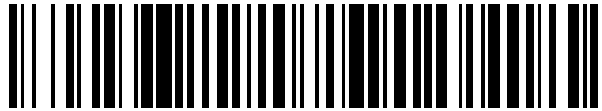


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 051**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014** **E 16201732 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** **EP 3167903**

54 Título: **Antígeno específico de E. coli MDR**

30 Prioridad:

17.01.2013 EP 13151627

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

27.06.2019

73 Titular/es:

ARSANIS BIOSCIENCES GMBH (100.0%)
Helmut-Qualtinger-Gasse 2
1030 Vienna, AT

72 Inventor/es:

NAGY, ESZTER;
NAGY, GÁBOR;
SZIJARTO, VALERIA;
MAGYARICS, ZOLTÁN;
MIRKINA, IRINA;
GUACHALLA, LUIS;
BADARAU, ADRIANA;
ZAUNER, GERHILD y
LUKASIEWICZ, JOLANTA KATARZYNA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 718 051 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

Antígeno específico de *E. coli* MDR

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un inmunógeno y una vacuna que comprenden el antígeno LPS O25b de cepas de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos (MDR).

10 **Antecedentes de la invención**

El lipopolisacárido (LPS) es el antígeno más abundante en la superficie de los patógenos enterobacterianos. Típicamente, el LPS tiene tres partes estructurales: i) Lípido A (también conocido como endotoxina), ii) oligosacárido central y iii) antígeno O. El último está hecho de subunidades de repetición de 3-6 azúcares (dependiendo del serotipo) El lípido A y el OS central están relativamente bien conservados en una única especie de enterobacterias, sin embargo, su accesibilidad a los anticuerpos está limitada. Por otro lado, los antígenos O están altamente accesibles, pero son muy diversos con respecto a su estructura (en *E. coli* hay ~180 tipos O diferentes).

Los anticuerpos contra los antígenos O son capaces de unirse a la superficie de *E. coli*, por lo tanto se usan tanto para medidas diagnósticas (por ejemplo, tipificado de O para estudios de epidemiología) así como se han propuesto para medidas terapéuticas. Sin embargo, dada la alta variabilidad estructural, una protección de alto espectro con anticuerpos específicos de antígeno O es muy pesado.

Las infecciones extraintestinales provocadas por *E. coli* son una causa común de morbilidad y mortalidad significativas. Las cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR) de *E. coli* que han emergido recientemente provocan una proporción significativa de infecciones por *E. coli*.

Las opciones de tratamiento contra estas cepas MDR se están volviendo muy limitadas ya que han evolucionado una resistencia hacia la mayoría de clases de antibióticos clínicamente relevantes. Por lo tanto, una opción alternativa de tratamiento, por ejemplo, inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales (mAb) se mantiene como una buena promesa para el futuro.

En los pasados años ha emergido un linaje clonal bien definido de *E. coli* MDR, ST131-O25b:H4 provocando aproximadamente el 10 % de todas las infecciones extraintestinales de *E. coli* y aproximadamente la mitad de las infecciones de *E. coli* MDR (Peirano et al. Int J Antimicrob Agents 2010 Apr;35(4):316-21; Rogers et al. J Antimicrob Chemother 2011 Jan;66(1):1-14; Woodford et al. FEMS Microbiol Rev 2011 Sep;35(5):736-55.). Las cepas que pertenecen a este linaje muestran heterogeneidad limitada, de esta manera podría considerarse muy similar con respecto al repertorio antigénico. La vasta mayoría de las cepas que pertenecen a este clúster expresan el antígeno O25b y por lo tanto se usa un gen específico (dentro del locus de síntesis del LPS) que codifica para enzimas que sintetizan este antígeno para la identificación de este clon (Clermont et al. J Antimicrob Chemother Mayo 2008; 61(5):1024-8.). Alternativamente, puede usarse la aglutinación con los sueros de tipificación O25, a pesar de que el antígeno O de este linaje difiere del antígeno clásico O25 (por lo tanto se había denominado O25b) como se sugirió por diferencias genéticas. Sin embargo, los sueros de tipificación de O25 no podían distinguir entre los clones no MDR O25 y MDR O25.

Rogers et al. (J Antimicrob Chemother 2011 Jan;66(1):1-14) describe la detección de la cepa de *E. coli* O25b-ST131 por tres características principales, es decir, su serogrupo (O25b), su grupo filogenético (B2) y su ST (ST131). Cada una de estas características se desvela para ayudar a la detección. Se describe una diversidad de técnicas moleculares, es decir, MLST, métodos basados en detección rápida por PCR, PCR de secuencias repetitivas y PFGE. Se han usado antisueros policlonales (elevados contra una cepa O25a) que incluyen una diversidad de inmunoglobulinas para determinar el antígeno O25, sin diferenciar subtipos.

Jadhav et al. (PLOS ONE 2011;6(3): e18063) describe las características de virulencia y afinidades genéticas de cepas que fueron positivas para el subgrupo O25b que se liga al tipo B2-O25b-ST131-CTX-M-15 virulento/multirresistente. Los aislados clínicos humanos se analizaron y se clasificaron en serotipos y se obtuvieron perfiles de marcadores de virulencia. Las cepas O25 positivas se identificaron serotipando usando antisueros policlonales contra antígenos O - O1 a O173. Las cepas positivas O25 se sometieron además al genotipado por PCR específica de alelos marcando como diana el locus del gen del subgrupo *rfbO25b*.

Mora et al. (Int. J. Antimicrobial Agents 2011;37(1): 16-21) describe la emergencia de algunos grupos clonales entre aislados clínicos de *E. coli* que producen CTX-M-14, entre ellos O25b: H4-B2-ST131. La tipificación O se realizó con antisueros O específicos (policlonales).

Clermont et al. (J Antimicrob Chemother mayo 2008; 61(5):1024-8) desvela un ensayo de PCR *pabB* específico de alelos específico para *E. coli* O25b ST131.

