

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 334**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2013 PCT/US2013/040399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13170065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2013 E 13787811 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2847590**

54 Título: **Proteína de pared celular CwpV (CD0514) como marcador de diagnóstico para el ribotipo 027 del Clostridium difficile**

30 Prioridad:

11.05.2012 US 201261645964 P
08.05.2013 US 201313889670

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

TECHLAB, INC. (100.0%)
2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358, US

72 Inventor/es:

DAVIS, MANLI, Y.;
WILLIAMS, KRISTA, A.;
BROWNING, JOCELYN, N. y
LYERLY, DAVID, M.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 628 334 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

Proteína de pared celular CwpV (CD0514) como marcador de diagnóstico para el ribotipo 027 del *Clostridium difficile*

Antecedentes de la invención

5 *Clostridium difficile* (*C. difficile*) es la causa común más conocida de diarrea nosocomial y representa aproximadamente 3 millones de casos de diarrea anualmente en los Estados Unidos. Los factores de riesgo de la infección por *C. difficile* (CDI) incluyen la exposición a antibióticos, edad avanzada, y residencia en hospitales o centros de atención a largo plazo. Los síntomas de la CDI oscilan desde la diarrea leve a la colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico. El coste promedio del tratamiento es aproximadamente de \$10.000 por caso. La tasa de mortalidad de la CDI se incrementó de 5,7 muertes por millón de población en 1999 a 23,7 muertes por millón de población en 2004 debido a la aparición de brotes de cepas hipervirulentas. La cepa del ribotipo 027 contribuyó significativamente a la mayor incidencia de la CDI. La precisa diferenciación del brote de la cepa del ribotipo 027 de otras cepas de *C. difficile* puede facilitar la toma de decisiones para las opciones del tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

15 Realizaciones ilustrativas de la invención se describen detalladamente a continuación con referencia a las figuras adjuntas de los dibujos, en donde:

Fig. 1 representa una comparación entre el ELISA de anti-CwpV y los métodos de ribotipificación por PCR, de acuerdo con las realizaciones de la invención;

Fig. 2 representa que los anticuerpos generados contra la región específica del 027 de CwpV solo reconocen el ribotipo 027 de *C. difficile*, de acuerdo con las realizaciones de la invención;

20 Fig. 3 representa la interpretación de los resultados de QUIK CHEK® de la Anti-CwpV; y

Fig. 4 representa una comparación entre QUIK CHEK® de la anti-CwpV y los métodos de ribotipificación por PCR, de acuerdo con las realizaciones de la invención.

Descripción detallada de la invención

25 Realizaciones de la presente invención están dirigidas a métodos de ensayo para diferenciar cepas de *C. difficile* en pacientes basándose en la presencia de un nuevo marcador de antígeno específico de un ribotipo, la Proteína de la Pared Celular V (CwpV). La CwpV específica de un ribotipo se puede usar en un inmunoensayo para la detección de ribotipos de *C. difficile*, especialmente el brote de la cepa 027. En realizaciones, anticuerpos CwpV específicos de la anti-cepa se usan en inmunoensayos para la identificación altamente sensible de la cepa 027 de *C. difficile*.

30 Se han desarrollado varios métodos de tipificación para estudiar la relación genética entre las cepas de *C. difficile* y la asociación entre las cepas de *C. difficile* y la gravedad de la enfermedad. Estos métodos incluyen serotipificación, toxinotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y ribotipificación por PCR. La ribotipificación por PCR es relativamente fácil de realizar, reproducible, y es uno de métodos más discriminatorios para diferenciar las cepas de *C. difficile*.

35 El documento de Patente US 2011/020845 es un ejemplo de un método para detectar específicamente la cepa 027 basándose en un antígeno específico de la cepa 027 en la toxina TcdB.

