

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 850**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2010 PCT/US2010/023911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10093801**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2010 E 10741728 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2396652**

54 Título: **Diagnóstico del síndrome intestinal inflamatorio con base en la toxina de distensión citoletal**

30 Prioridad:

**11.02.2009 US 151779 P**  
**14.12.2009 US 286250 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2018**

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)**  
**8700 Beverly Boulevard**  
**Los Angeles, California 90048, US**

72 Inventor/es:

**PIMENTEL, MARK y**  
**CHANG, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 656 850 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

Diagnóstico del síndrome intestinal inflamatorio con base en la toxina de distensión citoletal

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al diagnóstico, tratamiento y prevención del síndrome del intestino irritable.

## Antecedentes

10 Todas las publicaciones de este documento se incorporan por referencia en la misma medida que si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada por referencia. La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No es una admisión de cualquier información proporcionada en este documento pertenezca al estado de la técnica o sea relevante para la presente invención reivindicada, o que cualquier publicación referenciada específica o implícitamente pertenezca al estado de la técnica.

20 La toxina de distensión citoletal (CDT) es una toxina proteica bacteriana producida por diversas bacterias patógenas. CDT se compone de tres subunidades, CdtA, CdtB y CdtC, que juntas forman un complejo ternario. CdtB es el componente activo, y CdtA y CdtC participan en el suministro de CdtB a las células. CDT controla las células huésped por daño limitado al ADN mediado por CdtB del cromosoma de la célula huésped, lo que desencadena la respuesta del punto de control del ciclo celular y da como resultado la detención de G2 en las células. CDT también induce la muerte celular apoptótica de los linfocitos, que puede ser relevante para el inicio o la persistencia de la infección crónica por las bacterias productoras. (Ohara y col., J. Biochem, 2004, Vol. 136, No. 4 409-413). Además, la presencia de CdtB es universal entre las bacterias que causan intoxicación alimentaria (por ejemplo, *Campylobacter* (por ejemplo, *C. jejuni*, *C. coli*), *Escherichia coli* (por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC)), *Salmonella*, *Shigella* y *Clostridium difficile*).

30 El síndrome de intestino irritable ("IBS") es un trastorno caracterizado, entre otros, por cólicos, dolor abdominal, hinchazón, estreñimiento y diarrea. IBS puede causar una gran cantidad de malestar y angustia. Si bien muchas personas pueden controlar sus síntomas con dieta, manejo del estrés y medicamentos, para algunas personas el IBS puede ser incapacitante. Es posible que no puedan trabajar, asistir a eventos sociales o incluso viajar distancias cortas. Hasta el 20% de la población adulta tiene síntomas de IBS, convirtiéndolo en uno de los trastornos más comunes diagnosticados por los médicos.

35 Además del síndrome del intestino irritable, otro fenómeno relacionado con el IBS es la dispepsia no ulcerosa (NUD). Esta es una condición por la cual los sujetos experimentan molestias en el área abdominal superior que no pueden explicarse por hallazgos en una endoscopia tal como una úlcera o irritación del revestimiento del estómago o el intestino. Esta condición es otra de las condiciones intestinales funcionales. Existe un reconocimiento general de que muy a menudo existe una superposición entre el IBS y la NUD en un grado que es más que una ocurrencia común (Talley y col., The association between non-ulcer dyspepsia and other gastrointestinal disorders. SCAND J GASTROENTEROL 1985; 20: 896-900). Además, la evidencia reciente sugiere que la gastroenteritis aguda puede precipitar IBS y NUD (Mearin y col., Dyspepsia and irritable bowel syndrome after a Salmonella and gastroenteritis outbreak: One year follow up cohort study. GASTROENTEROL 2005; 129: 98-104). Esta evidencia sugiere que la fisiopatología del IBS y la NUD puede estar relacionada con este ataque inicial por envenenamiento alimentario. Como tal, es probable que los mismos mecanismos estén en juego.

50 En consecuencia, existe una necesidad de diagnóstico, tratamiento, prevención y reducción de la probabilidad de tener o desarrollar IBS, así como NUD. Hasta ahora, no ha habido asociación entre CDT e IBS o CDT y NUD. Basándose en los hallazgos de los inventores, las terapias y los diagnósticos basados en la asociación entre CDT e IBS como se describe en este documento pueden ser beneficiosos para sujetos con IBS, para prevenir o reducir la probabilidad de que un sujeto desarrolle IBS y/o NUD.

55 Abuoun y col., Infect Immun, vol. 73, No.5, mayo de 2005, páginas 3053-3062, describe, entre otros, el uso de ensayos *in vitro* para detectar CDT de *C. jejuni*.

Hickey y col., Infect Immun, vol. 68, No. 12, diciembre 2000, páginas 6535-6541 describe la liberación inducida de interleuquina 8 (IL-8) de células INT407 por células vivas de *C. jejuni* y *C. coli*.

## 60 Sumario de la invención

Las siguientes realizaciones y aspectos de las mismas se describen e ilustran en junto con composiciones y métodos que están destinados a servir como ejemplos e ilustrativos, no limitantes en su alcance.

65 La presente invención se define como se establece en las reivindicaciones independientes adjuntas. Otras características secundarias de la invención se exponen a continuación y en las reivindicaciones dependientes

adjuntas.

Un aspecto de la presente invención proporciona un método de diagnóstico que comprende:

5 detectar la presencia o ausencia en una muestra biológica de:

uno o más marcadores de toxina de distensión citoletal (CDT); o

CDT;

10 en el que la muestra biológica se ha obtenido de un sujeto seleccionado del grupo que consiste en: un sujeto que requiere un diagnóstico con respecto al síndrome de intestino irritable (IBS), un sujeto que requiere un diagnóstico con respecto a un subconjunto de IBS, un sujeto que requiere una determinación de la probabilidad de tener o desarrollar IBS, un sujeto que requiere una determinación de la probabilidad de tener o desarrollar un subconjunto de IBS, un sujeto que desea un pronóstico de una respuesta al tratamiento con antibióticos para el IBS, un sujeto que desea pronóstico de una respuesta al tratamiento antibiótico para reducir la probabilidad de tener IBS y combinaciones de los mismos, un sujeto que requiere una determinación con respecto al crecimiento bacteriano excesivo del intestino delgado (SIBO), un sujeto que requiera una determinación de susceptibilidad a tener SIBO, un sujeto que requiera de un diagnóstico con respecto a la dispepsia no ulcerosa (NUD); y

20 correlacionar la presencia de:

uno o más marcadores de CDT; o  
CDT;

25 con una probable presencia de IBS, una posible presencia de un subconjunto de IBS, una probabilidad de tener o desarrollar IBS, una probabilidad de tener o desarrollar un subconjunto de IBS, una mayor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para el IBS, una mayor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS, una probable presencia de SIBO, una mayor susceptibilidad a tener SIBO, y/o una posible presencia de NUD; o

30 correlacionar una ausencia de:

uno o más marcadores de CDT; o  
CDT;

35 con una probable ausencia de IBS, una probable ausencia del subconjunto de IBS, una menor probabilidad de tener o desarrollar IBS, una menor probabilidad de tener o desarrollar el subconjunto de IBS, una menor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para el IBS, una menor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS, una probable ausencia de SIBO, una menor susceptibilidad a tener SIBO, y/o una probable ausencia de NUD;

40 donde uno o más marcadores de CDT se seleccionan del grupo que consiste en:

una o más subunidades CdtA, CdtB, CdtC de CDT;  
uno o más anticuerpos para CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo; y/o

45 uno o más ácidos nucleicos que codifican CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo.

En una realización, el método puede comprender además identificar al sujeto que requiere el diagnóstico con respecto al IBS, el sujeto que requiere el diagnóstico con respecto al subconjunto del IBS, el sujeto que requiere la determinación de la probabilidad de tener o desarrollar IBS, el sujeto que requiere la determinación de la probabilidad de tener o desarrollar un subconjunto de IBS, el sujeto que requiere el diagnóstico con respecto a NUD, el sujeto que requiere la determinación con respecto a SIBO, el sujeto que requiere la determinación de la susceptibilidad a tener SIBO, el sujeto que desea el pronóstico de la respuesta al tratamiento con antibiótico para el IBS, y/o el sujeto que desea el pronóstico de la respuesta al tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS.

50

55

En otra realización, el método puede comprender además elegir una terapia antibiótica para el sujeto basada en la posible presencia de IBS, la posible presencia del subconjunto de IBS, la probabilidad de tener o desarrollar IBS, la probabilidad de tener o desarrollar el subconjunto IBS, la posible presencia de NUD, la probable presencia de SIBO, la mayor susceptibilidad a tener SIBO, la mayor probabilidad de tener el resultado beneficioso del tratamiento antibiótico para el IBS, y/o la mayor probabilidad de tener el resultado beneficioso de tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS.

60

En una realización, el subconjunto de IBS puede seleccionarse del grupo que consiste en IBS con estreñimiento predominante, IBS con diarrea predominante, IBS mixto, IBS indeterminado e IBS sensible a antibióticos.