Szijarto et al, (FEMS Microbiol Lett 2012;332:131-6) describe el tipificado molecular de aislados de cepas de *E. coli* en base a la estructura central de la molécula de LPS. El tipo de núcleo de los aislados se determinó por PCR usando cebadores dirigidos a genes en el operón del núcleo y específicos para los tipos de núcleo R1-4 y K-12, respectivamente.

5 Cagnacci et al. (Journal of Clinical Microbiology 2008, 46(8): 2605-2612) describen la emergencia europea de los grupos clonales de *Escherichia coli* resistentes a la ciprofloxacina O25:H4-ST131 y O15:K52:H1. La serotipificación se realizó utilizando los antisueros O y H de *E. coli* disponibles en el mercado.

10 Stenutz et al. (FEMS Microbiol Rev. Mayo de 2006; 30(3): 382-403. Revisión) divulgan las estructuras de los antígenos de O-polisacárido de *Escherichia coli*. Se describen estructuras de unidades de repetición de antígeno O, entre ellas el serogrupo O25.

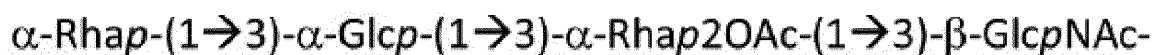
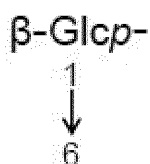
15 Nagy et al. (Biological Chemistry 2008, 389 (5): 513-520) describe a los lipopolisacáridos (LPS) como componentes esenciales de la pared celular de las bacterias gramnegativas, y describe la estructura del LPS, incluyendo tres componentes: el lípido A, el oligosacárido central y el antígeno O.

Sumario de la invención

20 Es el objeto de la presente invención proporcionar un antígeno de cepas MDR de *E. coli* con especificidad mejorada para su uso para la prevención o la terapia de infecciones de *E. coli* provocadas por cepas que llevan el LPS O25b.

El objeto se resuelve mediante el objeto de la presente invención.

25 De acuerdo con la invención, se proporciona un inmunógeno que comprende el antígeno O25b caracterizado por la estructura de la unidad de repetición O25b.



30 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Específicamente, el inmunógeno comprende un tampón y/o sustancias adyuvantes.

35 Específicamente, el inmunógeno se proporciona para su uso para provocar una respuesta inmune protectora.

Específicamente, el inmunógeno, una formulación parenteral del inmunógeno se administran por administración subcutánea o intramuscular.

40 De acuerdo con la invención, se proporciona adicionalmente una vacuna que comprende el inmunógeno, para su uso en el tratamiento de una infección por *E. coli* MDR en un sujeto.

Específicamente, la vacuna se usa para la prevención de una afección de enfermedad que es el resultado de dicha infección.

45 Específicamente, el tratamiento se combina con un tratamiento con al menos un agente terapéutico o profiláctico adicional.

Específicamente, el agente se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, inhibidores esteroideos de la inflamación, inhibidores no esteroideos de la inflamación y mezclas de los mismos.

50 Específicamente, el tratamiento se combina con una terapia basada en anticuerpos.

En el presente documento se describe adicionalmente un anticuerpo aislado que se une específicamente el antígeno O25b de cepas de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos (MDR).

55 Específicamente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Específicamente, el anticuerpo es específico para unir el antígeno O25b solamente, o específico cruzado para unir

un epítopo compartido por los antígenos O25a y O25b.

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo es específico cruzado para unir los antígenos O25b y O25a u O25a, por ejemplo, con afinidades iguales, más que iguales, similares o diferentes.

5 Específicamente, el anticuerpo descrito en el presente documento se une preferentemente al antígeno O25b con respecto al antígeno O25a de *E. coli*, o al menos con igual afinidad hacia ambos antígenos.

10 De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo tiene al menos dos veces más afinidad para la unión del antígeno O25b que en comparación con el antígeno O25a, específicamente con al menos dos veces de diferencia, o al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos 5 veces o incluso al menos 10 veces de diferencia en la unión bien por el antígeno O25b o el O25a, por ejemplo diferencia en afinidad y/o avidéz.

15 De acuerdo con un aspecto específico la unión específica a O25b se caracteriza por la mayor afinidad para unir el antígeno O25b en comparación con la unión del antígeno O25b por un suero policlonal elevado contra cepas de *E. coli* O25 u O25a como se determina por inmunoensayo, preferentemente inmunotransferencia, ELISA u otros métodos inmunológicos. La mayor afinidad de unión es específicamente con al menos dos veces de diferencia, o al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos 5 veces o incluso al menos 10 veces de diferencia.

20 Específicamente, el antígeno O25b como se marca como diana por el anticuerpo descrito en el presente documento está prevalente en una o más, y más específicamente presente en la vasta mayoría de cepas ST131.

25 Específicamente, el epítopo reconocido por el anticuerpo está presente en la superficie de cepas ST131-O25b:H4 encapsuladas y no encapsuladas, por ejemplo, cepas mutantes.

30 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo tiene un sitio de unión de un anticuerpo monoclonal de longitud completa o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos un dominio de anticuerpo que incorpora un sitio de unión, cuyo anticuerpo es preferentemente un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos murinos, de llama, de conejo, de cabra, de vaca, quiméricos, humanizados o humanos, cadenas pesadas de anticuerpos, Fab, Fd, scFv y dominios solos de anticuerpos como VH, VHH o VL, preferentemente un anticuerpo IgG humano o un anticuerpo IgG murino.

35 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo tiene una afinidad para unir el antígeno O25b con una Kd de menos de 10^{-7} M, preferentemente menos de 10^{-8} M, específicamente en un estado monomérico.

De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo exhibe potencia bactericida *in vitro* en una muestra de suero que comprende cepas vivas de *E. coli* MDR de tipo silvestre.

40 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo estimula la captación de cepas vivas de *E. coli* MDR de tipo silvestre por células fagocíticas *in vitro*.

De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo se une al mismo epítopo que el anticuerpo designado 8D5-1 G10 u 8D10-C8.