40 A partir de finales de los 90 se ha observado un aumento de 5 veces la CDI y se sospecha que la propagación de una cepa hipervirulenta contribuyó al brote. Este brote de la cepa se caracterizó como toxinotipo III, electroforesis en gel de campo pulsado tipo 1 de Norte América (NAP1), grupo de análisis de restricción de endonucleasas I (BI) y PCR del ribotipo 027. Varias características del ribotipo 027 contribuyen a mejorar la virulencia de las cepas del ribotipo 027. Además, de las toxinas A y B, las cepas 027 expresan una toxina binaria adicional que puede contribuir a la gravedad de la enfermedad. Las cepas 027 contienen también una delección de 18 pares de bases y una mutación del marco de lectura en el gen *tcdC*, que es el represor de la producción de la toxina. La mutación del marco de lectura puede causar un aumento de la producción de la toxina. Las cepas 027 históricas aisladas en Francia en 1988 fueron susceptibles a fluoroquinolonas y eritromicina pero las mutaciones en *gyrA/B* y los genes del RNA 23s hicieron ribotipo 027 en brotes recientes con resistencia a ambos antibióticos. Las proteínas de superficie alteradas con más alta afinidad a las células epiteliales intestinales humanas pueden también contribuir a la mayor virulencia.

50 Infecciones con cepas 027 se asociaron con resultados más graves en algunos estudios. La dramática alteración de la microbiota intestinal por la cepa 027 es probable que contribuya a su elevada patogenicidad. Sin embargo, otros estudios indicaron la ausencia de correlación entre el ribotipo de la cepa infectante y el resultado de los pacientes. Las controversias podrían haber resultado de la población estudiada y los métodos usados en el análisis estadístico.

Los antibióticos tradicionales de elección para el tratamiento de la CDI son metronidazol y vancomicina. Para pacientes con CDI leve a moderada, el metronidazol y la vancomicina son igualmente eficaces. Para pacientes con

CDI grave causada por cepas no-027, la vancomicina produjo mejores resultados. Se observó una alta tasa de recaídas en pacientes tratados con metronidazol o con vancomicina. En Mayo de 2010, un nuevo fármaco llamado Fidaxomicina (Dificid; Optimer Pharmaceuticals) fue aprobado por la U. S. Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la diarrea asociada al *C. difficile* en adultos. La Fidaxomicina es un antibiótico de estrecho espectro contra a anaerobios gram-positivos. La resistencia a la Fidaxomicina se encontró en *Bacteroides* spp., bacilos gram-negativo aerobios y facultativos y bacilos gram-negativos anaerobios. La Fidaxomicina es igualmente eficaz contra cepas 027 y no-027 de *C. difficile*. El uso de antibióticos de amplio espectro perturba la flora intestinal lo que puede contribuir a la recaída de la infección por *C. difficile*. Estudios recientes indican que el tratamiento con Fidaxomicina dio como resultado una menor tasa de recaída en pacientes infectados por cepas no-027 en comparación con el tratamiento con Vancomicina. Por lo tanto la diferenciación entre las cepas 027 y no-027 puede facilitar la toma de decisiones de los médicos en términos de opciones de tratamiento.

El método de ribotipificación por PCR requiere el aislamiento de colonias de *C. difficile*, el aislamiento de DNA del cultivo originado a partir de colonias puras, la amplificación de DNA por PCR, y la electroforesis en gel. El procedimiento complicado y que consume mucho tiempo no es práctico en los laboratorios clínicos. Las pruebas moleculares comercialmente disponibles utilizan la variación de la secuencia en el gen *tcdC*. Las pruebas basadas en PCR son caras y no específicas porque las mutaciones en el gen *tcdC* están también presentes en otros ribotipos. Las pruebas basadas en anticuerpos, tales como los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs) y los ensayos de flujo lateral, son pruebas rápidas y rentables para la detección de antígenos específicos de patógenos. En realizaciones, el/los antígeno(s) específicos de la cepa 027 se usan como marcador(es) de diagnóstico para la detección de las cepas 027 en inmunoensayos.