65

En una determinada realización, uno o más marcadores de CDT pueden ser un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo. En una realización, el CdtB puede ser CdtB de *Campylobacter jejuni*. En una determinada realización, el CdtB de *Campylobacter jejuni* tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 5.

5 En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo en 5 a 22 residuos contiguos de la SEQ ID NO: 5. En una determinada realización, el epítipo puede estar en 17 residuos contiguos como se describe por la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el anticuerpo puede ser capaz de unirse específicamente a un epítipo en la SEQ ID NO: 4.

10 En otra realización, el CdtB puede ser CdtB de *Campylobacter coli* y tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el CdtB puede ser CdtB de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* o *Clostridium difficile*.

15 Para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención, la presente especificación describe adicionalmente un método que comprende: proporcionar una composición para provocar una respuesta inmune específica, que comprende: un agente seleccionado del grupo que consiste en un fragmento de toxina de distensión citoletal (CDT) incapaz de causar el síndrome de intestino irritable (IBS), CdtA incapaz de causar IBS, CdtB incapaz de causar IBS, CdtC incapaz de causar IBS, muteína de CDT incapaz de causar IBS, un fragmento de muteína de CDT incapaz de causar IBS, muteína de CdtA incapaz de causar IBS, muteína de CdtB incapaz de causar IBS, muteína de CdtC incapaz de causar IBS, una bacteria que comprende un gen de CDT mutado que hace que la bacteria sea incapaz de causar IBS, y combinaciones de los mismos; y administrar la composición a un sujeto que lo necesita para provocar una respuesta inmune específica. En diversas realizaciones, provocar la respuesta inmune específica reduce la probabilidad del sujeto de desarrollar o tener IBS, o reduce la probabilidad del sujeto de desarrollar o tener dispepsia no ulcerosa (NUD).

25 En una realización, la bacteria puede ser *Campylobacter jejuni* 81-176 que no pudo expresar una toxina B de distensión citoletal funcional (CdtB) debido a una mutación de inserción en el gen para CdtB. En una cierta realización, la bacteria puede ser eliminada. En otra realización, la bacteria puede ser atenuada.

30 Para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención, la presente especificación describe además un método que comprende: proporcionar un inhibidor de la toxina de distensión citoletal (CDT) y/o un neutralizador de CDT para reducir la probabilidad de desarrollar o tener síndrome de intestino irritable (IBS) o para reducir la probabilidad de desarrollar o tener dispepsia no ulcerosa (NUD); y administrar el inhibidor de CDT y/o el neutralizador de CDT a un sujeto que lo necesita.

35 En una realización, el inhibidor de CDT y/o el neutralizador de CDT puede ser un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CDT o a una subunidad de CDT. En una realización, la subunidad de CDT puede ser CdtB. En una determinada realización, el CdtB puede ser CdtB de *Campylobacter jejuni*. En una determinada realización, el CdtB de *Campylobacter jejuni* puede tener una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 5.

40 En otra realización, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en 5 a 22 residuos contiguos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el epítipo está en 17 residuos contiguos como se describe en la SEQ ID NO: 3.

45 En otra realización, el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo en la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el CdtB puede ser CdtB de *Campylobacter coli* y puede tener una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el CdtB puede ser CdtB de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* o *Clostridium difficile*.

50 Para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención, la presente especificación describe adicionalmente un anticuerpo purificado que se une específicamente a la toxina de distensión citoletal (CDT) una subunidad de CDT e inhibe o neutraliza CDT o la subunidad de CDT. En una realización, la subunidad de CDT puede ser CdtB. En una determinada realización, el CdtB puede ser CdtB de *Campylobacter jejuni*. En una realización, el CdtB de *Campylobacter jejuni* puede tener una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 5.

55 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un epítipo en 5 a 22 residuos contiguos de la SEQ ID NO: 5. En una realización, el epítipo puede estar en 17 residuos contiguos como se describe en la SEQ ID NO: 3.

60 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un epítipo en la SEQ ID NO: 4.

65 En otra realización, el CdtB es CdtB de *Campylobacter coli* y tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 1.

Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, diversas características de las realizaciones de la invención.

Breve descripción de las figuras

5 Las realizaciones a modo de ejemplo se ilustran en las figuras a las que se hace referencia. Se pretende que las realizaciones y figuras descritas en este documento se consideren ilustrativas en lugar de restrictivas.

10 La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de CdtB de *Campylobacter coli* (SEQ ID NO: 1) relevante para ciertas realizaciones de la presente invención.

La Figura 2 representa la secuencia de ácido nucleico de CdtB de *Campylobacter coli* (SEQ ID NO: 2) relevante para ciertas realizaciones de la presente invención.

La Figura 3 representa un nervio teñido con anticuerpos contra CdtB relevante para ciertas realizaciones de la presente invención.

15 La Figura 4 representa la secuencia de aminoácidos de CdtB de *Campylobacter jejuni* subespecie *jejuni* 81-176 (SEQ ID NO: 5) relevante para ciertas realizaciones de la presente invención.

Descripción de la invención

20 Todas las referencias citadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad como si se expusieran completamente. A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3<sup>a</sup> ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5<sup>a</sup> ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporcionan a un experto en la materia una guía general de muchos de los términos usados en la presente solicitud. Para referencias sobre cómo preparar anticuerpos descritos en este documento, véase D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY, 1988); Kohler y Milstein, (1976) Eur. J. Immunol. 6: 511; Queen y col., Patente de los Estados Unidos Número 5.585.089; y Riechmann y col., Nature 332: 323 (1988).

35 Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Los "resultados beneficiosos" pueden incluir, pero de ninguna manera se limitan a, disminuir o aliviar la gravedad de la condición de enfermedad, prevenir el empeoramiento de la enfermedad, ralentizar la progresión de la enfermedad, prevenir el desarrollo de la enfermedad, reducir la probabilidad de desarrollar la enfermedad y curar la enfermedad.

40 "Mamífero" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, que incluye, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés, y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y conejillos de Indias, y similares. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, se pretende que los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean macho o hembra, estén incluidos dentro del alcance de este término.

50 "Condiciones" y "enfermedades", tal como se usan en la presente memoria, pueden incluir, pero de ninguna manera se limitan a, cualquier forma de síndrome de intestino irritable (por ejemplo, diarrea predominante, estreñimiento predominante, mezcla (estreñimiento y diarrea) e indeterminado), alteración de la función intestinal y patrón irregular del intestino.

"Patrón irregular del intestino" como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en la consistencia de la forma de las heces y/o un cambio en la frecuencia de las deposiciones.

55 "Tratamiento" y "tratar", tal como se usa en la presente memoria, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas (por ejemplo, para reducir la probabilidad de tener la condición o enfermedad), donde el objetivo es prevenir o retrasar (disminuir) la condición o trastorno patológico objetivo, incluso si el tratamiento no tiene éxito en última instancia. Los que requieren tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la condición o trastorno, así como aquellos propensos a tener la condición o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la condición o trastorno (por ejemplo, reducir la probabilidad de tener la condición o trastorno).

65 "Anticuerpo" o "anticuerpos" como se usan en este documento incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, variantes de anticuerpos tales como Fv monocatenario (recombinante), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y fragmentos inmunológicamente activos de anticuerpos.

Anticuerpo "purificado" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Por ejemplo, la composición que comprende un anticuerpo como se describe en este documento se purificará a partir de un cultivo celular u otro entorno sintético a más del 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% en peso del anticuerpo.

"Se une específicamente" como se usa en este documento se refiere al acto de un anticuerpo que se une a su antígeno y está destinado a excluir la unión no específica de bajo nivel que puede ocurrir entre proteínas aleatorias. "Se une específicamente" como se usa en el presente documento no pretende y no implica que el anticuerpo no se una a ninguna proteína distinta a las proteínas o polipéptidos como se describe aquí ya que los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada con cualquier proteína que incluya el epítipo relevante.

"Muteína de CDT" se refieren a una molécula de CDT o una subunidad de CDT que tiene uno o más aminoácidos que han sido mutados para alterar sus propiedades (por ejemplo, incapacidad para causar condiciones o enfermedades descritos en este documento, capacidad para provocar una respuesta inmune específica y/o para servir como una vacuna). Las mutaciones incluyen la sustitución, eliminación y/o inserción de uno o más aminoácidos.

En un nuevo modelo de rata postinfecciosa diseñado para investigar la fisiopatología del síndrome del intestino irritable (IBS), las ratas desarrollaron heces alteradas 3 meses después de la eliminación de la infección por *Campylobacter jejuni*. Una toxina común entre los numerosos patógenos bacterianos que se sabe que causan gastroenteritis aguda e IBS postinfeccioso es la toxina de distensión citoletal (CDT). Los inventores intentaron determinar si CDT juega un papel en la función intestinal alterada a largo plazo después de la gastroenteritis usando un modelo de rata de IBS postinfeccioso. Los inventores encontraron que CDT es importante en el desarrollo de la función intestinal alterada crónica en un modelo de rata de IBS postinfeccioso. Las ratas expuestas a una cepa de *Campylobacter* que era deficiente en CDT tenían patrones intestinales más consistentes con las ratas normales.