45 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo comprende el mismo sitio de unión a antígeno que el anticuerpo designado 8D5-1 G10 u 8D10-C8.

50 Un aspecto específico, se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al antígeno O25b de cepas de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos (MDR) que comprende el sitio de unión a antígeno del anticuerpo 8D5-1 G10, o que deriva del anticuerpo 8D5-1G10, o una variante funcionalmente activa del anticuerpo 8D5-1 G10, preferentemente donde el anticuerpo 8D5-1 G10 se caracteriza por que emplea

a) la región variable de la cadena ligera del anticuerpo producido por la célula hospedadora depositada bajo DSM 26763; y/o

55 b) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo producido por la célula hospedadora depositada bajo DSM 26762;

c) o una variante funcionalmente activa de (a) y/o (b).

60 De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo es el anticuerpo 8D5-1G10 o una variante funcionalmente activa del mismo.

En el presente documento se ejemplifican anticuerpos adicionales descritos en el presente documento, que se designan 6D1-1B2 y 8A1-1G8. Estos son clones con secuencias CDR similares a 8D5-1 G10, entendido también en el presente documento como variantes CDR funcionalmente activas.

65 Específicamente, el anticuerpo designado 8D5-1G10 está compuesto por una cadena ligera de anticuerpo que

comprende la región variable codificada por la secuencia codificante del plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 26763 y una cadena pesada de anticuerpo que comprende la región variable codificada por la secuencia codificante del plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 26762.

- 5 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo deriva del anticuerpo 8D5-1G10, donde
- la región variable de la cadena ligera del anticuerpo está codificada por un plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 26763, o una variante funcionalmente activa de la misma; y/o
 - 10 - la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está codificada por un plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 26762, o una variante funcionalmente activa de la misma.

De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo deriva de un anticuerpo, donde

- 15 - la región variable de la cadena ligera del anticuerpo está producida por una célula hospedadora depositada bajo DSM 26763, o una variante funcionalmente activa de la misma; y/o
- la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está producida por una célula hospedadora depositada bajo DSM 26762, o una variante funcionalmente activa de la misma.

20 Otro aspecto específico se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado que es reactivo cruzado a unir un epítipo compartido por los antígenos O25a y O25b y que comprende el sitio de unión a antígeno del anticuerpo 8D10-C8 o que deriva del anticuerpo 8D10-C8 o una variante funcionalmente activa del anticuerpo 8D10-C8, preferentemente donde el anticuerpo 8D10-C8 se caracteriza por que se emplea

- 25 a) la región variable de la cadena ligera del anticuerpo producido por la célula hospedadora depositada bajo DSM 28171; y
- b) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo producido por la célula hospedadora depositada bajo DSM 28172;
- 30 c) o una variante funcionalmente activa de (a) y/o (b).

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo es el anticuerpo 8D10-C8 o una variante funcionalmente activa del mismo.

35 Específicamente, el anticuerpo designado 8D10-C8 está compuesto por una cadena ligera de anticuerpo que comprende la región variable codificada por la secuencia codificante del plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 28171 y una cadena pesada de anticuerpo que comprende la región variable codificada por la secuencia codificante del plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 28172.

- 40 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo deriva del anticuerpo 8D10-C8, donde
- la región variable de la cadena ligera del anticuerpo está codificada por un plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 28171, o una variante funcionalmente activa de la misma; y/o
 - 45 - la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está codificada por un plásmido comprendido en la célula hospedadora *E. coli* depositada bajo DSM 28172, o una variante funcionalmente activa de la misma.

De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo deriva de un anticuerpo, donde

- 50 - la región variable de la cadena ligera del anticuerpo está producida por una célula hospedadora depositada bajo DSM 28171, o una variante funcionalmente activa de la misma; y/o
- la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está producida por una célula hospedadora depositada bajo DSM 28172, o una variante funcionalmente activa de la misma.

55 Específicamente, la variante funcionalmente activa es una variante de CDR, que comprende una CDR, más específicamente una secuencia en bucle de CDR, con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 70 %, un 80 % o un 90 % de identidad de secuencia.

60 Específicamente, el anticuerpo deriva de dichos anticuerpos, empleando las secuencias CDR respectivas, o CDR mutantes, incluyendo variantes de CDR funcionalmente activas, por ejemplo con 1, 2, o 3 mutaciones puntuales con un bucle CDR.

Específicamente, la variante funcionalmente activa difiere del anticuerpo parental en al menos una mutación puntual en la secuencia de aminoácidos, preferentemente en la CDR, en la que el número de mutaciones puntuales en cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR es bien 0, 1, 2 o 3.

65

Un aspecto específico adicional se refiere un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos

A

- 5 - que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo designada 8D5-1G 10-LC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 26763; y/o
 - que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo designada 8D5-1G10-HC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 26762;

10 o B

- que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo designada 8D10-C8-LC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 28171; y/o
 15 - que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo designada 8D10-C8-HC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 28172;

Un aspecto específico adicional se refiere a una casete de expresión que comprende una secuencia para expresar una cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento, cuya casete de expresión o secuencia de codificación se obtiene de un plásmido seleccionado del grupo que consiste en un plásmido descrito en el presente documento.

Un aspecto específico adicional se refiere a un método para producir un anticuerpo descrito en el presente documento, donde una célula hospedadora se transforma con un plásmido descrito en el presente documento o la casete de expresión descrita en el presente documento.

Un aspecto específico adicional se refiere a una célula hospedadora que comprende un plásmido descrito en el presente documento o la casete de expresión descrita en el presente documento.

Específicamente, la célula hospedadora se deposita bajo

30 A

DSM 26763 y/o DSM 26762;

o B

DSM 28171 y/o DSM 28172.

35 Un aspecto específico se refiere a un método para producir un anticuerpo descrito en el presente documento, donde una célula hospedadora descrita en el presente documento se cultiva o se mantiene en condiciones para producir dicho anticuerpo.