Las células *C. difficile* poseen una capa superficial (capa S) fuera de la capa de peptidoglicano. La capa S está presente tanto en las células vegetativas como en las esporas de *C. difficile*. Las proteínas dentro de la capa S median las interacciones huésped-patógeno. Varias proteínas de superficie de *C. difficile* se unen a tejidos gastrointestinales y son factores potenciales de colonización. Las proteínas asociadas con la capa S contienen dos dominios: un dominio conservado de unión a la pared celular y un dominio variable que especifica la función de esa proteína particular. Se predijeron veintiocho proteínas de pared celular (CWPs) en el genoma de la cepa secuenciada 630. Los dominios variables de ciertas CWPs se consideran marcadores de antígeno potenciales para la identificación de la cepa de *C. difficile*.

CwpV (CD0514) es un miembro de las CWPs y consiste en una región N-terminal con un supuesto dominio de unión a la pared celular y un dominio C-terminal que puede promover la agregación. Reynolds y colaboradores, PLOS Pathogens, vol. 7, no. 4, 2011 describen la parte C-terminal de CwpV en la cepa 027.

CwpV se secreta en el medio de cultivo por varias cepas 027. El dominio C-terminal de CwpV es altamente variable entre los ribotipos de *C. difficile*. Las secuencias de aminoácidos específicas de las repeticiones C-terminales encontradas en la proteína CwpV en el ribotipo 027 no están representadas en el genoma de ninguna otra cepa secuenciada hasta la fecha. En realizaciones, la región específica del ribotipo de CwpV se puede usar como un marcador de diagnóstico para las cepas 027.

Los siguientes son ejemplos de procedimientos que se han usado para establecer los ensayos preferidos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no se presentan a modo de limitación.

Ejemplo 1

Un péptido C-terminal específico del ribotipo 027 de CwpV se expresó en *E. Coli* usando técnicas de DNA recombinante. Se generaron anticuerpos policlonales contra CwpV recombinante en cabras. Se desarrolló un ELISA usando anticuerpos policlonales anti CwpV como anticuerpos de captura y anticuerpos policlonales anti CwpV conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) como anticuerpos de detección.

Setenta y dos (72) muestras fecales humanas clínicas que fueron positivas para *C. difficile* se probaron usando este ELISA anti CwpV. La sensibilidad y especificidad del ELISA anti CwpV para la detección de las cepas 027 de *C. difficile* se calcularon usando el método de ribotipificación por PCR como patrón de oro. El punto de corte de este ELISA se fijó para ser una absorbancia de 0,080 medida a una doble longitud de onda (OD450/620nm).

Resultados

Con referencia a la Fig. 1, los resultados del ELISA anti CwpV en 72 muestras fecales humanas se compararon con los resultados del método de ribotipificación por PCR. El ELISA anti CwpV detectó la presencia de la cepa 027 de *C. difficile* en 30 de las 35 muestras positivas de 027 determinadas por el método de ribotipificación por PCR. La sensibilidad y especificidad de ELISA anti CwpV son cada una del 86%.

Ejemplo 2

Un péptido C-terminal específico del ribotipo 027 de CwpV se expresó en *E. Coli*. Se generaron anticuerpos policlonales contra CwpV recombinante en cabras. Se desarrolló un ELISA usando anticuerpos policlonales anti

CwpV como anticuerpos de captura y anticuerpos policlonales anti CwpV conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) como anticuerpos de detección.

Treinta y cuatro (34) cepas de *C. difficile* se inocularon en un caldo de infusión de corazón cerebral (BHI, Oxoid). Los cultivos se hicieron crecer a 37°C durante una noche bajo condiciones anaeróbicas.

- 5 Las cepas de *C. difficile* en cultivos BHI se diluyeron 1:20 en tampón salino fosfato (PBS) y se probaron con ELISA como se describió anteriormente.

Resultados

- 10 Como se muestra en la Fig. 2, los cultivos *C. difficile* que representan treinta y cuatro (34) ribotipos diferentes se probaron con ELISA anti CwpV usando anticuerpos específicos del anti 027. La cepa del ribotipo 027 fue el único ribotipo que se detectó en este ELISA. Los treinta y tres (33) cultivos de *C. difficile* no 027 no se detectaron por este ELISA. El punto de corte de este ELISA se fijó para ser una absorbancia de 0,080 medida a una doble longitud de onda (OD450/620nm).