Además, los inventores descubrieron que dos anticuerpos distintos para la subunidad B de la toxina de distensión citoletal parecen unir elementos neuromusculares intestinales de la rata incluso en ausencia de exposición previa a *C. jejuni*. Este hallazgo sugiere que los anticuerpos anti-CdtB pueden reaccionar con una proteína o estructura del huésped con homología de secuencia o similitud estructural con CdtB. También plantea la posibilidad de que el mimetismo molecular y las respuestas inmunitarias aberrantes del huésped puedan mediar secuelas GI crónicas (por ejemplo, PI-IBS) de la infección por *C. jejuni*. Como tal, puede haber una proteína en los nervios que es similar a CDT y el sistema inmune reacciona a esa proteína después de la infección con *C. jejuni*. Esto puede causar una alteración a largo plazo en la función intestinal. Por lo tanto, la detección del anticuerpo en el torrente sanguíneo humano podría permitir el diagnóstico de IBS.

Varias realizaciones de la presente invención se basan en los hallazgos de que la CDT es importante en el desarrollo de la función intestinal crónica alterada en un modelo de IBS postinfeccioso en ratas y que los anticuerpos anti-CdtB pueden reaccionar con una proteína huésped con homología a CdtB.

Para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención, la presente especificación describe además agentes capaces de inhibir y/o neutralizar CDT ("inhibidor de CDT" y "neutralizador de CDT").

En diversas realizaciones, el agente es un anticuerpo purificado que se une específicamente a CDT e inhibe y/o neutraliza la actividad de CDT. Estos anticuerpos también son útiles para fines adicionales, como el diagnóstico de la probabilidad de que un sujeto tenga IBS, como se analiza a continuación. Las secuencias de aminoácidos de CDT son conocidas en la técnica.

En una realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un epítipo en el dominio de unión a receptor de CDT.

En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a la subunidad CdtA de CDT. En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a la subunidad CdtB de CDT. En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a la subunidad CdtC de CDT.

Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de CdtB es la toxina B de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni*, que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) como se muestra en la Figura 4.

Otro ejemplo de secuencia de aminoácidos de CdtB es la toxina B de distensión citoletal *Campylobacter coli*, que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 2), como se muestra en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

De acuerdo con esto, en una realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a la SEQ ID NO: 5 (CdtB de *C. jejuni*). En diversas realizaciones, el anticuerpo purificado se une específicamente a una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 5.

## ES 2 656 850 T3

En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a la SEQ ID NO: 1 (CdtB de *C. coli*). En diversas realizaciones, el anticuerpo purificado se une específicamente a una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1.

5 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 17 residuos de CdtB (por ejemplo, 17 residuos de las SEQ ID NOs: 1 o 5). En una realización, el péptido de 17 residuos tiene la siguiente secuencia: LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3).

10 En otras realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un péptido de 17 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 17 residuos contiguos de CdtB (por ejemplo, 17 residuos contiguos de las SEQ ID NOs: 1 o 5). En una realización, los 17 residuos de CdtB tienen la siguiente secuencia: LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3).

15 En otras realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende 17 residuos que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 17 residuos contiguos de CdtB (por ejemplo, 17 residuos de las SEQ ID NOs: 1 o 5). En una realización, los 17 residuos contiguos de CdtB tienen la siguiente secuencia: LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3).

20 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 18 residuos que tiene la siguiente secuencia: CLDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 4). La cisteína en el extremo terminal N se añadió a la SEQ ID NO: 3 con fines de conjugación.

25 En otras realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende 18 residuos que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con CLDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 4).

30 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de CdtB (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de las SEQ ID NOs: 1 o 5). En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de CdtB (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de las SEQ ID NOs: 1 o 5). Los residuos contiguos de la SEQ ID NO: 1 incluyen aquellos que comienzan en cualquier aminoácido y terminan en cualquier aminoácido de la SEQ ID NO: 1. Los residuos contiguos de la SEQ ID NO: 5 incluyen aquellos que comienzan en cualquier aminoácido y terminan en cualquier aminoácido de la SEQ ID NO: 5.

40 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos que tiene al menos 80%, 85 %, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3) (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de SEQ ID NO: 3). En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de la SEQ ID NO: 3). Los residuos contiguos de la SEQ ID NO: 3 incluyen los que comienzan en cualquier aminoácido y terminan en cualquier aminoácido de la SEQ ID NO: 3.

50 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 17 residuos codificado por la secuencia del gen de CdtB. En realizaciones particulares, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 17 residuos codificado por la SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos codificado por la SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos 80%, 85 %, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos codificados por la SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones, el anticuerpo purificado se une específicamente a un polipéptido que comprende 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos codificados por la SEQ ID NO: 2.

60 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico que tiene la siguiente secuencia: CTTGATTATGCAATTACAGGAAATTCAAATAGACAACAAACCTATACTCCA (SEQ ID NO: 6), que codifica el péptido de 17 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un polipéptido que comprende un péptido codificado por la SEQ ID NO: 6.

65 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a CdtB purificado a partir de *E. coli* que

sobreexpresa un ORF de CdtB casi de longitud completa. (Véase *Infection and Immunity*, diciembre de 2000, páginas 6535-6541, Vol. 68, No. 12, incorporado en este documento por referencia en su totalidad como si estuviera completamente expuesto).

5 En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a CDT e inhibe la unión de CDT a su receptor. En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a CDT y logra al menos 25%, 30%, 40% o 50% de neutralización; por ejemplo, de  $10^4$  unidades infecciosas de bacterias o CDT en un ensayo de 24 horas a una concentración de 1 µg de anticuerpo por mililitro.

10 Un experto en la técnica será capaz de producir los anticuerpos descritos en este documento sin una excesiva experimentación a la luz de lo divulgado en la presente memoria, incluyendo los ejemplos.

Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, es típicamente inmunizado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. El agente inmunizante típicamente incluirá CDT o un fragmento del mismo. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos luego se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (véanse las págs. 59-103 en Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* Academic Press). Las líneas celulares inmortalizadas generalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

30 En otra realización, los anticuerpos para un epítipo para CDT como se describe en este documento o un fragmento del mismo son anticuerpos humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del marco de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo del receptor ni en la CDR importada o las secuencias marco. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco (FR) son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones y col., 1986. *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col., 1988. *Nature* 332: 323). -329; Presta. 1992. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593 - 596). La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (véanse, por ejemplo, Jones y col., 1986. *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col., 1988. *Nature* 332: 323-327; y Verhoeyen y col., 1988). *Science* 239: 1534-1536), mediante sustitución de las CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (por ejemplo, patente de los Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

55 En otra realización, los anticuerpos para un epítipo de CDT como se describe en la presente memoria o un fragmento de los mismos son anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en el arte, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, 1991. *J. Mol. Biol.* 227: 381-388; Marks y col., 1991. *J. Mol. Biol.* 222): 581-597) o la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (por ejemplo, Cole y col., 1985. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* Liss; Boerner y col., 1991. *J. Immunol.* 147 (1): 86-95). De forma similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en humanos en la mayoría de los aspectos, incluida la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5,625,126; 5,633,425;

5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., 1992. *Bio/Technology* 10: 779-783; Lonberg y col., 1994. *Nature* 368: 856 - 859; Morrison. 1994. *Nature* 368: 812-13; Fishwild y col., 1996. *Nature Biotechnology* 14: 845-51; Neuberger. 1996. *Nature Biotechnology* 14: 826; Lonberg y Huszar. 1995. *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93. La patente de los Estados Unidos N° 6.719.971 también proporciona orientación sobre métodos para generar anticuerpos humanizados.

Para determinar qué anticuerpos monoclonales son inhibidores de CDT o neutralizadores de CDT, se puede realizar el uso de un ensayo de cribado. Los ensayos de cribado son conocidos en la técnica y pueden realizarse sin excesiva experimentación. (por ejemplo, AbuOun y col., *Cytolethal Distending Toxin (CDT)-Negative Campylobacter jejuni Strains and Anti-CDT Neutralizing Antibodies Are Induced during Human Infection but Not during Colonization in Chickens*. *INFECT IMMUN.* Mayo de 2005; 73(5): 3053-3062). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden probarse para determinar su capacidad para neutralizar la actividad de CDT *in vitro* de especies bacterianas positivas para CDT (por ejemplo, cepas de *C. jejuni* positivas para CDT). Los lisados de cepas de *C. jejuni* positivas para CDT se tratan previamente con antisueros anti-*C. jejuni* de conejo, y la actividad de CDT se prueba para neutralización.

