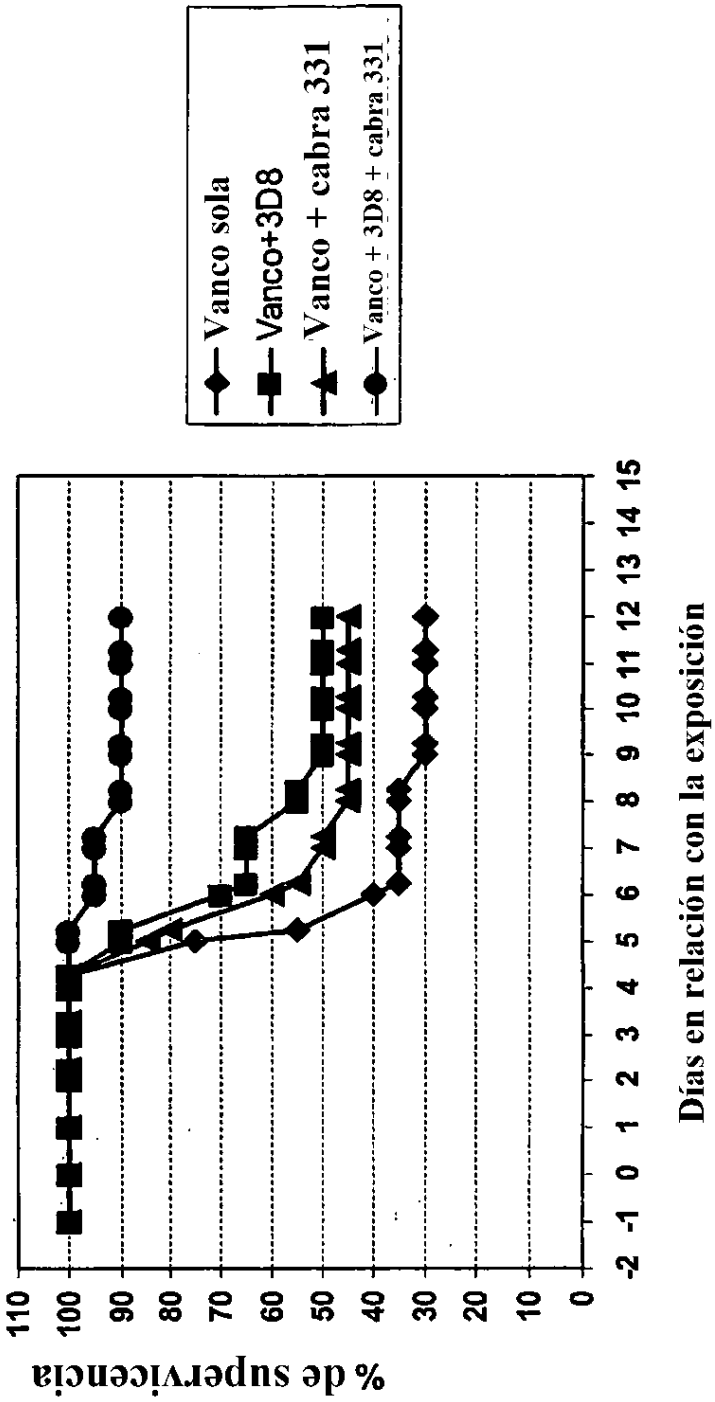


FIG. 16

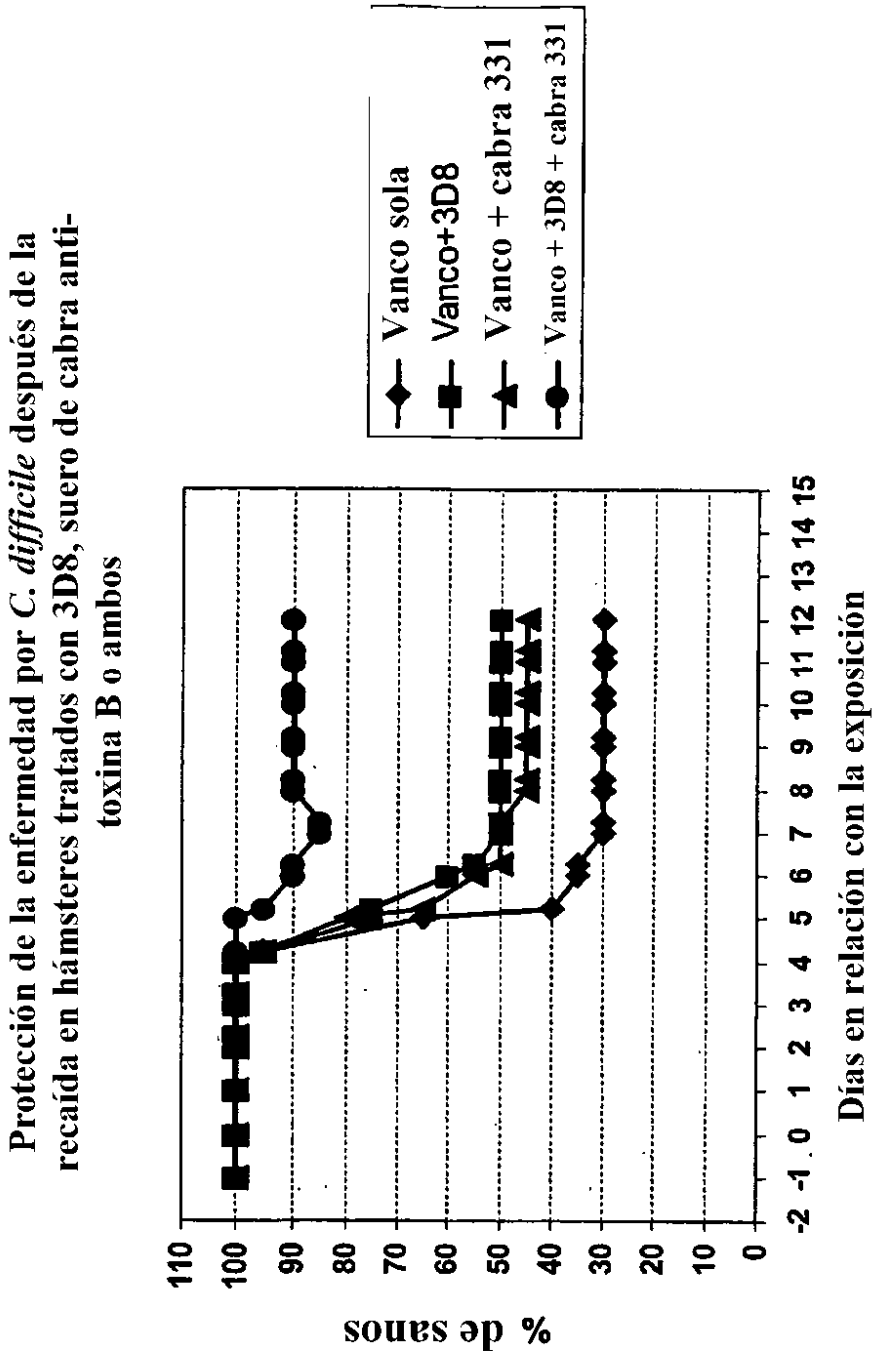

Protección de la enfermedad por *C. difficile* después de la recaída en hámsteres tratados con 3D8, suero de cabra anti-toxina B o ambos
% de sanos
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Días en relación con la exposición
Vanco sola