Ejemplo 3

- 15 Un péptido C-terminal específico del ribotipo 027 de CwpV se expresó en *E. Coli*. Se generaron anticuerpos policlonales contra CwpV recombinante en cabras. Se desarrolló un dispositivo QUIK CHEK® usando anticuerpos policlonales anti CwpV inmovilizados como la línea de ensayo en membrana de vidrio de microfibra como anticuerpos de captura y anticuerpos policlonales anti CwpV conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) como anticuerpos de detección. Se inmovilizaron anticuerpos policlonales anti HRP de conejo sobre la membrana de vidrio de microfibra para formar una línea de control positiva.

- 20 Ciento noventa y cinco (195) muestras se probaron usando este QUIK CHEK® anti CwpV. Muestras fecales clínicas se diluyeron en un diluyente de muestra, mezclado con anticuerpos policlonales anti CwpV conjugados con HRP y aplicados a la membrana de vidrio de microfibra con anticuerpos de captura inmovilizados a través del pocillo de muestra. La mezcla conjugada de la muestra fluyó a través de la membrana de vidrio de microfibra mediante la acción capilar. El dispositivo se incubó a temperatura ambiente durante quince (15) minutos para permitir la captura del antígeno de CwpV en las muestras por los anticuerpos anti CwpV inmovilizados en la línea de ensayo. El exceso de anticuerpos policlonales anti CwpV conjugados con HRP fueron capturados por los anticuerpos policlonales anti HRP de conejo inmovilizados en la línea de control. Después de un lavado rápido de la membrana y la adición de sustrato HRP a través de la ventana de reacción, el dispositivo se incubó a temperatura ambiente durante diez minutos antes de registrar los resultados.

- 30 Con referencia a la Fig. 3, un resultado positivo en QUIK CHEK® anti CwpV se indica mediante dos líneas azules: la línea de control ("C") y la línea de ensayo ("T"). Un resultado negativo en QUIK CHEK® anti CwpV se indica por una única línea azul en el lado de control ("C") de la ventana de reacción sin una línea de ensayo visible en el lado "T" de la ventana de reacción. El resultado se interpreta como no válido cuando la línea de control ("C") no es visible.

Resultados

- 35 Ciento noventa y cinco (195) muestras fecales se probaron en el QUIK CHEK® anti CwpV, en el ensayo de citotoxicidad del cultivo de tejidos, y en los ribotipos de *C. difficile* aislados de muestras que contienen *C. difficile* toxigénico se determinaron por el método de ribotipificación por PCR. Como se muestra en la Figura 4, entre las 195 muestras fecales probadas, ciento setenta y tres (173) muestras se determinó que no contenían *C. difficile* toxigénico por el ensayo de citotoxicidad del cultivo de tejido. Todas las muestras que fueron negativas por el método del cultivo de tejido fueron negativas en QUIK CHEK® anti CwpV. Entre las veintidós (22) muestras determinadas por contener *C. difficile* por el método de citotoxicidad del cultivo de tejido, doce (12) se identificaron como ribotipo 027 por ribotipificación por PCR. Diez (10) de las doce muestras mostraron una reacción positiva cuando se usó QUIK CHEK® anti CwpV. Ninguna de las muestras *C. difficile* no 027 se detectaron por QUIK CHEK® anti CwpV. Usando el método de ribotipificación por PCR como estándar de oro, la sensibilidad y especificidad de QUIK CHEK® anti CwpV se calcularon para ser un 83% y 100% respectivamente.

- 50 En resumen, realizaciones de la presente invención proporcionan CwpV como un marcador de diagnóstico para detectar el ribotipo 027 de *C. difficile* en muestras de heces y en cultivos. La presente invención se ha descrito en relación con realizaciones particulares que están destinadas en todos los aspectos a ser ilustrativas en lugar de restrictivas. Realizaciones alternativas resultarán evidentes para los expertos en la técnica a los que pertenece la presente invención sin apartarse de su alcance.