40 Un aspecto específico adicional se refiere a un método para identificar un anticuerpo candidato, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o una célula que produce anticuerpos; y
 (b) evaluar la unión de un anticuerpo en o producido por la muestra con un epítipo reconocido por el anticuerpo designado 8D5-1G10 u 8D10-C8, donde una reacción positiva entre el anticuerpo y el epítipo identifica el anticuerpo como un anticuerpo candidato.

Un aspecto específico adicional se refiere a método para identificar un anticuerpo candidato, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o una célula que produce anticuerpos; y
 50 (b) evaluar la unión de un anticuerpo en o producido por la muestra con el antígeno O25b de una cepa ST131-O25b:H4 y el antígeno O25 de una cepa de *E. coli* no MDR, o el antígeno O25a, donde una reacción positiva entre el anticuerpo y el antígeno O25b con respecto al antígeno O25 o al antígeno O25a identifica el anticuerpo como un anticuerpo candidato.

55 Específicamente, el anticuerpo candidato es un anticuerpo protector candidato, tal como para su uso terapéutico, o un anticuerpo diagnóstico candidato.

Aún, de acuerdo con un aspecto específico adicional, se refiere a un método para producir un anticuerpo descrito en el presente documento, que comprende

- 60 (a) proporcionar un anticuerpo candidato identificado como se describe en el presente documento; y
 (b) producir un anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo candidato, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión a epítipo que el anticuerpo candidato.

65 Otro aspecto específico, se refiere a un método para producir un anticuerpo descrito en el presente documento, que comprende

- (a) inmunizar un animal no humano con un epítipo reconocido por el anticuerpo designado 8D5-1G10 u 8D10-C8;
- (b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de los linfocitos B aislados;
- (c) explorar las líneas celulares obtenidas en b) para identificar una línea celular que produzca un anticuerpo monoclonal que se una al epítipo; y
- (d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humana o humanizada del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión a epítipo que el anticuerpo monoclonal.

Otro aspecto específico se refiere a un método para producir un anticuerpo descrito en el presente documento, que comprende:

- (a) inmunizar un animal no humano con el antígeno O25b de una cepa ST131-O25b:H4 y aislar linfocitos B que producen anticuerpos;
- (b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de los linfocitos B aislados;
- (c) explorar las líneas celulares para identificar una línea celular que produzca un anticuerpo monoclonal que se una preferentemente al antígeno O25b con respecto al antígeno O25 o al antígeno O25a de *E. coli*; y
- (d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humana o humanizada del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión a epítipo que el anticuerpo monoclonal.

Un aspecto adicional se refiere al uso médico de un anticuerpo descrito en el presente documento. Específicamente, el anticuerpo se describe para su uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de o que padece una infección de *E. coli* MDR que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo para limitar la infección en el sujeto o para mejorar una afección de enfermedad que resulta de dicha infección, preferentemente para el tratamiento o la profilaxis de pielonefritis, bacteriemia secundaria, sepsis, peritonitis, meningitis y neumonía asociada a ventilador.

Específicamente, el anticuerpo se describe para la muerte bactericida de *E. coli* MDR, preferentemente una cepa ST131-O25b:H4 independientemente del polisacárido capsular expresado por la cepa.

Un aspecto específico se refiere a un método de tratamiento donde se trata un sujeto en riesgo de o que padece una infección de *E. coli* MDR, cuyo método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo para limitar la infección en el sujeto o para mejorar una afección de enfermedad que resulta de dicha infección, preferentemente un método para el tratamiento o la profilaxis de pielonefritis, bacteriemia secundaria, sepsis, peritonitis, meningitis y neumonía asociada a ventilador.

Específicamente, el método de tratamiento se describe para la muerte bactericida de *E. coli* MDR, preferentemente una cepa ST131-O25b:H4 independientemente del polisacárido capsular expresado por la cepa.

De acuerdo con un aspecto específico, la inmunoterapia que usa el anticuerpo descrito en el presente documento puede proteger eficazmente contra el desafío de bacterias vivas, por ejemplo como se determina en diversos modelos animales.

El anticuerpo puede neutralizar específicamente la endotoxemia letal. Dicha actividad funcional puede determinarse en un modelo *in vivo* apropiado (desafío con LPS purificado).

El anticuerpo es específicamente eficaz contra *E. coli* MDR por muerte mediada por complemento, por ejemplo como se determina por un ensayo bactericida de suero (SBA, por sus siglas en inglés) *in vitro*, por ejemplo con al menos el 20 % de muerte de las bacterias por encima de las muestras control (sin anticuerpo o mAb control irrelevante añadido).

El anticuerpo es específicamente eficaz contra *E. coli* MDR por fagocitosis mediada por anticuerpos, por ejemplo como se determina por un ensayo de muerte opsonofagocítica (OPK, por sus siglas en inglés) *in vitro*, por ejemplo con al menos un 20 % de toma de bacterias de entrada o un 20 % menor de recuento de ufc finales por encima de las muestras control (sin anticuerpo o mAb control irrelevante añadido).

El anticuerpo es específicamente eficaz contra *E. coli* MDR por funciones que neutralizan endotoxinas, por ejemplo como se determina por un ensayo LAL *in vitro*, o un ensayo indicador del receptor 4 tipo toll (TLR4) por ejemplo con al menos un 20 % de reducción en las actividades de endotoxinas en comparación con las muestras control (sin anticuerpo o mAb control irrelevante añadido).

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo se administra en una formulación parenteral o mucosa.

Un aspecto adicional se refiere a una preparación farmacéutica de un anticuerpo descrito en el presente documento, preferentemente que comprende una formulación parenteral o mucosa, opcionalmente que contiene un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional se refiere a un anticuerpo descrito en el presente documento, para su uso diagnóstico para

detectar o determinar la infección de *E. coli* en un sujeto provocada por cepas MDR que expresan el antígeno LPS O25b, tales como con infecciones del tracto urinario superior e inferior, incluyendo cistitis o ureítis, pielonefritis ascendente o hematógena, especialmente en pacientes diabéticos, así como con bacteriemia, sepsis, peritonitis o colonización intestinal.