En otras realizaciones, el agente puede ser un inhibidor competitivo o no competitivo de un receptor de CDT (por ejemplo, un ligando competitivo o no competitivo para un receptor de CDT). En diversas realizaciones, el agente también es capaz de una modificación covalente o no covalente con CDT, su receptor o un componente de un efector en la ruta. En una realización, el agente es un antagonista del receptor de CDT para evitar la detención de G2 en la célula (por ejemplo, vuelve a activar la célula).

En otra realización, el agente puede ser un agente capaz de inhibir el operón de CDT. En una realización, el agente puede ser una proteína represora reguladora capaz de unirse al operador y prevenir la transcripción de los genes en el operón.

Un método de purificación de CDT a partir de una muestra biológica que contiene CDT, puede comprender proporcionar una matriz de afinidad que comprende un anticuerpo que se une específicamente a CDT unido a un soporte sólido; poner en contacto la muestra biológica con la matriz de afinidad, para producir un complejo matriz de afinidad-CDT; separando el complejo matriz de afinidad-CDT del resto de la muestra biológica; y liberando CDT de la matriz de afinidad.

Un método para tratar IBS en un sujeto que lo necesita puede comprender proporcionar una composición que comprende un inhibidor de CDT y/o neutralizador de CDT, y administrar la composición al sujeto para tratar el IBS. En una realización, el IBS es causado por CDT o es el resultado de una exposición a CDT; particularmente, CDT en los intestinos. En diversas realizaciones, el inhibidor de CDT y/o el neutralizador de CDT pueden ser como se describió anteriormente.

Un método para prevenir el IBS o reducir la probabilidad de desarrollar IBS en un sujeto que lo necesita, puede comprender proporcionar una composición que comprende un inhibidor de CDT y/o neutralizador de CDT y administrar la composición al sujeto para prevenir el IBS o reducir la probabilidad de desarrollar IBS en el sujeto. En una realización, el IBS es causado por CDT o es el resultado de una exposición a CDT; particularmente, CDT en los intestinos. En diversas realizaciones, el inhibidor de CDT y/o neutralizador de CDT puede ser un inhibidor de CDT y/o un neutralizador de CDT como se describió anteriormente.

Una composición para provocar una respuesta inmune específica en un sujeto puede ser, por ejemplo, una vacuna.

En una realización, la composición es útil para prevenir el IBS, para reducir la probabilidad de desarrollar o tener IBS, y/o para tratar el IBS. En una realización, la composición comprende un fragmento de CDT, CdtA, CdtB, CdtC, muteína de CDT, muteína de CdtA, muteína de CdtB, muteína de CdtC, o combinaciones de las mismas que no causarían IBS. Tales muteínas se pueden usar para evitar que CDT cause IBS o para reducir la probabilidad de que CDT cause IBS. En otra realización, la composición comprende bacterias muertas, atenuadas o inactivadas por calor que contienen CDT o el gen de CDT. En otra realización, la composición comprende bacterias con un gen mutado de CDT (por ejemplo, una cepa de mutada *C. jejuni*). En una realización adicional, la composición puede comprender adicionalmente un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvantes inorgánicos (por ejemplo, sales de aluminio (fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio)), adyuvantes orgánicos, adyuvantes a base de aceite y virosomas.

Un ejemplo de una muteína de CDT y una muteína de CdtB es la cepa de *Campylobacter jejuni* 81-176 con una mutación de inserción en CdtB. Por lo tanto, en una realización particular, la composición para estimular una respuesta inmune específica en un sujeto comprende la cepa de *Campylobacter jejuni* 81-176 con una mutación de inserción en CdtB.

En otra realización, la composición comprende una cantidad de una cepa bacteriana que no pudo expresar CDT o una CDT funcional debido a una mutación en el gen para CDT (por ejemplo, una mutación de inserción en el gen para CdtB). En una realización, la composición comprende la cepa de *Campylobacter jejuni* 81-176 que no pudo

expresar una toxina de distensión citoletal (CdtB) activa o funcional debido a una mutación de inserción en el gen para CdtB.

También se describe aquí un método para provocar una respuesta inmune específica en un sujeto, con el fin de ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención. En una realización, el método previene el IBS o reduce la probabilidad de que un sujeto desarrolle o tenga IBS. En otra realización, el método evita NUD o reduce la probabilidad de que un sujeto desarrolle NUD. En una realización, el método comprende proporcionar una composición para provocar una respuesta inmune específica como se describió anteriormente y administrar la composición al sujeto.

La administración de la composición al sujeto se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, y particularmente en terapia de vacunación (por ejemplo, inyección, infusión). En otra realización, la composición se puede administrar más de una vez; por ejemplo, se puede administrar "una dosis o dosis de refuerzo" al sujeto.

La presente invención proporciona un método para diagnosticar IBS o determinar la probabilidad de que un sujeto tenga IBS. En diversas realizaciones, el IBS es IBS postinfección. En una realización, el método comprende detectar la presencia o ausencia de CDT o uno o más marcadores que indican una exposición previa a CDT ("marcador de CDT") en un sujeto que lo necesita y correlacionar la presencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una probable presencia de IBS o correlacionar la ausencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una probable ausencia de IBS. No todos los sujetos con la presencia de CDT o la presencia de uno o más marcadores de CDT tendrán o desarrollarán IBS; sin embargo, este método proporciona una indicación sobre la probabilidad de que el sujeto tenga IBS o desarrolle IBS. La determinación de una posible presencia de IBS puede correlacionarse y/o confirmarse adicionalmente mediante otros métodos de diagnóstico para IBS, o con síntomas de IBS conocidos en la técnica. Además, la determinación de una probable ausencia de IBS también puede correlacionarse y/o confirmarse adicionalmente mediante otros métodos de diagnóstico para IBS o síntomas de IBS conocidos en la técnica para descartar IBS.

La presente invención proporciona un método para diagnosticar NUD o determinar la probabilidad de un sujeto de tener NUD. En diversas realizaciones, NUD es NUD postinfección. En una realización, el método comprende detectar la presencia o ausencia de CDT o uno o más marcadores que indican una exposición previa a CDT ("marcador de CDT") en un sujeto que lo necesita y correlacionar la presencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una posible presencia de NUD o la correlación de la ausencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una probable ausencia de NUD. No todos los sujetos con la presencia de CDT o la presencia de uno o más marcadores de CDT tendrán o desarrollarán NUD; sin embargo, este método proporciona una indicación sobre la probabilidad de que el sujeto tenga NUD o desarrollará NUD. La determinación de una posible presencia de NUD puede correlacionarse y/o confirmarse con otros métodos de diagnóstico para NUD, o con síntomas de NUD conocidos en la técnica. Además, la determinación de una posible ausencia de NUD también se puede correlacionar y/o confirmar adicionalmente mediante otros métodos de diagnóstico para NUD o síntomas de IBS conocidos en la técnica para descartar NUD.

En realizaciones adicionales, las determinaciones anteriores pueden usarse para dirigir el tratamiento para el sujeto. En una realización, un sujeto con la probable presencia de IBS o una probabilidad de tener IBS puede tratarse con una o más terapias para IBS. En otra realización, un sujeto con la presencia probable de NUD puede tratarse con una o más terapias para NUD. Un experto en la técnica podrá seleccionar un tratamiento disponible para IBS o NUD basado en el diagnóstico de IBS o NUD. Por ejemplo, antibióticos como la rifaximina y la neomicina pueden usarse para tratar IBS o NUD. Particularmente, la rifaximina se puede usar para tratar IBS con diarrea predominante, y una combinación de rifaximina/neomicina se puede usar para tratar IBS con estreñimiento predominante.

En diversas realizaciones, los marcadores de CDT pueden ser anticuerpos contra CDT o un remanente de CDT. Los métodos para detectar CDT o uno o más marcadores de CDT son conocidos en la técnica y un experto en la materia será capaz de detectar CDT sin experimentación excesiva. En una realización, el método comprende detectar la presencia o ausencia de una subunidad de CDT o uno o más marcadores de una subunidad de CDT. En una realización, la subunidad es CdtA. En otra realización, la subunidad de CDT es CdtB. En otra realización, la subunidad de CDT es CdtC. Por ejemplo, detectar la presencia de CDT o detectar la presencia de uno o más marcadores de CDT se puede hacer poniendo en contacto una muestra biológica del sujeto con uno o más sustratos capaces de detectar la presencia de CDT o detectar la presencia de uno o más marcadores de CDT. En diversas realizaciones, uno o más sustratos son los anticuerpos contra CDT, CdtA, CdtB, CdtC y fragmentos de los mismos como se describe en este documento.

En otra realización, puede realizarse un método para detectar la presencia de CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo proporcionando una sonda de ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que codifica CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo para aislar el ácido nucleico que codifica CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo a partir de una muestra biológica de un sujeto. En diversas realizaciones, las sondas de ácido nucleico pueden marcarse (por ejemplo, marcarse fluorescentemente). La detección puede comprender además amplificar el ácido nucleico aislado que codifica CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo. La presencia del ácido nucleico aislado que codifica CDT, CdtA, CdtB,

CdtC o un fragmento del mismo se correlaciona con la probabilidad de que el sujeto esté expuesto a CDT. Como tal, la exposición a CDT puede indicar que el paciente puede tener IBS.