Vanco+3D8
Vanco + cabra 331
Vanco + 3D8 + cabra 331

FIG. 17

Inmunización de hámsteres con fragmento 4 de la toxina B / experimento de protección (supervivencia) de la recaída

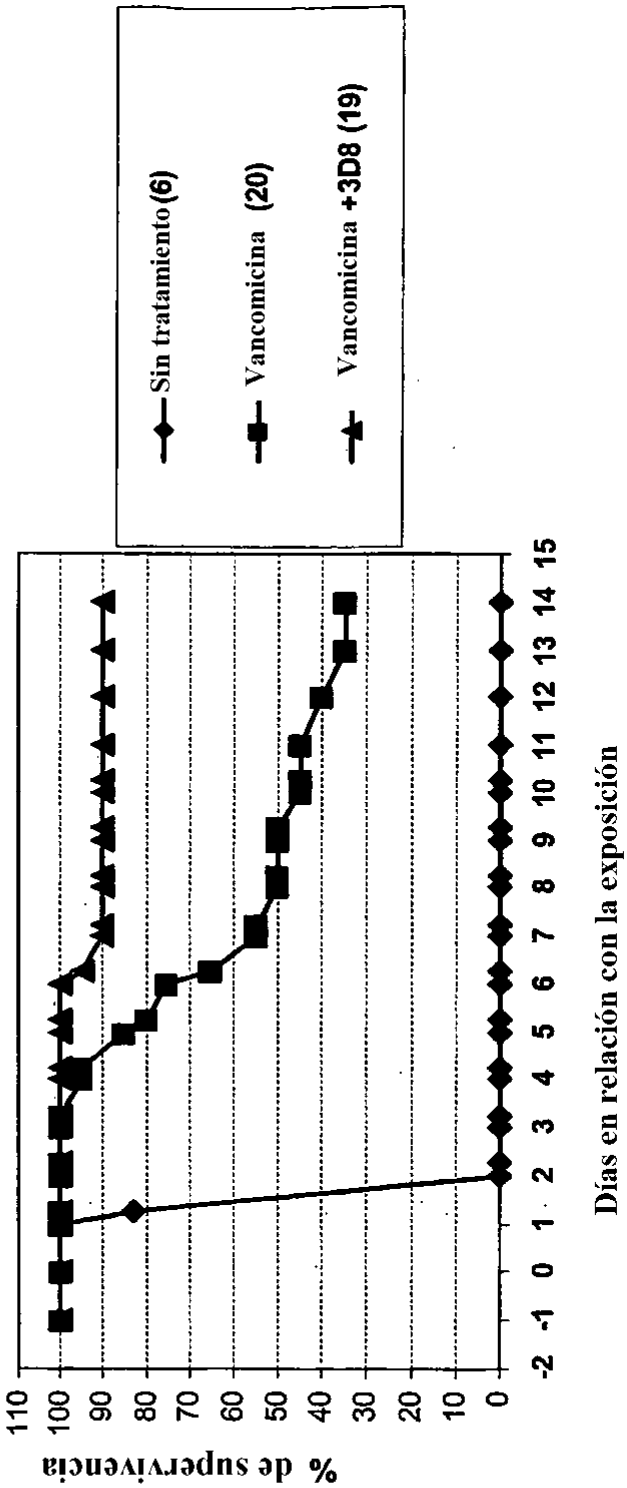


FIG. 18

Inmunización de hámsteres con fragmento 4 de la toxina B / experimento de protección de la recaída (enfermedad)