5 Específicamente, el anticuerpo se describe para su uso como se describe en el presente documento, donde una infección sistémica con *E. coli* MDR en un sujeto se determina *ex vivo* poniendo en contacto una muestra de fluido corporal de dicho sujeto con el anticuerpo, donde una reacción inmune específica del anticuerpo determina la infección.

10 Específicamente, una muestra de fluido corporal se ensaya para la reacción inmune específica, cuya muestra se selecciona del grupo que consiste en orina, sangre, aislados de sangre o cultivos sanguíneos, aspirados, esputos, fluido de lavado de sujetos intubados y materia fecal.

15 Específicamente, el uso diagnóstico como se describe en el presente documento se refiere a la determinación del serotipo de *E. coli in vitro* a partir de un cultivo de *E. coli* puro recuperado de un espécimen clínico.

20 Un aspecto adicional se refiere a una preparación diagnóstica de un anticuerpo descrito en el presente documento, que contiene opcionalmente el anticuerpo con un marcador y/o un reactivo diagnóstico adicional con un marcador, tal como un reactivo que reconoce específicamente el anticuerpo o un complejo inmune del anticuerpo con el antígeno diana respectivo y/o una fase sólida para inmovilizar al menos uno del anticuerpo y el reactivo diagnóstico. La preparación diagnóstica se describe como una composición o como un kit de partes, por ejemplo que comprende componentes, tales como componentes que comprenden

- 25 a) la preparación de anticuerpo diagnóstico y/o
b) el reactivo diagnóstico adicional,

y/o una fase sólida para inmovilizar al menos uno del anticuerpo y el reactivo diagnóstico, bien como un componente separado o bien como un vehículo de cualquiera de los componentes a) y/o b) anteriores.

30 Los ensayos diagnósticos preferidos descritos en el presente documento comprenden el anticuerpo descrito en el presente documento inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, perlas de látex, partículas de oro, etc., por ejemplo para ensayar la aglutinación por el anticuerpo de las bacterias que expresan el antígeno O25b o el antígeno O25b libre (o aislado) obtenido a partir de una muestra a ensayarse.

35 Algunos ensayos diagnósticos pueden implicar dos anticuerpos diferentes con especificidad y/o afinidad diferentes para unir O25b y/u O25a, de manera que posiblemente se diferencie entre los antígenos O25b y O25a.

40 Un aspecto específico se refiere diagnósticos de compañía para determinar la infección de un sujeto con *E. coli* MDR mediante los diagnósticos descritos en el presente documento o el método diagnóstico descrito en el presente documento, para proporcionar la base de tratamiento con un producto terapéutico contra dicha infección, por ejemplo empleando inmunoterapia, tal como tratar con un anticuerpo descrito en el presente documento.

45 Un aspecto específico se refiere a un diagnóstico de cabecera sensible descrito en el presente documento para diagnosticar la infección de un sujeto con *E. coli* MDR determinando el LPS libre, por ejemplo, a partir de un espécimen clínico donde la cantidad de bacterias vivas está limitada. La sensibilidad de dicho ensayo es específicamente menos de 100 ng preferentemente menos de 10 ng de LPS.

50 Un aspecto adicional se refiere a un epítipo aislado reconocido por el anticuerpo designado 8D5-1G10 u 8D10-C8. Dicho epítipo puede consistir en un epítipo único o una mezcla de epítipos que comprenden variantes de epítipos, cada uno reconocido por el anticuerpo específico designado 8D5-1G10 u 8D10-C8. Específicamente, el epítipo del anticuerpo 8D10-C8 es uno compartido y prevalente en ambos antígenos O25b y O25a, de esta manera, el anticuerpo se considera ser específico cruzado, aunque uniendo preferencialmente el antígeno O25b al menos igual que uniendo el antígeno O25a.

55 Un aspecto adicional se refiere a un inmunógeno que comprende:

- 60 (a) un epítipo descrito en el presente documento;
(b) opcionalmente epítipos adicionales no asociados de forma nativa a dicho epítipo de (a); y
(c) un vehículo.

Específicamente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende preferentemente sustancias tamponantes y/o adyuvantes.

65 El inmunógeno descrito en el presente documento se proporciona preferentemente en una formulación de vacuna, preferentemente para uso parenteral.

Específicamente el inmunógeno descrito en el presente documento se proporciona para uso médico, específicamente para su uso en el tratamiento de un sujeto administrando una cantidad eficaz de dicho inmunógeno para proteger al sujeto de una infección de *E. coli* MDR o para prevenir una afección de enfermedad que resulta de dicha infección.

5 Específicamente el inmunógeno descrito en el presente documento se proporciona para provocar una respuesta inmune protectora.

10 De acuerdo con un aspecto específico, se proporciona además un método de tratamiento donde se trata un sujeto en riesgo de una infección de *E. coli* MDR, cuyo método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del inmunógeno para prevenir la infección en el sujeto, en particular para protegerlo contra *E. coli* MDR patogénica.

15 Un aspecto adicional descrito en el presente documento se refiere a un ácido nucleico asilado que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento o que codifica un epítipo descrito en el presente documento.

Figuras

20 Figura 1: Tinción de superficie de diferentes cepas ST131:O25b que expresan los antígenos O25b, O25a o O2 por mAb específicos de O25b (con o sin reactividad cruzada al antígeno O25a).

Figura 2: reactividad de diferentes mAb y suero de conejo O25 a moléculas de LPS O25a y O25b en un ensayo de inmunotransferencia.

Figura 3: (a): Estructura de la unidad de repetición del antígeno O25b de *E. coli*. (b): estructura de la unidad de repetición del antígeno O25a de *E. coli* (también denominada O25, a veces denominada O25(a)) para comparación (Kenne et al, 1985).

25 Figura 4: Detección de cepas de *E. coli* que expresan el antígeno O25b con ensayo de aglutinación usando mAb 8D5-1 G10 acoplado a perlas de látex.