En realizaciones alternativas, los resultados pueden correlacionarse adicionalmente con pruebas o síntomas adicionales para llegar a un diagnóstico de IBS. Una ausencia del ácido nucleico aislado que codifica CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo se correlaciona con una menor probabilidad de que el sujeto haya estado expuesto a CDT; alternativamente, se pueden realizar pruebas adicionales en el sujeto (por ejemplo, en muestras biológicas del sujeto) para correlacionar o confirmar adicionalmente los resultados para diagnosticar si el sujeto tiene IBS. Por ejemplo, el sujeto puede someterse a prueba para detectar la presencia o ausencia de uno o más marcadores de CDT; por ejemplo, la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CDT, como se describe en el presente documento. La presencia o ausencia de los anticuerpos anti-CDT puede proporcionar información de correlación adicional para que un médico llegue a un diagnóstico de si el sujeto tiene IBS.

En varias realizaciones, uno o más marcadores de CDT son un anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo. En una realización particular, uno o más marcadores de CDT son un anticuerpo que se une específicamente a CdtB o a un fragmento del mismo. El anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo puede ser uno o más de los anticuerpos descritos en este documento. Como tal, en una realización, el método para diagnosticar IBS o IBS postinfeccioso o determinar una posible presencia o ausencia de IBS o PI-IBS en un sujeto que lo necesita, comprende detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo en el sujeto; y correlacionar la presencia del anticuerpo con la probabilidad de tener IBS o PI-IBS, o correlacionar la ausencia del anticuerpo con la probabilidad de no tener IBS o PI-IBS. La determinación de si el sujeto tiene anticuerpos contra CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo es importante para la determinación de si el paciente puede tener IBS. En una realización, la detección de la presencia o ausencia del anticuerpo se realiza en una muestra biológica obtenida del sujeto. En otra realización, la detección de la presencia o ausencia del anticuerpo se realiza en una muestra de sangre obtenida del sujeto.

Un experto en la técnica apreciará fácilmente métodos que pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica, citometría de flujo, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), radioinmunoensayos y purificación por afinidad.

En una realización, la detección de la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo se puede realizar poniendo en contacto CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo con una muestra biológica obtenida del sujeto para aislar el anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo, en donde el aislamiento del anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo indica la presencia del el anticuerpo y la falta de aislamiento del anticuerpo que se une específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo indica la falta del anticuerpo. En diversas realizaciones, el fragmento de CDT, CdtA, CdtB, CdtC pueden ser los fragmentos que se describen en este documento (por ejemplo, péptido de 17 residuos de CdtB). Como ejemplo, una matriz de afinidad que comprende CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo se puede unir a un soporte sólido; la muestra biológica puede ponerse en contacto con la matriz de afinidad para producir un complejo de matriz de afinidad-anticuerpo (si el anticuerpo está presente); el complejo de matriz de afinidad-anticuerpo se puede separar del resto de la muestra biológica; y el anticuerpo puede liberarse de la matriz de afinidad. En otro ejemplo, una etiqueta (por ejemplo, etiqueta fluorescente) se puede colocar en el CDT, CdtA, CdtB, CdtC o el fragmento del mismo; el CDT marcado, CdtA, CdtB, CdtC o el fragmento del mismo pueden ponerse en contacto con una muestra biológica para permitir que el anticuerpo (si está presente) se una específicamente a CdtA, CdtB, CdtC o fragmento marcado del mismo. En diversas realizaciones, el CdtA, CdtB, CdtC o fragmento del mismo marcado puede separarse y analizarse para su unión al anticuerpo.

En otra realización, un método para diagnosticar IBS, detectar una probabilidad de tener IBS, o un método para determinar la susceptibilidad de un sujeto a tener IBS, comprende detectar la presencia o ausencia de una proteína huésped con homología con CDT o una subunidad de CDT en un sujeto y correlacionar la presencia de la proteína huésped con una probable presencia de IBS o una mayor susceptibilidad al desarrollo de IBS o correlacionar la ausencia de la proteína huésped con una probable ausencia de IBS o una menor susceptibilidad al desarrollo de IBS. En ciertas realizaciones, el IBS es PI-IBS. Se pueden realizar pruebas adicionales para correlacionar o confirmar aún más la presencia o ausencia de IBS o PI-IBS o para confirmar la susceptibilidad mayor o menor de desarrollar IBS o PI-IBS. En una realización, la subunidad de CDT es CdtA. En otra realización, la subunidad de CDT es CdtB. En otra realización, la subunidad de CDT es CdtC. En una realización, la proteína huésped tiene 100% de homología con CDT. En otra realización, la proteína huésped tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de homología con CDT. En una realización, la proteína huésped tiene 100% de homología con una subunidad de CDT. En otra realización, la proteína huésped tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de homología con la subunidad de CDT. En una realización particular, la proteína huésped tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con CdtB. En otras realizaciones, la proteína huésped tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 17 residuos contiguos de CdtB. En otras realizaciones, la proteína huésped tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de

homología con 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de CdtB. En diversas realizaciones, el CdtB puede ser CdtB como se describe por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5. En otras realizaciones más, la proteína hospedadora tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de la SEQ ID NO: 3. Los métodos para detectar la proteína huésped conocida en la técnica y un experto en la materia serán capaces de detectar la proteína huésped sin experimentación excesiva. Por ejemplo, la detección de la presencia de la proteína huésped puede realizarse poniendo en contacto una muestra biológica del sujeto con uno o más sustratos capaces de detectar la presencia de la proteína huésped. En diversas realizaciones, uno o más sustratos son los anticuerpos que se unen específicamente a CDT, CdtA, CdtB, CdtC y fragmentos del mismo como se describe en este documento.

Ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales, sangre completa, plasma, heces, fluidos intestinales o aspirado, y fluidos estomacales o aspirado, suero, fluido cerebroespinal (CSF), orina, sudor, saliva, lágrimas, secreciones pulmonares, aspiración de mama, líquido de próstata, líquido seminal, raspado cervical, líquido amniótico, líquido intraocular, mucosidad y humedad en el aliento. En realizaciones particulares del método, la muestra biológica puede ser sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, heces, fluido intestinal o aspirado o fluido o aspirado estomacal.

En otra realización, la presente invención proporciona métodos para determinar si un sujeto tiene sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) o si un sujeto es susceptible de tener SIBO. Sin desear estar sujetos a ninguna teoría particular, los inventores creen que un aspecto de la CDT es su causa de daño nervioso al intestino. El daño nervioso puede causar un deterioro en la capacidad del intestino para eliminar las bacterias. La pobre eliminación de bacterias puede dar como resultado SIBO, y el sujeto puede desarrollar IBS (por ejemplo, experimentar síntomas de IBS). Por lo tanto, el método comprende detectar la presencia o ausencia de CDT o uno o más marcadores que indican una exposición previa a CDT ("marcador de CDT") en un sujeto que lo necesita y correlacionar la presencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una probable presencia de SIBO o una mayor susceptibilidad a tener SIBO, o correlacionar la ausencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una probable ausencia de SIBO o una menor susceptibilidad a tener SIBO. No todos los sujetos con la presencia de CDT o la presencia de uno o más marcadores de CDT tendrán SIBO, sin embargo, este método proporciona una indicación sobre la probabilidad de que el sujeto tenga SIBO o una indicación sobre la susceptibilidad del sujeto a tener SIBO. Una determinación de una probable presencia de SIBO o una mayor susceptibilidad a tener SIBO puede correlacionarse y/o confirmarse adicionalmente mediante otros métodos de diagnóstico para SIBO, o con síntomas de SIBO conocidos en la técnica. Además, una determinación de una probable ausencia de SIBO o una menor susceptibilidad a tener SIBO también se puede correlacionar y/o confirmar adicionalmente mediante otros métodos de diagnóstico para SIBO o síntomas de SIBO conocidos en la técnica para descartar SIBO.

Para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención, la presente especificación describe además un método para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento antibiótico para IBS, o profilaxis antibiótica para prevenir o reducir la probabilidad de tener IBS. El método comprende, detectar la presencia de CDT, o detectar la presencia de uno o más marcadores de CDT, y correlacionar la presencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento con antibióticos, correlacionar la ausencia de CDT o uno o más marcadores de CDT con una menor probabilidad de respuesta al tratamiento con antibióticos. Responder al tratamiento con antibióticos se refiere a recibir resultados beneficiosos del tratamiento con antibióticos (por ejemplo, se alivian los síntomas del IBS). La detección de la presencia de CDT, o la detección de la presencia de uno o más marcadores de CDT se puede realizar por métodos conocidos en la técnica o como se describió anteriormente. Los ejemplos de antibióticos usados en el tratamiento del IBS, o la profilaxis con antibióticos para prevenir o reducir la probabilidad de tener IBS incluyen, pero no se limitan a, antibióticos no absorbibles (por ejemplo, rifaximina, neomicina).