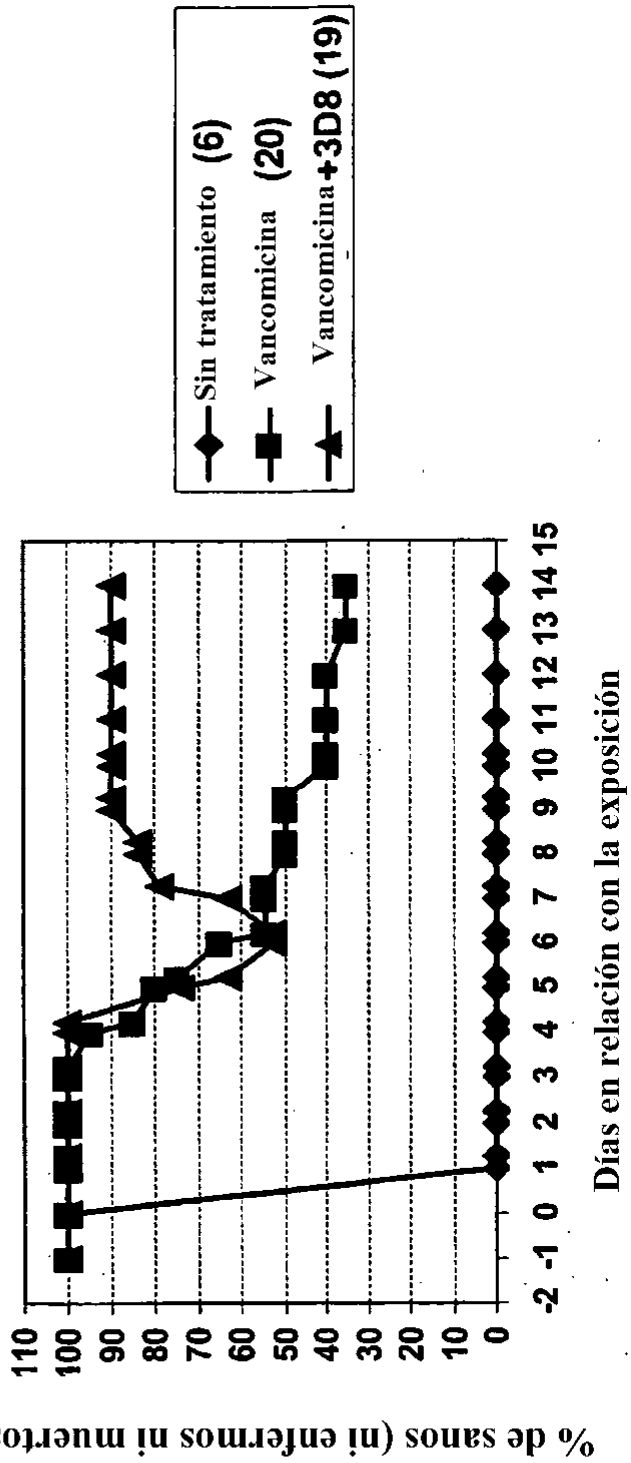


FIG. 19

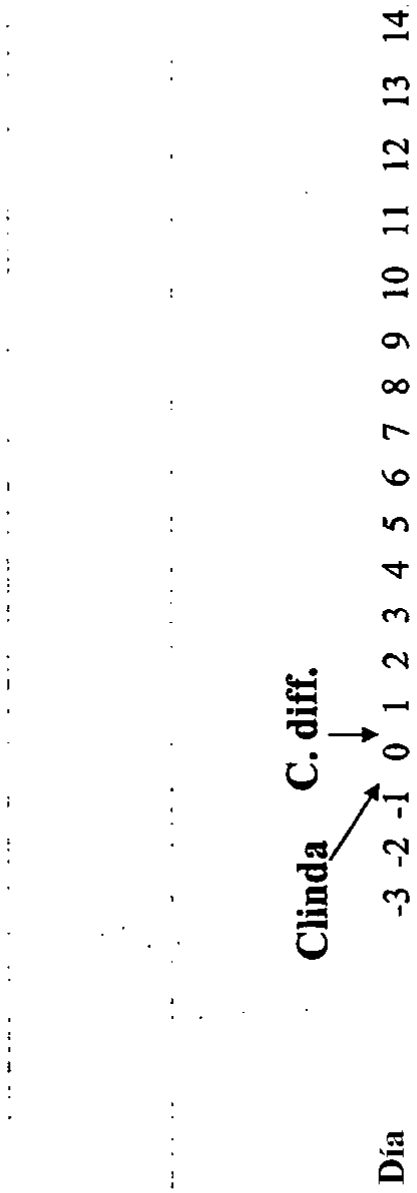


FIG. 20

Protección pasiva de hámsteres de la exposición primaria a *C. difficile* usando 3D8 sin o con sueros de cabra anti-toxina B (supervivencia)