A partir de lo anterior, se verá que esta invención se adapta bien para alcanzar todos los fines y objetivos expuestos anteriormente aquí junto con otras ventajas que son obvias y que son inherentes al método. Se comprenderá que ciertas características y subcombinaciones de la invención son de utilidad y se pueden emplear sin referencia a otras características y subcombinaciones. Esto está contemplado y está dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar un paciente con una infección por cepas de *C. difficile* del ribotipo 027, método que comprende: obtener una muestra fecal del paciente; determinar que el paciente tiene una infección por *C. difficile*; y determinar si el paciente tiene una infección por cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 mediante la determinación de la presencia de un antígeno del dominio C-terminal de CwpV específico del ribotipo 027 en la muestra fecal.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la determinación de la presencia del antígeno del dominio C-terminal de CwpV específico del ribotipo 027 comprende determinar la presencia del antígeno del dominio C-terminal de CwpV específico del ribotipo 027 usando un inmunoensayo.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, en donde el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o una reacción inmunoquímica en una membrana.
4. El método de la reivindicación 2, en donde el inmunoensayo usa uno o más anticuerpos CwpV específicos de anti ribotipo 027 monoclonales, policlonales o recombinantes como anticuerpos de captura.
- 15 5. El método de la reivindicación 2, en donde el inmunoensayo usa anticuerpos CwpV específicos de anti ribotipo 027 policlonales o monoclonales conjugados con HRP.
6. El método de la reivindicación 2, en donde el inmunoensayo comprende uno o más anticuerpos contra CwpV dirigidos contra CwpV nativo producidos por *C. difficile* o derivados de CwpV por expresión de DNA recombinante en *E. Coli*.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en donde la determinación de la presencia de *C. difficile* de ribotipo 027 comprende además identificar la presencia de un fragmento de DNA que codifica el CwpV específico del ribotipo 027 usando ensayos de amplificación de ácidos nucleicos.

Ribotipificación por PCR

	N=72	027	non-o27
Anti-CwpV	+	30	5
ELISA	-	5	32

FIG. 1.

Ribotipo	Reacción en anti CwpV ELISA
001	-
002	-
003	-
005	-
009	-
010	-
012	-
014	-
015	-
017	-
018	-
019	-
027	+
031	-
032	-
038	-
039	-
043	-
046	-
050	-
051	-
053	-
054	-
056	-
057	-
078	-
081	-
085	-
103	-
106	-
126	-
137	-
251	-
379	-

FIG. 2.

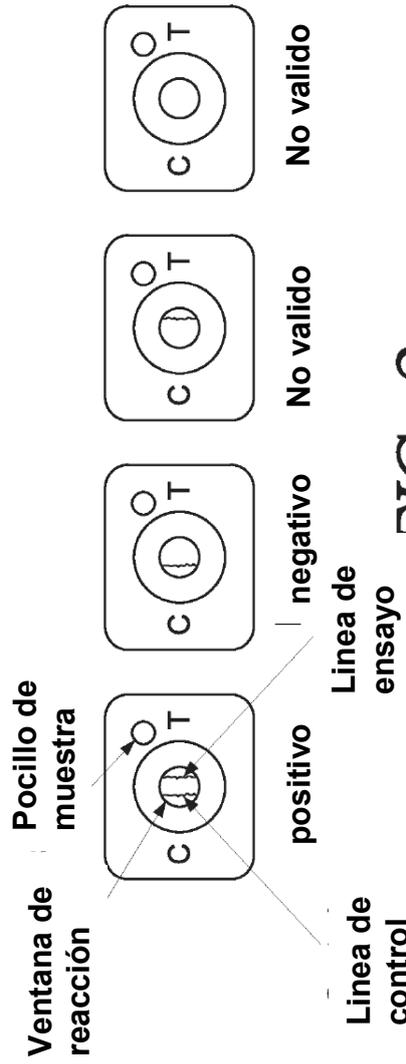


FIG. 3.

N=195	Cultivo de tejidos +		Cultivo de tejidos -
	027 por ribotipificación	No 027 por ribotipificación	
QUIK CHEK en anti CwpV +	10	0	0
QUIK CHEK en anti CwpV -	2	10	173

FIG. 4.