Para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención, la presente especificación describe adicionalmente composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDT, neutralizador de CDT, y/o una composición para provocar una respuesta inmune específica (vacuna de CDT) como se describió anteriormente. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

En diversas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden formular para el suministro a través de cualquier vía de administración. "Ruta de administración" puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a aerosol, nasal, oral, transmucosal, parenteral o enteral. "Parenteral" se refiere a una vía de administración generalmente asociada con inyección, que incluye intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal o transtraqueal. Para la vía parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección, o como polvos liofilizados. A través de la vía enteral, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas de gel, comprimidos recubiertos de azúcar, jarabes, suspensiones,

soluciones, polvos, gránulos, emulsiones, microesferas o nanoesferas o vesículas de lípidos o vesículas de polímero que permiten la liberación controlada. Por la vía parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección.

5 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que está involucrado en portar o transportar un compuesto de interés de un tejido, órgano o parte del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, o una combinación de los mismos. Cada componente del portador debe ser "farmacéuticamente aceptable" ya que debe ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para su uso en contacto con cualquier tejido u órgano con el que pueda entrar en contacto, lo que significa que no debe conllevar riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere con creces sus beneficios terapéuticos.

15 Las composiciones farmacéuticas también pueden encapsularse, comprimirse o prepararse en forma de una emulsión o jarabe para administración oral. Pueden añadirse portadores sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para potenciar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los portadores líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio, dihidrato, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, goma arábiga, agar o gelatina. El vehículo también puede incluir un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solos o con una cera.

25 Las preparaciones farmacéuticas se preparan siguiendo las técnicas convencionales de farmacia que implican molienda, mezclado, granulación y compresión, cuando es necesario, para formas comprimidas; o molienda, mezclado y llenado para formas de cápsula de gelatina dura. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de un jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Tal formulación líquida se puede administrar directamente p.o. o llenada en una cápsula de gelatina blanda.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad terapéuticamente efectiva precisa es la cantidad de la composición que producirá los resultados más eficaces en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen pero no se limitan a las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo de enfermedad y estadio), estado físico general, capacidad de respuesta a una dosificación dada, y tipo de medicación), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas podrá determinar una cantidad terapéuticamente eficaz a través de experimentación rutinaria, por ejemplo, controlando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosificación en consecuencia. Para una orientación adicional, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed., vigésima edición, Williams & Wilkins PA, EE. UU.) (2000).

45 Las dosificaciones típicas de un inhibidor efectivo de CDT, neutralizador de CDT, y/o una composición para estimular una respuesta inmune específica (vacuna de CDT) como se describió anteriormente pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante cuando se utilizan compuestos terapéuticos conocidos, y también como se indica al experto en la técnica por las respuestas o respuestas *in vitro* en modelos animales. Típicamente, tales dosificaciones pueden reducirse en hasta aproximadamente una orden de magnitud en concentración o cantidad sin perder la actividad biológica relevante. Por lo tanto, la dosificación real dependerá del criterio del médico, del estado del paciente y de la eficacia del método terapéutico, basándose, por ejemplo, en la capacidad de respuesta *in vitro* de las células cultivadas primarias relevantes o muestras de tejido histocultivadas, tales como muestras de tumores malignos, o las respuestas observadas en los modelos animales apropiados, como se describió previamente.

55 Para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención, la presente memoria descriptiva describe adicionalmente kits para poner en práctica los métodos de la presente invención. Ejemplos de kits incluyen kits para diagnosticar IBS o la probabilidad de tener IBS, prevenir el IBS, reducir la probabilidad de desarrollar IBS, tratar el IBS, determinar la presencia de SIBO, determinar la susceptibilidad del sujeto a tener SIBO, predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con antibióticos para IBS, predecir la respuesta de un sujeto a la profilaxis antibiótica para prevenir o reducir la probabilidad de tener IBS y/o diagnosticar NUD o la probabilidad de tener NUD. El kit es un ensamblaje de materiales o componentes, que incluye al menos uno de los anticuerpos anti-CDT, inhibidores de CDT, neutralizadores de CDT, y/o una composición para provocar una respuesta inmune específica (vacuna de CDT) como se describió anteriormente.

65 La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit depende de su finalidad prevista. Por ejemplo, diversas formas de realización están configuradas para los propósitos de prevenir el IBS, reducir la probabilidad de desarrollar IBS, tratar el IBS, determinar la presencia de SIBO, determinar la susceptibilidad del sujeto a tener SIBO, predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con antibióticos para IBS, predecir la respuesta del sujeto a la

profilaxis con antibióticos para prevenir o reducir la probabilidad de tener IBS, y/o diagnosticar NUD o la probabilidad de tener NUD. En una realización, el kit está configurado particularmente para sujetos mamíferos. En otra realización, el kit está configurado particularmente para sujetos humanos. En realizaciones adicionales, el kit está configurado para aplicaciones veterinarias, para sujetos tales como, pero sin limitarse a, animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

Las instrucciones de uso se pueden incluir en el kit. Las "instrucciones de uso" generalmente incluyen una expresión tangible que describe la técnica que se empleará al usar los componentes del kit para lograr un resultado deseado, tal como prevenir el IBS, reducir la probabilidad de desarrollar IBS, tratar el IBS, determinar la presencia de SIBO, determinar la susceptibilidad del sujeto a tener SIBO, predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento antibiótico para IBS, predecir la respuesta de un sujeto a la profilaxis antibiótica para prevenir o reducir la probabilidad de tener IBS y/o diagnosticar NUD o la probabilidad de tener NUD. Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como, diluyentes, reguladores, portadores farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteo o de medición, materiales de vendaje u otra parafernalia útil, como reconocerán fácilmente los expertos en la técnica.

Los materiales o componentes ensamblados en el kit se pueden proporcionar al practicante almacenados de cualquier forma conveniente y adecuada que preserve su operabilidad y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; se pueden proporcionar a temperatura ambiente, refrigerados o congelados. Los componentes están típicamente contenidos en un material de empaque adecuado. Como se emplea en el presente documento, la frase "material de empaque" se refiere a una o más estructuras físicas utilizadas para alojar los contenidos del kit, tales como composiciones de la invención y similares. El material de empaque se construye por métodos bien conocidos, preferiblemente para proporcionar un entorno estéril, libre de contaminantes. Los materiales de empaque empleados en el kit son los utilizados habitualmente en el tratamiento de IBS o en el tratamiento con anticuerpos. Como se usa en el presente documento, el término "empaque" se refiere a una matriz sólida o material adecuado tal como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio y similares, capaz de contener los componentes individuales del kit. Así, por ejemplo, un empaque puede ser un vial de vidrio usado para contener cantidades adecuadas de una composición que contiene un inhibidor de CDT y/o neutralizador de CDT, o una composición para provocar una respuesta inmune específica, un anticuerpo para detectar CDT o un fragmento del mismo como se describió anteriormente. El material de empaque generalmente tiene una etiqueta externa que indica el contenido y/o el propósito del kit y/o sus componentes.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. Algunos de los ejemplos se presentan para ilustrar adicionalmente el contexto y el campo de la presente invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es meramente a efectos de ilustración y no pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

Las ratas Sprague-Dawley macho adultas recibieron mediante sonda *Campylobacter jejuni* 81-176 (C+) o una cepa desactivada de CDT (CDT-) de *Campylobacter*. La cepa de CDT era una cepa de *Campylobacter jejuni* 81-176 que no pudo expresar la toxina de distensión citoletal (CdtB) debido a una mutación por inserción en el gen de CdtB. Después de la alimentación forzada, se hizo seguimiento a las ratas con cultivo diario de heces para *Campylobacter* hasta que se observaron 2 cultivos negativos consecutivos. Una vez eliminada la colonización, las ratas se alojaron en condiciones idénticas durante 3 meses (después de la infección). Al cabo de 3 meses, se recogieron las heces frescas mediante estimulación anal y se usaron para evaluar tanto la apariencia (con una puntuación modificada de Bristol) como el peso de las heces antes y después de colocarlas en un horno durante la noche. Se calculó el porcentaje en peso de las heces secas. Ambos grupos se compararon con respecto al peso seco de las heces, la variabilidad en el peso seco por día y la consistencia y variabilidad de las heces.

#### Ejemplo 2

Ambos grupos de ratas (C+ y CDT-) demostraron una colonización igual de la rata como se evidencia por la detección positiva y prolongada en heces después de la alimentación forzada. Tres meses después de la pérdida de *Campylobacter*, el peso promedio de las heces en seco durante los tres días fue similar entre los grupos (Tabla 1). Sin embargo, la variabilidad en la forma y el peso de las heces fue significativamente diferente entre los grupos. Las ratas expuestas a *Campylobacter* de tipo silvestre tenían una variabilidad sustancial en el peso de las heces y también tenían una consistencia alterada de las heces. Las ratas expuestas a CDT-*Campylobacter* tenían forma y variabilidad en las heces idénticas a las de las ratas de control sanas.