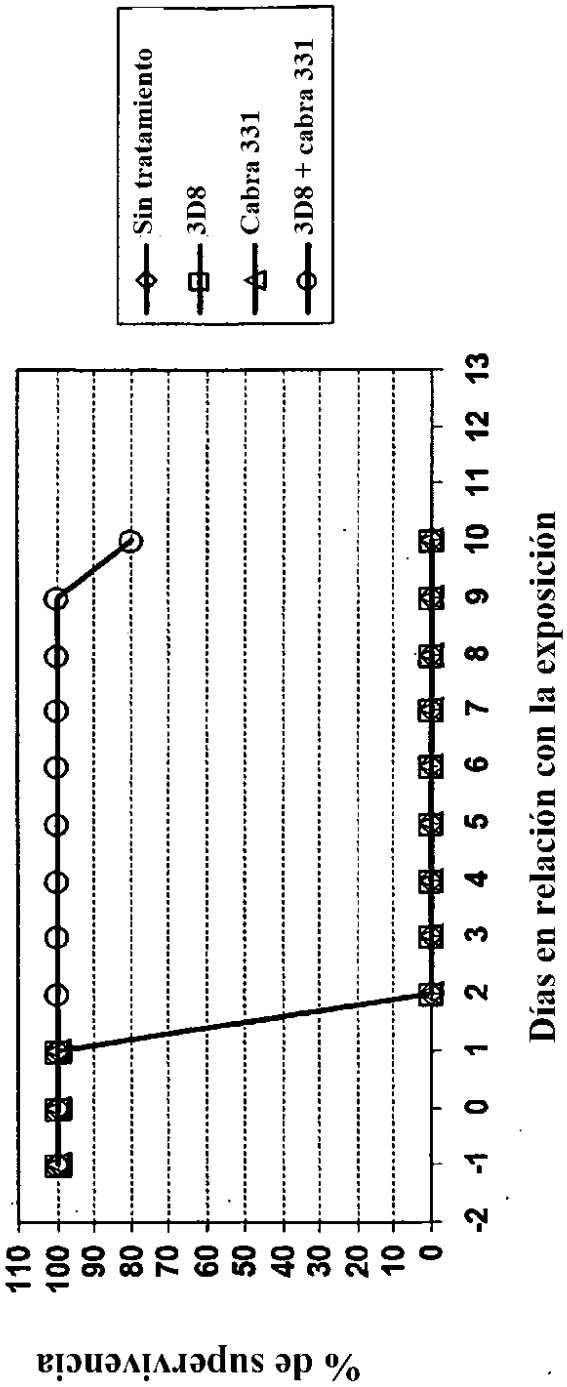
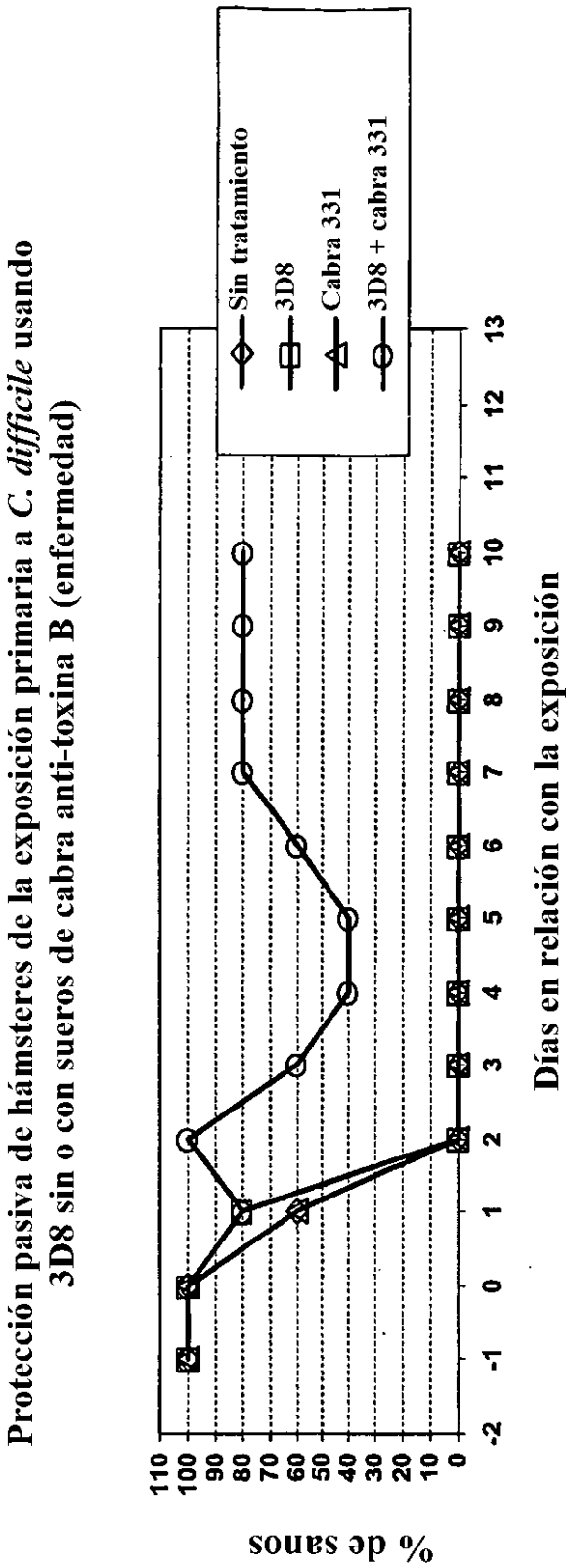