Figura 5: Detección del antígeno O25b soluble con ensayo de aglutinación usando mAb 8D5-1 G10 acoplado a perlas de látex.

30 Figura 6: Protección proporcionada por inmunización pasiva de ratones con mAb murinos específicos de O25b contra un posterior desafío letal intravenoso por un aislado clínico ST131:O25b.

Figura 7: Muerte celular bacteriana dependiente de complemento mediada por los mAb específicos de O25b.

Descripción detallada

35 El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento puede referirse a polipéptidos o proteínas que consisten en o comprenden dominios de anticuerpo, que se entienden como dominios constantes y/o variables de las cadenas pesada y/o ligera de las inmunoglobulinas, con o sin una secuencia conectora. Los polipéptidos se entienden como dominios de anticuerpo si comprenden una estructura en barril beta que consiste en al menos dos cadenas beta de una estructura de dominio de anticuerpo conectada por una secuencia en bucle. Los dominios de anticuerpo pueden ser de estructura nativa o modificada por mutagénesis o derivatización, por ejemplo para modificar las propiedades de unión a antígeno o cualquier otra propiedad, tal como estabilidad o propiedades funcionales, tales como la unión a los receptores Fc FcRn y/o el receptor Fc gamma.

45 El anticuerpo como se usa en el presente documento tiene un sitio de unión específico para unir uno o más antígenos o uno o más epítopos de dichos antígenos, específicamente que comprenden un sitio de unión a CDR de un único dominio variable de anticuerpo, tales como VH, VL o VHH, o un sitio de unión de pares de dominios variables de anticuerpos, tales como un par VL/VH, un anticuerpo que comprende un par de dominios VL/VH y dominios constantes de anticuerpos, tales como Fab, F(ab'), (Fab)₂, scFv o un anticuerpo de longitud completa.

50 El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento puede referirse particularmente a formatos de anticuerpos que comprenden o consisten en un único dominio variable de anticuerpo, tales como VH, VL o VHH, o combinaciones de dominios de anticuerpo variables y/o constantes con o sin una secuencia de unión o región bisagra, incluyendo pares de dominios variables de anticuerpo, tales como un par VL/VH, un anticuerpo que comprende o consiste en un par de dominios VL/VH y dominios constantes de anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena pesada, Fab, F(ab'), (Fab)₂, scFv, Fd, Fv o un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo de un anticuerpo tipo IgG (por ejemplo, un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM. La frase "anticuerpo de longitud completa" puede usarse para referirse a cualquier molécula de anticuerpo que comprende al menos la mayoría del dominio Fc y otros dominios comúnmente encontrados en un monómero de anticuerpo de origen natural. Esta frase se usa en el presente documento para empatizar que una molécula de anticuerpo particular no es un fragmento de anticuerpo.

65 El término "anticuerpo" puede incluir específicamente anticuerpos en forma aislada, por ejemplo, que están sustancialmente libres de otros anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos diana o que comprenden una disposición estructural diferente de dominios de anticuerpo. Todavía, un anticuerpo aislado puede estar comprendido en una preparación de combinación, que contiene una combinación del anticuerpo aislado, por ejemplo con al menos un anticuerpo distinto, tales como anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo que tienen

diferentes especificidades.

El término “anticuerpo” puede aplicarse a anticuerpos de origen animal, incluyendo la especie humana, tales como de mamíferos, incluyendo humano, murino, conejo, cabra, llama, vaca y caballo, o de aves, tales como gallina.

5 El término “anticuerpo” se aplica además a anticuerpos quiméricos con secuencias de origen de diferentes especies, tales como secuencias de origen murino y humano.

10 El término “quimérico” como se usa con respecto a un anticuerpo se refiere a aquellos anticuerpos donde una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento que queda de la cadena es homólogo a secuencias correspondientes en otra especie o clase. Típicamente la región variable de ambas cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivados de otras. Por ejemplo, la región variable puede derivar de fuentes actualmente conocidas usando linfocitos B disponibles o hibridomas de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones de células humanas.

20 El término “anticuerpo” se aplica además a anticuerpos humanizados.

El término “humanizado” como se usa con respecto a un anticuerpo se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, donde la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender bien dominios variables completos fusionados sobre dominios constantes o solamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas sobre regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados, por ejemplo por una o más sustituciones de aminoácidos, preferentemente modificadas para parecer inmunoglobulinas humanas más cercanamente. Algunas formas de anticuerpos humanizados preservan todas las secuencias CDR (por ejemplo un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que se alteran con respecto al anticuerpo original.

30 El término “anticuerpo” se aplica además a anticuerpos humanos.

35 El término “humano” como se usa con respecto a un anticuerpo, se entiende que incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. El anticuerpo humano descrito en el presente documento puede incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específicas de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR. Los anticuerpos humanos incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

45 El término específicamente se aplica a los anticuerpos de cualquier clase o subclase. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos pueden asignarse a las clases principales de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de estos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

50 El término se aplica además a anticuerpos monoclonales o policlonales, específicamente un anticuerpo recombinante, cuyo término incluye todos los anticuerpos y estructuras de anticuerpo que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos que se originan de animales, por ejemplo mamíferos incluyendo humanos, que comprenden genes o secuencias de diferente origen, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados o anticuerpos derivados de hibridoma. Los ejemplos adicionales se refieren a anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, o anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos o dominios de anticuerpo, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de las secuencias génicas del anticuerpo a otras secuencias de ADN.