Tabla 1: Comparación del porcentaje en peso seco y la consistencia de las heces

	Control	C+	CDT-
% Promedio del peso seco de las heces	63,7 ± 3,2	60,1 ± 6,8	61,0 ± 6,3
Variabilidad diaria del peso seco	4,9 ± 3,8	8,4 ± 6,4	4,9 ± 5,5*
Consistencia media de las deposiciones (con base en la escala de heces de Bristol)	1,0	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,3**
Variabilidad diaria de la consistencia de las heces	N/A	0,51 ± 0,38	0,30 ± 0,34***
* Valor P = 0,004 cuando se compara con C+			
** Valor P = 0,000025 cuando se compara con C+			
*** Valor P = 0,006 cuando se compara con C+			

## Ejemplo 3

- 5 Se alimentaron de manera forzada ratas Sprague-Dawley macho con  $10^8$  cfu de *C. jejuni* 81-176 de tipo natural o mutante de cdtB. Las ratas se evaluaron a los 2 y 4 días después de la infección, y a los 3 meses después de que se había eliminado la infección (incluidas las ratas con o sin secuelas a largo plazo de la función intestinal alterada crónica en el período postinfeccioso). Las ratas de control fueron alimentadas forzosamente con vehículo solo. En el momento de la eutanasia, se realizó una laparotomía y se tiñó el tejido ileal (5 cm proximal a la válvula ileocecal) con dos anticuerpos diferentes contra CdtB: uno se elevó contra CdtB purificado a partir de *E. coli* que sobreexpresaba un ORF de *cdtB* de longitud completa; el segundo anticuerpo se derivó de conejos inoculados con un péptido de 18 residuos (CLDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 4)), que consiste en una cisteína añadida en el extremo terminal N de la SEQ ID NO: 3 para la conjugación. Se utilizó suero de conejo preinmune como control.

## Ejemplo 4

- 15 Durante la infección aguda, la tinción de CdtB fue prominente en la superficie epitelial de la mucosa. De manera interesante, ambos tipos de anticuerpos específicos anti-CdtB tiñeron elementos neurales intestinales, que incluyen ICC y ganglios mientéricos. Esta tinción generalizada de elementos neurales se observó no solo en ratas expuestas a *C. jejuni* de tipo silvestre, sino también en ratas expuestas a mutantes cdtB y ratas nunca expuestas a *C. jejuni*. La exposición a sueros preinmunes de conejo no produjo tinción evidente de ningún tejido ileal de rata.

## Ejemplo 5

- 25 Plásmidos y construcción de mutantes de inserción-supresión. El casete aphA-3 de *Campylobacter* (Labigne-Roussel y col., 1988. Gene disruption and replacement as a feasible approach for mutagenesis of *Campylobacter jejuni*. J. BACTERIOL. 170: 1704-1708), que confiere resistencia a la kanamicina, se amplificó por PCR a partir del plásmido pRY107. La secuencia de ORF de CdtB se escindió en el medio mediante una enzima de restricción y el casete aphA-3 (Yao y col., 1993. Construction of new *Campylobacter* cloning vectors and a new mutational cat cassette. GENE 130: 127-130) se clonó en ese sitio para interrumpir la secuencia de cdtB y evitar la expresión de una CdtB funcional. Este plásmido luego se sometió a electroporación en la cepa 81-176. Se identificaron los recombinantes homólogos dobles cruzados, que eran resistentes a la kanamicina, y se sometieron a un análisis de PCR adicional para verificar la interrupción del ORF de CdtB.

- 35 Varias realizaciones de la invención se describieron anteriormente en la Descripción detallada. Aunque estas descripciones describen directamente las realizaciones anteriores, se entiende que los expertos en la técnica pueden concebir modificaciones y/o variaciones a las realizaciones específicas mostradas y descritas en este documento. Cualquiera de tales modificaciones o variaciones que caigan dentro del ámbito de esta descripción también están destinadas a ser incluidas allí. A menos que se indique específicamente, la intención de los inventores es que las palabras y frases en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tengan los significados ordinarios y habituales para los expertos en la técnica o técnicas aplicables.

- 45 La descripción anterior de varias realizaciones de la invención conocida por el solicitante en este momento de la presentación de la solicitud ha sido presentada y está destinada a fines de ilustración y descripción. La presente descripción no pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa descrita y son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones descritas sirven para explicar los principios de la invención y su aplicación práctica y para permitir que otros expertos en la técnica utilicen la invención en diversas realizaciones y con diversas modificaciones que sean adecuadas para el uso particular contemplado. Por lo tanto, se pretende que la invención no se limite a las realizaciones particulares descritas para llevar a cabo la invención.

Aunque se han mostrado y descrito realizaciones particulares de la presente invención, será obvio para los expertos

5 en la técnica que, con base en las enseñanzas de la presente invención, pueden realizarse cambios y modificaciones sin apartarse de esta invención y sus aspectos más amplios y, por lo tanto, las reivindicaciones adjuntas abarcan dentro de su alcance todos los cambios y modificaciones que estén dentro del verdadero espíritu y alcance de esta invención. Los expertos en la materia entenderán que, en general, los términos utilizados en este documento generalmente se consideran términos "abiertos" (por ejemplo, el término "que incluye" debe interpretarse como "que incluye, pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye, pero no se limita a", etc.).

Listado de secuencias

10

<110> CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER  
PIMENTEL, Mark  
CHANG, Christopher

15

<120> ANTICUERPO PARA LA TOXINA DE DISTENSIÓN CITOLETAL DE CAMPYLOBACTER JEJUNI

<130> 67789-238WOO

20

<150> 61/151.779  
<151> 2009-02-11

<150> 61/286.250  
<151> 2009-12-14

25

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1  
<211> 267  
<212> PRT  
<213> Campylobacter coli

35

<400> 1

ES 2 656 850 T3

Met Lys Lys Ile Val Phe Leu Ile Leu Ser Phe Asn Val Leu Phe Ala  
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Asn Tyr Asn Thr Gly Thr Trp Asn Leu Gln Gly Ser Ser  
 20 25 30

Ala Ala Thr Glu Ser Lys Trp Asn Val Ser Ile Arg Gln Leu Ile Thr  
 35 40 45

Gly Ala Asn Pro Met Asp Val Leu Ala Val Gln Glu Ala Gly Val Leu  
 50 55 60

Pro Ser Thr Ala Met Met Thr Pro Arg Gln Val Gln Pro Val Gly Val  
 65 70 75 80

Gly Ile Pro Ile His Glu Tyr Ile Trp Asn Leu Gly Ser Val Ser Arg  
 85 90 95

Pro Ser Ser Val Tyr Ile Tyr Tyr Ser Arg Val Asp Val Gly Ala Asn  
 100 105 110

Arg Val Asn Leu Ala Ile Val Ser Arg Val Gln Ala Asp Glu Val Phe  
 115 120 125

Val Leu Pro Pro Pro Thr Val Ala Ser Arg Pro Ile Ile Gly Ile Arg  
 130 135 140

Ile Gly Asn Asp Ala Phe Phe Asn Ile His Ala Leu Ala Ser Gly Gly  
 145 150 155 160

ES 2 656 850 T3

Asn Asp Ala Gly Ala Ile Val Ala Ala Val Asp Met Phe Phe Arg Asn  
 165 170 175  
 Arg Pro Asp Ile Asn Trp Met Ile Leu Gly Asp Phe Asn Arg Glu Ser  
 180 185 190  
 Gly Ala Leu Val Thr Leu Leu Asp Pro Asp Leu Arg Ala Arg Thr Arg  
 195 200 205  
 Val Val Val Pro Pro Ser Ser Thr Gln Thr Ser Gly Arg Thr Ile Asp  
 210 215 220  
 Tyr Ala Ile Thr Gly Asn Ser Asn Thr Ala Ala Leu Tyr Asn Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Ile Val Ala Ile Leu Ala Leu Glu Gly Leu Arg Thr Phe Leu Ala  
 245 250 255  
 Ser Asp His Phe Pro Val Asn Phe Arg Arg Pro  
 260 265

5 <210> 2  
 <211> 804  
 <212> ADN  
 <213> Campylobacter coli

10 <400> 2



ES 2 656 850 T3

Met Lys Lys Ile Ile Cys Leu Phe Leu Ser Phe Asn Leu Ala Phe Ala  
1 5 10 15

Asn Leu Glu Asn Phe Asn Val Gly Thr Trp Asn Leu Gln Gly Ser Ser  
20 25 30

Ala Ala Thr Glu Ser Lys Trp Ser Val Ser Val Arg Gln Leu Val Ser  
35 40 45

Gly Ala Asn Pro Leu Asp Ile Leu Met Ile Gln Glu Ala Gly Thr Leu  
50 55 60

Pro Arg Thr Ala Thr Pro Thr Gly Arg His Val Gln Gln Gly Gly Thr  
65 70 75 80

Pro Ile Asp Glu Tyr Glu Trp Asn Leu Gly Thr Leu Ser Arg Pro Asp  
85 90 95

Arg Val Phe Ile Tyr Tyr Ser Arg Val Asp Val Gly Ala Asn Arg Val



**REIVINDICACIONES**

1. Un método de diagnóstico, que comprende:

5 detectar la presencia o ausencia en una muestra biológica de:

uno o más marcadores de toxina de distensión citoletal (CDT); o  
CDT;