FIG. 21


Protección pasiva de hámsteres de la exposición primaria a *C. difficile* usando 3D8 sin o con sueros de cabra anti-toxina B (enfermedad)
% de sanos
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-2
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
Días en relación con la exposición
Sin tratamiento
3D8
Cabra 331
3D8 + cabra 331

Secuencia de aminoácidos de la toxina A de *C. difficile*

(véase también nº GI de GenBank®: 98593, nº de acceso: A37052)

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKKLNESIDVFMNKY
KTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADINAEY
NIKLWYDSEAFLVNTLKKAIVESSTTEALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFI
NYYKSQINKPTVPTIDDIIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQ
ELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMLPGIHSDLFKTISRPSSIGLDR
WEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFSKLENLNVSDLEI
KIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSL
FNSATAENSMFLTKIAPYLQVGFMPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASD
LIEFKFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSEDNGVDFNKNTALDK
NYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLFSKNPKNSIIIQRNMNESAKS
YFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSNEISSFLD
TIKLDISPKNVEVNLLGCNMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQY
EVRINSEGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLASISEDI
KTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNIESSIGDYIYYEKLEPVKNIIHNSIDDLIDEFNLLENVS
DELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSVRFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKE
ISTIKNSIITDVNGNLLDNIQLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLY
AQLFSTGLNTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKELLDEH
DPLLKKELEAKVGVLAINMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAGISAGIPSLVNNELILH
DKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPIDDLVISEIDFNNNSIKLGTCNILAMEGGS
GHTVTGNIDHFFSSPSISSHIPSLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVP
GLRSLENDGTRLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDKDTRNFIMP
TITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNIDNEVREISIENGTIK
KGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKDRYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSY
SLLLSGDKNYLISNLSNTIEKINTLGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKD
SKNILEFYNDSTLEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV
KVNGLYLNESVYSSYLDFVKNSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENINFVIDKYFTLVG
KTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNGRNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFS
YEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFE
YKWSTEGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFK
SFNSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNLVTGWQTINGK
KYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPDGFEYFAPANTQNNNIEGQAIVY
QSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGWRIINNEKYYFNPNNAIAAVGLQVIDNNKYYFNPDTAII
SKGWQTVNGSRYYFDTDTAIAFNGYKTIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSTSNGFEYFAPANTYN
NNIEGQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAATGWQTIDGKK
YYFNTNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGF
EYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAA
IHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHN
NNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGF
EYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAV
TGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDAN
NIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNF
YFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGW
QTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGIYG **SEC ID Nº:41**

Secuencia de aminoácidos de la toxina B de *C. difficile*

(véase también nº GI de GenBank®: 7476000, nº de acceso: S70172)

MSLVNRKQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDALEEYHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDTYIDT
YKKSGRNKALKKFKEYLVIEILELKNSNLTPVEKNLHFIWIGGQINDTAINYINQWKDVNSD
YNVNVFYDSNAFLINTLKKTIIESASNDTLESFRENLNDPEFNHTAFFRKRMQIIYDKQQNF
INYYKAQKEENPDLIIDDIVKTYLSNEYSKDIDELNAYIEESLNKVTENSGNDVRNFEEFKT
GEVFNLYEQESVERWNLAGASDILRVAILKNIGGVYLDVDMLPGIHPDLFKDINKPDSVKTA
VDWEEMQLEAIMKHKEYIPEYTSKHFDTLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIFLPLGDIEVSPL
EVKIAFAKGSIINQALISAKDSYCSDLLIKQIQNRYKILNDTLGPIISQGNDFNTTMNNFGE
SLGAIANEENISFIAKIGSYLRVGFYPEANTTITLSGPTIYAGAYKDLLTFKEMSIDTSILS
SELRNFEFPKVNISQATEQEKNSLWQFNEERAKIQFEEYKKNYFEGALGEDDNLDFSQNTVT
DKEYLLEKISSSTKSSEGGYVHYIVQLQGDKISYEAACNLFAKNPYDSILFQRNIEDSEVAY
YYNPTDSEIQEIDKYRIPDRISDRPKIKLTFIGHGKAEFNTDIFAGLDVDSLSSEIETAIGL
AKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSVNVEETYPGKLLLRVKDKVSELMPSMSQDSIIVSANQYE
VRINSEGRRELLDHSGEWINKEESIIKDISSKEYISFNPKENKIIVKSKNLPELSTLLQEIR
NNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISNIETQVVEERIEEAKSLTSDSINYIKNEFKLIESISE
ALCDLKQQNELEDSHFISFEDISETDEGFSIRFINKETGESIFVETEKTIFSEYANHITEEI
SKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLNAAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYA
QLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETIDLLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSD
PLLRQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIITSSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRD
KATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLDDKVMMQQDDLVISEIDFNNNSIVLGKCEIWRMEGGSG
HTVTDDIDHFFSAPSITYREPHLSIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLPNAPNRVFAWETGWTPG
LRSLENDGTKLLDRIRDNYEGEFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVP
IITTEYIREKLSYSFYGSGGTYALPLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIK
KGDLIEGILSTLSIEENKIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIIEVDLLSKSY
KLLISGELKILMLNSNHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEGKENGFINGSTKEGLFVSE
LPDVVLISKVYMDDSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKT
IKLNSVHLDESGVAEILKFMNRKGSTNTSDSLMSFLESMNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFI
ISGTTSIGQFEFICDENNNIQPYFIKFNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTV
INFSQKYLYGIDSCVNKVVISPNIYTDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNIND
LSIRYVWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNFSDKQDVPVSEIIL
SFTPSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTV
GDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGE
AIDFTGKLIIDENIYYFEDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDDKYYFNSDG
VMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNED
LGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDG
QYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYK
YFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFVPETKKA
CKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEIQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQI
GVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLGLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYF
DPDTAQLVISE