60 Se entiende que el término “anticuerpo” se refiere también a derivados de un anticuerpo, en particular derivados funcionalmente activos. Un derivado de anticuerpo se entiende como cualquier combinación de uno o más dominios de anticuerpo o anticuerpos y/o una proteína de fusión, donde cualquier dominio del anticuerpo puede fusionarse en cualquier posición de una o más proteínas distintas, tales como otros anticuerpos, por ejemplo, una estructura de unión que comprende bucles de CDR, un polipéptido receptor, pero también ligandos, proteínas de andamiaje, enzimas, toxinas y similares. Un derivado del anticuerpo puede obtenerse por asociación o unión a otras sustancias por diversas técnicas químicas tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, unión disulfuro etc. Las otras sustancias unidas al anticuerpo pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). En un aspecto específico, el anticuerpo es un derivado que comprende una etiqueta adicional que permite la interacción específica

65

con un compuesto biológicamente aceptable. No hay una limitación específica con respecto a la etiqueta usable como se describe en el presente documento, siempre que no tenga impacto negativo o sea tolerable en la unión del anticuerpo a su diana. Los ejemplos de etiquetas adecuadas incluyen etiqueta His, etiqueta Myc, etiqueta FLAG, etiqueta Strep, etiqueta Calmodulina, etiqueta GST, etiqueta MBP y etiqueta S. En otro aspecto específico, el anticuerpo es un derivado que comprende un marcador. El término “marcador” como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo de manera que se genera un anticuerpo “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí mismo, por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Los derivados preferidos como se describen en el presente documento son funcionalmente activos con respecto a la unión de antígenos, preferentemente que tienen una potencia para combatir *E. coli* MDR y su endotoxina, por ejemplo como se determina en un ensayo SBA, OPK o LAL, o para proteger contra el desafío bacteriano o para neutralizar la endotoxemia letal.

Los anticuerpos derivados de un anticuerpo parental o una secuencia de anticuerpo se entienden particularmente en el presente documento como mutantes o variantes obtenidos por ejemplo *in silico* o por ingeniería recombinante o cualquiera por derivatización o síntesis química.

Específicamente, un anticuerpo derivado de un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender al menos una o más de las regiones CDR o variantes de CDR del mismo siendo funcionalmente activas en la unión diferencialmente al antígeno O25b, por ejemplo uniendo específica o selectivamente el antígeno O25b.

Se entiende que el término “anticuerpo” también se refiere a variantes de un anticuerpo.

El término “variante” puede referirse particularmente a anticuerpos, tales como anticuerpos mutantes o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo obtenidos por métodos de mutagénesis, en particular eliminar, intercambiar, introducir insertos en una secuencia de aminoácidos o región de anticuerpo específico o derivatizar químicamente una secuencia de aminoácidos, por ejemplo en los dominios constantes para diseñar por ingeniería la estabilidad, la función efectora o la vida media del anticuerpo, o en los dominios variables para mejorar las propiedades de unión a antígeno, por ejemplo por técnicas de maduración de afinidad. Puede emplearse cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, incluyendo mutaciones puntuales en posiciones deseadas, por ejemplo obtenidas por técnicas de aleatorización. En algunos casos las posiciones se eligen aleatoriamente, por ejemplo con cualquiera de los posibles aminoácidos o bien una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias de anticuerpos. El término “mutagénesis” se refiere a cualquier técnica reconocida en la materia para alterar una secuencia de polinucleótido o de polipéptido. Los tipos preferidos de mutagénesis incluyen mutagénesis por PCR propensa a errores, mutagénesis por saturación u otra mutagénesis dirigida al sitio.

El término “variante” específicamente abarca variantes funcionalmente activas.

La frase “variante funcionalmente activa” de un anticuerpo como se usa en el presente documento, significa una secuencia que resulta de la modificación de esta secuencia (un anticuerpo parental o una secuencia parental), por ejemplo por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos, tales como por técnicas de recombinación o derivatización química de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, o nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos, o en cualquiera o ambos de los extremos distales de la secuencia y cuya modificación no afecta (en particular disminuye) la actividad de esta secuencia. En el caso de un sitio de unión que tenga especificidad por un antígeno diana seleccionado, la variante funcionalmente activa de un anticuerpo tendría todavía la especificidad de unión predeterminada, aunque esto podría cambiarse, por ejemplo para cambiar la especificidad fina a un epítipo específico, la afinidad, la avidéz, la tasa de Kon o Koff, etc. Específicamente, las variantes funcionalmente activas de un anticuerpo descrito en el presente documento tienen la potencia para unir el antígeno O25b y la especificidad o la selectividad para unir preferencialmente al antígeno O25b con respecto a otros antígenos de *E. coli*, por ejemplo unión a O25b y no unión al antígeno O25a de *E. coli*, o no unir significativamente al antígeno O25a, o unirse a ambos específicamente cruzados, a los antígenos O25b y O25a, pero no unirse a otros antígenos de *E. coli*.

Las variantes funcionalmente activas pueden obtenerse, por ejemplo, cambiando la secuencia de un anticuerpo parental, por ejemplo, un anticuerpo que comprende el mismo sitio de unión que el anticuerpo designado 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 o 8D10-C8, pero con modificaciones dentro de una región de anticuerpo además del sitio de unión, o derivado de un anticuerpo parental, que es cualquiera de los anticuerpos 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 o 8D10-C8, por una modificación dentro del sitio de unión pero que no deteriora la unión a antígeno y preferentemente tendría una actividad biológica similar al anticuerpo parental, incluyendo la capacidad de unir específica o selectivamente al antígeno O25b, por ejemplo, unión a O25b y no unión al antígeno O25a de *E. coli*, o no unir selectivamente el antígeno O25a, o unir específicamente cruzado a ambos antígenos O25b y O25a, pero no unirse a otros antígenos de *E. coli*. Opcionalmente, las variantes funcionalmente activas pueden incluir además una potencia de muerte mediada por complemento en un ensayo SBA y/u opcionalmente incluyen además una potencia de una fagocitosis mediada por anticuerpo en un ensayo OPK y/u opcionalmente incluyen además una función de

neutralización de endotoxinas en un ensayo LAL, por ejemplo, con sustancialmente la misma actividad biológica, como se determina por el ensayo de unión específico o la prueba funcional para marcar como diana *E. coli* MDR.

5 Por ejemplo, las variantes funcionalmente activas de los anticuerpos 6D1-1B2 y 8A1-1G8 tienen sustancialmente las mismas y similares afinidades de unión que el anticuerpo 8D5-1G10 (véase la tabla a continuación).