10 en el que la muestra biológica se ha obtenido de un sujeto seleccionado del grupo que consiste en: un sujeto que requiere un diagnóstico con respecto al síndrome de intestino irritable (IBS), un sujeto que requiere un diagnóstico con respecto a un subconjunto de IBS, un sujeto que requiere una determinación de la probabilidad de tener o desarrollar IBS, un sujeto que requiere una determinación de la probabilidad de tener o desarrollar un subconjunto de IBS, un sujeto que desea un pronóstico de una respuesta al tratamiento con antibióticos para el IBS, un sujeto que desea un pronóstico de una respuesta al tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS y combinaciones de los mismos, un sujeto que requiere una determinación sobre el sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO), un sujeto que requiere una determinación de susceptibilidad a tener SIBO, un sujeto que requiere de un diagnóstico con respecto a la dispepsia no ulcerosa (NUD); y correlacionar la presencia de:

20 uno o más marcadores de CDT; o  
CDT;

25 con una probable presencia de IBS, una probable presencia de un subconjunto de IBS, una probabilidad de tener o desarrollar IBS, una probabilidad de tener o desarrollar un subconjunto de IBS, una mayor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para el IBS, una mayor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS, una probable presencia de SIBO, una mayor susceptibilidad a tener SIBO, y/o una posible presencia de NUD; o correlacionar la ausencia de:

30 uno o más marcadores de CDT; o  
CDT;

35 con una probable ausencia de IBS, una probable ausencia del subconjunto de IBS, una menor probabilidad de tener o desarrollar IBS, una menor probabilidad de tener o desarrollar el subconjunto de IBS, una menor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para el IBS, una menor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS, una probable ausencia de SIBO, una menor susceptibilidad a tener SIBO, y/o una probable ausencia de NUD;

40 donde los uno o más marcadores de CDT se seleccionan del grupo que consiste en:

una o más subunidades CdtA, CdtB, CdtC de CDT;  
uno o más anticuerpos para CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo; y/o  
45 uno o más ácidos nucleicos que codifican CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo.

50 2. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto posee una proteína huésped con al menos un 80% de homología con CDT o con una subunidad de CDT; y la detección de la presencia o ausencia en la muestra biológica del uno o más marcadores de la toxina de distensión citoletal (CDT) o CDT se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína huésped en el sujeto.

55 3. El método de la reivindicación 1, que comprende además elegir una terapia antibiótica para el sujeto en función de la posible presencia de IBS, la posible presencia del subconjunto de IBS, la probabilidad de tener o desarrollar IBS, la probabilidad de tener o desarrollar el subconjunto de IBS, la probable presencia de NUD, la probable presencia de SIBO, la mayor susceptibilidad a tener SIBO, la mayor probabilidad de tener el resultado beneficioso del tratamiento antibiótico para IBS, y/o la mayor probabilidad de tener el resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS.

60 4. El método de la reivindicación 1, en el que el subconjunto de IBS se selecciona del grupo que consiste en IBS con estreñimiento predominante, IBS con diarrea predominante, IBS mixto, IBS indeterminado e IBS sensible a antibióticos.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que uno o más marcadores de CDT se seleccionan del grupo que consiste en uno o más anticuerpos anti-CDT.

65 6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que uno o más marcadores de CDT es un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CdtB, CDT, CdtA, CdtC o un fragmento de los mismos.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el CdtB es CdtB de *Campylobacter jejuni*.
- 5 8. El método de la reivindicación 7, en el que el CdtB de *Campylobacter jejuni* tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 5.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo en 5 a 22 residuos contiguos de la SEQ ID NO: 5.
- 10 10. El método de la reivindicación 9, en el que el epítipo está en 17 residuos contiguos como se describe en la SEQ ID NO: 3.
11. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo en la SEQ ID NO: 4.
- 15 12. El método de la reivindicación 6, en el que el CdtB es:
- i) CdtB de *Campylobacter coli* y tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 1; o
- 20 ii) CdtB de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* o *Clostridium difficile*.
13. El método de la reivindicación 1, en el que:
- 25 la muestra biológica se ha obtenido de un sujeto seleccionado del grupo que consiste en: un sujeto que requiere un diagnóstico con respecto al síndrome del intestino irritable (IBS), un sujeto que requiere un diagnóstico con respecto a un subconjunto de IBS, un sujeto que requiere una determinación de la probabilidad de tener o desarrollar IBS, un sujeto que requiere una determinación de la probabilidad de tener o desarrollar un subconjunto de IBS, un sujeto que desea un pronóstico de una respuesta al tratamiento con antibióticos para el IBS, un sujeto que desea un pronóstico de una respuesta al tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS y
- 30 combinaciones de los mismos; y el método comprende:
- 35 correlacionar la presencia de uno o más marcadores de CDT con una posible presencia de IBS, una posible presencia de un subconjunto de IBS, una probabilidad de tener o desarrollar IBS, una probabilidad de tener o desarrollar un subconjunto de IBS, una mayor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para el IBS, y/o una mayor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS; o
- 40 correlacionar la ausencia de uno o más marcadores de CDT con una probable ausencia de IBS, una probable ausencia del subconjunto de IBS, una menor probabilidad de tener o desarrollar IBS, una menor probabilidad de tener o desarrollar el subconjunto de IBS, una menor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para el IBS, y/o una menor probabilidad de tener un resultado beneficioso del tratamiento con antibióticos para reducir la probabilidad de tener IBS;
- 45 en donde uno o más marcadores de CDT son uno o más anticuerpos para CDT, CdtA, CdtB, CdtC o un fragmento del mismo.
14. El método de la reivindicación 13, en el que uno o más marcadores de CDT son uno o más anticuerpos para CdtB o un fragmento del mismo.

FIG. 1

MKKIVFLILSFNVLFAALENYNTGTWNLQGSSAATESKWNVSIRQLITGANPMD  
 VLAVQEAGVLPSTAMMTPRQVQPVGVGIPHEYIWNLGSVSRPSSVYIYYSRV  
 DVGANRVNLAIVSRVQADEVFVLPPTVASRPIIGIRIGNDAFFNIHALASGGND  
 AGAIVAAVDMFFRNRPDINWMILGDFNRESGALVLLDPDLRARTRVVPPSS  
 TQTSGRITIDYAITGNSNTAALYNPPPIVAILALEGLRTFLASDHFPVNFRRP

(SEQ ID NO:1)

FIG. 2

atgaaaaaaaa tagtattttt gattttaagt tttaatgtat tatttgccgc ttagaaaaat 60  
 tacaacaccg gaacttgga tttgcaaggc tcatcagctg caactgaaag caaatggaat 120  
 gttagtataa gacaactcat aaccgggtgca aatcctatgg atgttttagc tgttcaagaa 180  
 gcggggggtt tacctagtac agctatgatg actcctagac aggtacaacc cgtgggcgtg 240  
 ggtattccta tacatgaata catatggaat ttaggctctg tatcaagacc tagctctggt 300  
 tatatatatt attctagagt ggatgtagga gcaaatcgtg tgaatttagc tatcgtagc 360  
 agagtgcaag cggatgaagt tttgtttta cccctccaa cagttgctc aagacctatt 420  
 ataggcatac gcataggcaa tgatgctttt tcaatatac acgctctagc aagtggggga 480  
 aatgacgcag gagccattgt cgctgctgtg gatatgtttt ttagaaatag acctgatatt 540  
 aattggatga ttttaggcga ttttaataga gaatcaggcg ccttagtaac cttgctagat 600  
 cctgacttaa gaggcacgcac tcgcgtagtt gtccgcctt cttctacgca aacaagtgga 660  
 agaacgattg attatgctat cactggaaat tccaacactg cagctttata caaccacca 720  
 ccgatagtg cgatttagc tttagaagga ttaagaacct tttggcttc agatcatttt 780  
 cctgtaaatt ttagaagacc ttag 804

(SEQ ID NO:2)

FIG. 3



FIG. 4

MKKIICLFLSFNLA FANLENFN VGTWNLQGSSAATESKWSVSVRQLVSGANPLDILMIQE  
AGTLPR TATPTGRHVQQGGTPIDEYEWNLGTL SRPDRVFIYYSRVDVGANRVNLAIVSRM  
QAEEVIVLPPPTTVSRPIIGIRNGNDAFFNIHALANGGTDVGAIITAVDAH FANMPQVNW  
MIAGDFNRDPSTITSTVDRELANRIRVVFPTSATQASGGTLDYAITGNSNRQQTYTPPLL  
AAILMLASLRSHIVSDHFPVNF RKF

(SEQ ID NO:5)