Fig. 24

Exposición primaria de hámsteres

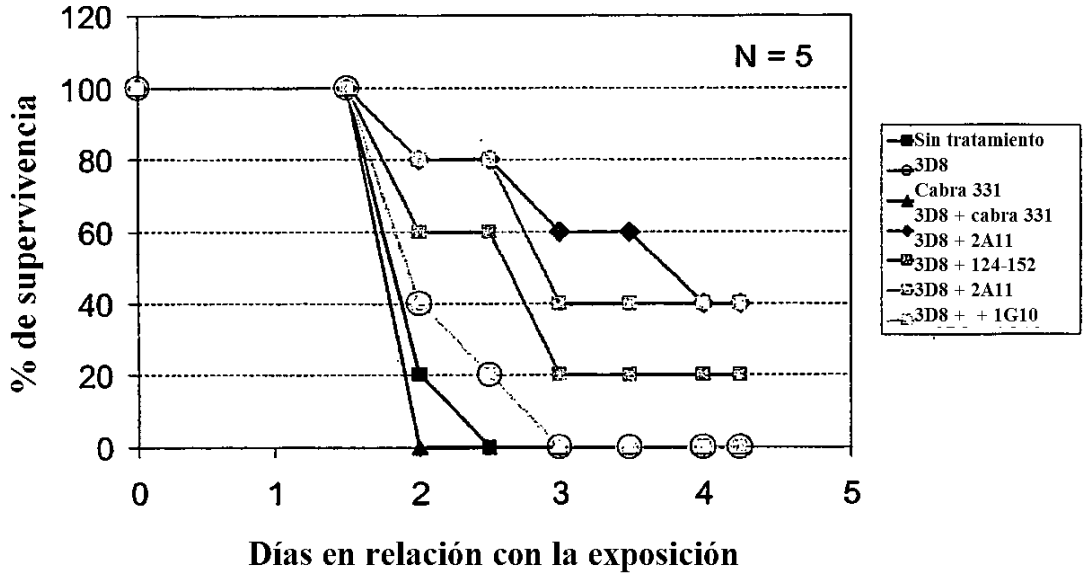


Fig. 25

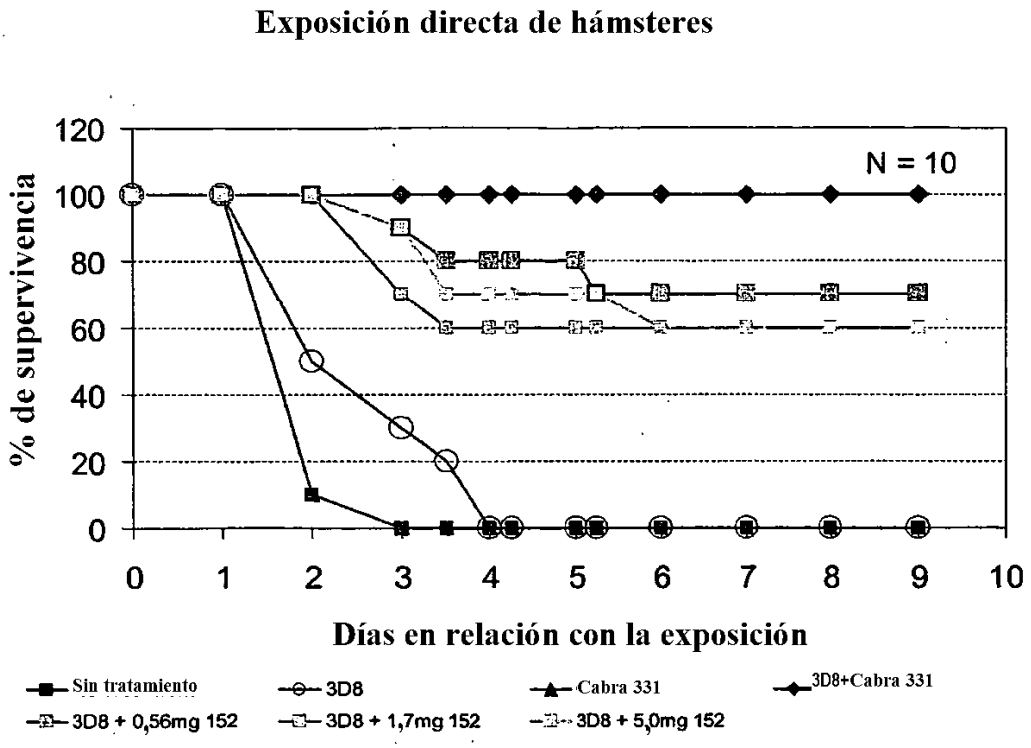

Exposición directa de hámsteres
N = 10
% de supervivencia
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Días en relación con la exposición
Sin tratamiento
3D8
Cabra 331
3D8+Cabra 331
3D8 + 0,56mg 152
3D8 + 1,7mg 152
3D8 + 5,0mg 152

Fig. 26

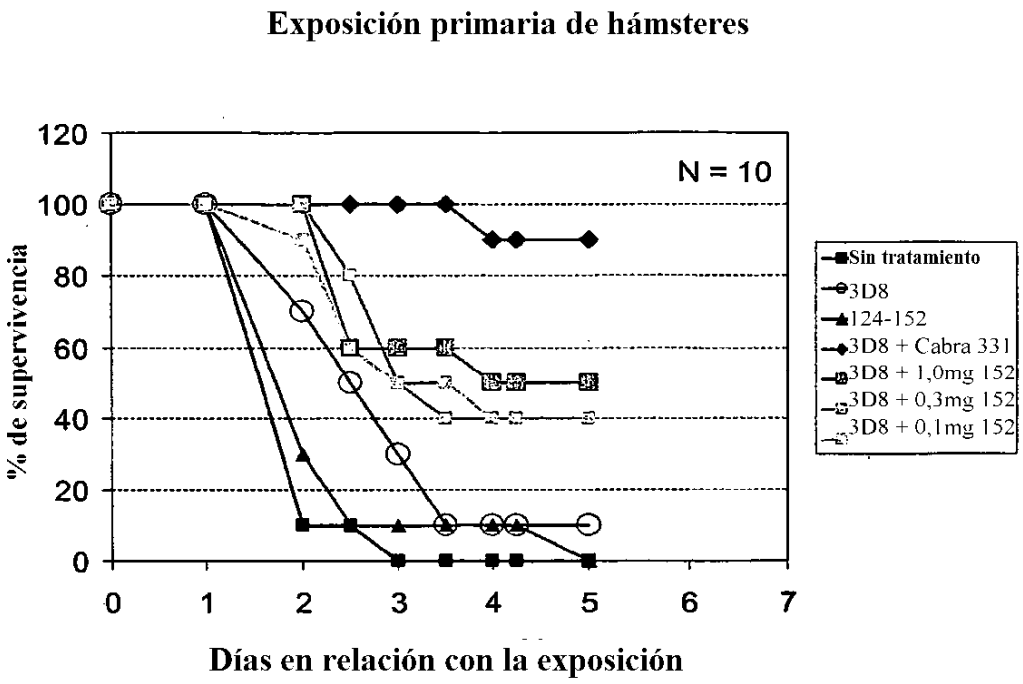
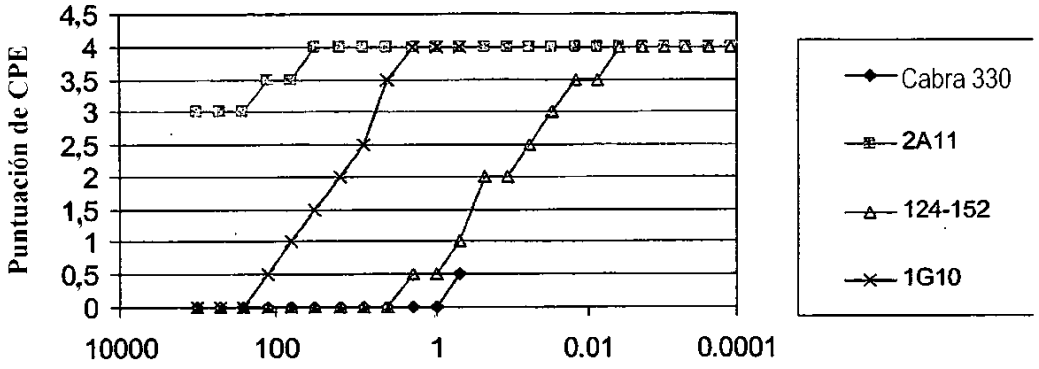

Exposición primaria de hámsteres
N = 10
% de supervivencia
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
7
Días en relación con la exposición
Sin tratamiento
3D8
124-152
3D8 + Cabra 331
3D8 + 1,0mg 152
3D8 + 0,3mg 152
3D8 + 0,1mg 152

Fig. 27

Neutralización de la citotoxicidad de la toxina B contra células IMR-90 usando 2A11, 124-152 o 1G10



Concentración de anticuerpo (nM)

VH de 124-152 anti-CDTox B

Fig. 28

Segmento V: 5-51

Segmento D: 7-27

Segmento J: JH3b

```
    E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   S   G   E   S   L
  1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG TCC GGG GAG TCT CTG

                                                        CDR1 SEC ID Nº:62   (aa) 63 (nt)
                                                    -------------------
    K   I   S   C   K   G   S   G   Y   S   F   T   S   Y   W   I   G   W
 55 AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG

                                                            CDR2
                                                        -------------------
    V   R   Q   M   P   G   K   G   L   E   W   M   G   I   F   Y   P   G
109 GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAG GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC TTC TAT CCT GGT

                    CDR2     SEQ ID NO:64 (aa) 65 (nt)
   ---------------------------------------------
    D   S   S   T   R   Y   S   P   S   F   Q   G   Q   V   T   I   S   A
163 GAC TCT AGT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

    D   K   S   V   N   T   A   Y   L   Q   W   S   S   L   K   A   S   D
217 GAC AAG TCC GTC AAC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                                CDR3   SEQ ID NO:66 (aa) 67 (nt)
                                            ---------------------------------------
    T   A   M   Y   Y   C   A   R   R   R   N   W   G   N   A   F   D   I
271 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CGT CGA AAC TGG GGA AAT GCT TTT GAT ATC

    W   G   Q   G   T   M   V   T   V   S   S   SEC ID Nº:54
325 TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA SEC ID Nº:55
```

>CDTox B, 124-152, VH-NT con líder SEC ID Nº:57

```
ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCCGAGGTGCA
GCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGTCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT
CTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGGCCTGGAG
TGGATGGGGATCTTCTATCCTGGTGACTCTAGTACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGT
CACCATCTCAGCCGACAAGTCCGTCAACACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGG
ACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACGTCGAAACTGGGGAAATGCTTTTGATATCTGGGGCCAA
GGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
```

>CDTox B, 124-152, VH-AA con líder SEC ID Nº:56

```
MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE
WMGIFYPGDSSTRYSPSFQGQVTISADKSVNTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRRNWGNAFDIWGQ
GTMVTVSS
```

Fig. 29

VK de 124-152 anti-CDTox B

Segmento V: A27

Segmento J: JK1

SEC ID Nº 58

```
   E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
```

SEQ ID NO:59

```
                                   CDR1 SEC ID Nº:68   (aa) 69 (nt)
                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
 55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                                                CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2 SEC ID Nº:70   (aa) 71 (nt)
    ~~~~~~~~~~~
     R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                        CDR3
                                                                        ~~~
     T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

          CDR3 SEC ID Nº:72   (aa) 73 (nt)
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Q   Y   G   S   S   T   W   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA ACG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

>CDTox B, 124-152, VK-NT con líder SEC ID Nº: 61

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAAT
TGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA
GGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACT
GTCAGCAGTATGGTAGCTCAACGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

>CDTox B, 124-152, VK-AA con líder SEC ID Nº:60

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA
PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTWTFGQGTKVEIK

Fig. 30

Región VH de 124-152 anti-CDTox B

SEC ID Nº:75

		CDR1
5-51línea germinal	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G W	
124-152 VK	- - - - - - - - - - - - - S -	

SEC ID Nº:77

		CDR2
5-51 línea germinal	V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A	
JH3b línea germinal	- - - - - - - - - - - - - - F - - - - - S - - - - - - - - - - - - - - - -	
124-152 VK		

		CDR3
5-51 línea germinal	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R	
JH3b línea germinal		A F D I
124-152 VK	- - - V N - R R N W G N - - - -	

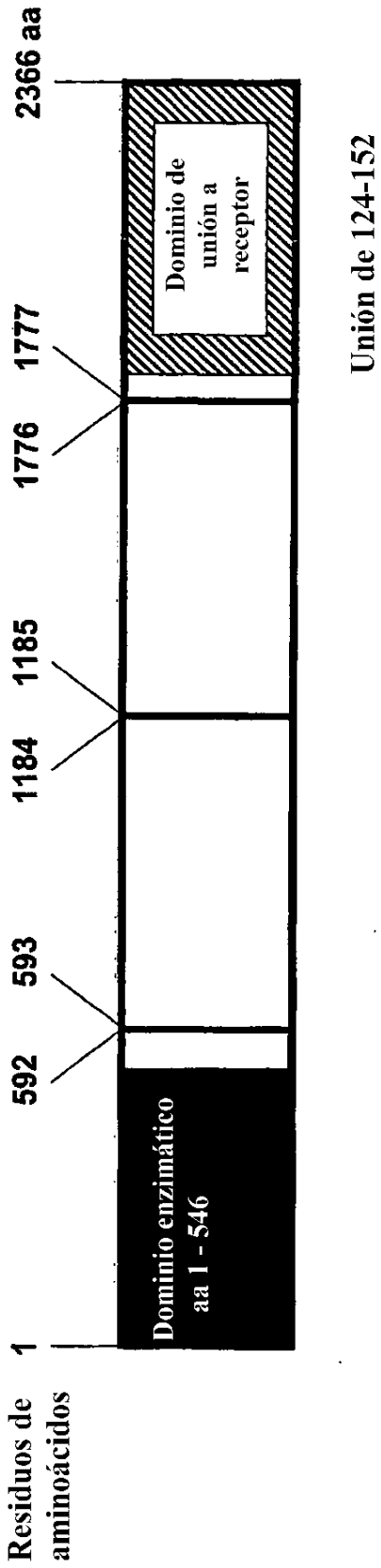
JH3b línea germinal	W G Q G T M V T V S S	SEC ID Nº:74
124-152 VK	- - - - - - - - - - -	(JH3b)

Fig. 31

Región VK de 124-152 anti-CDTox B

Sec id nº:78

```
                                                                                  CDR1
A27 línea germinal      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
124-152 VK              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                      CDR2
A27 línea germinal      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
124-152 VK              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                  SEC ID Nº:80
                                                                  CDR3                SEC ID Nº:79
A27 línea germinal      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P
JK1 línea germinal                                                  W T F G Q G T K V E I K
124-152 VK              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - - - -
(JK1)
```

FIG. 32

MAb 124-152 se une al extremo C de la toxina B de *C. difficile* (TcdB)