6D1-1B2			8A1-1G8			8D5-1G10		
KD (nM)	Kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (nM)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	KD (nM)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
0,6	8,43E+04	< 5,0 E-05	4,72	4,01E+04	1,89E-04	1,76	4,23E+04	7,44E-05

10 La frase “sustancialmente la misma actividad biológica” como se usa en el presente documento se refiere a la actividad como se indica por sustancialmente la misma actividad siendo al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o incluso al menos el 100 % o al menos el 110 %, o al menos el 120 %, o al menos el 130 %, o al menos el 140 %, o al menos el 150 %, o al menos el 160 %, o al menos el 170 %, o al menos el 180 %, o al menos el 190 %, por ejemplo hasta el 200 % de la actividad como se determina por el anticuerpo parental.

15 Las variantes o los derivados preferidos como se describen en el presente documento son funcionalmente activos con respecto a la unión de antígeno, preferentemente que tienen una potencia para unir específicamente el antígeno O25b y no se unen a otros antígenos de *E. coli* por ejemplo se une a O25b y no se une al antígeno O25a de *E. coli*, o no se une significativamente al antígeno O25a, o unir específicamente cruzado a ambos antígenos O25b y O25, por ejemplo se une preferencialmente al antígeno O25b con respecto a O25a, o se une a O25b con afinidad más alta en comparación a sueros tipificados policlonales aumentados contra cepas O25 (O25a). Las variantes preferidas no se unen a otros antígenos de *E. coli*, con una diferencia de valor de Kd de al menos 2 logaritmos, preferentemente al menos 3 logaritmos y opcionalmente además incluyendo una potencia de muerte mediada por complemento en un ensayo SBA, por ejemplo para lograr una reducción significativa en los recuentos bacterianos con respecto a las muestras control que no contienen el anticuerpo y/u opcionalmente incluyen además una potencia de fagocitosis mediada por anticuerpo en un ensayo OPK, tal como para lograr una reducción significativa en los recuentos bacterianos con respecto a las muestras control que no contienen el anticuerpo, y/u opcionalmente incluyen además una función de neutralización de endotoxinas en un ensayo de señalización LAL o TLR4, tal como para lograr una reducción significativa en el LPS libre con respecto a las muestras control que no contienen el anticuerpo, por ejemplo, con sustancialmente la misma actividad biológica, como se determina por el ensayo de unión específico o la prueba funcional para marcar como diana *E. coli* MDR. La reducción significativa de analitos en los diversos ensayos significa típicamente la reducción de al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 98 % hasta completar la reducción de aproximadamente el 100 % (+/- 1 %).

35 En un aspecto preferido la variante funcionalmente activa de un anticuerpo parental

- 35 a) es un fragmento biológicamente activo del anticuerpo, comprendiendo el fragmento al menos el 50 % de la secuencia de la molécula, preferentemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % y lo más preferentemente al menos el 97 %, el 98 % o el 99 %;
- 40 b) deriva del anticuerpo por al menos una sustitución, adición y/o delección de aminoácidos, donde la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia a la molécula o parte de él, tal como un anticuerpo de al menos un 50 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, todavía más preferentemente al menos un 90 %, incluso más preferentemente al menos un 95 % y lo más preferentemente al menos un 97 %, un 98 % o un 99 %; y/o
- 45 c) consiste en el anticuerpo o una variante funcionalmente activa del mismo y adicionalmente al menos un aminoácido o un nucleótido heterólogo a la secuencia del polipéptido o del nucleótido.

50 En un aspecto preferido descrito en el presente documento, la variante funcionalmente activa del anticuerpo descrito en el presente documento es esencialmente idéntica a la variante descrita anteriormente, pero difiere de su polipéptido o la secuencia de nucleótido, respectivamente, en que deriva de una secuencia homóloga de una especie diferente. Estas se denominan variantes de origen natural o análogos.

55 La frase “variante funcionalmente activa” también incluye variantes alélicas de origen natural, así como mutantes o cualquier otra variante de origen no natural. Como se sabe en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli) péptido que se caracteriza por tener una sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos que no alteran esencialmente la función biológica del polipéptido.

60 Las variantes funcionalmente activas pueden obtenerse por alteraciones de secuencia en la secuencia del polipéptido o del nucleótido, por ejemplo por una o más mutaciones puntuales, donde las alteraciones de la secuencia retienen una función de la secuencia del polipéptido o del nucleótido sin alterar, cuando se usan en combinación como se describe en el presente documento. Dichas alteraciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones (conservativas), adiciones, delecciones, mutaciones e inserciones.

- Las variantes funcionalmente activas específicas son variantes de CDR. Una variante de CDR incluye una secuencia de aminoácidos modificada por al menos un aminoácido en la región CDR, donde dicha modificación puede ser una alteración química o parcial de la secuencia de aminoácidos, cuya modificación permite que la variante retenga las características biológicas de la secuencia sin modificar. Una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de CDR puede ser la delección o la sustitución de uno a varios aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o por adición o inserción de uno a varios aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o combinaciones de los mismos. Las sustituciones en los restos de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituyendo un resto de aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo.
- Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y sus propiedades químicas. Los ejemplos de dichas familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas apolares, con cadenas laterales aromáticas apolares, con cadenas laterales polares no cargadas, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes etc.
- Una mutación puntual se entiende particularmente como el diseño por ingeniería de un polinucleótido que resulta en la expresión de una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos no diseñada por ingeniería en la sustitución o intercambio, delección o inserción de uno o más aminoácidos únicos (no consecutivos) o dobles para diferentes aminoácidos.
- Las mutaciones puntuales preferidas se refieren al intercambio de aminoácidos de la misma polaridad y/o carga. Con respecto a esto, los aminoácidos se refieren a veinte aminoácidos de origen natural codificados por sesenta y cuatro codones de triplete. Estos 20 aminoácidos pueden dividirse en aquellos que tienen cargas neutras, cargas positivas y cargas negativas:
- Los aminoácidos "neutros" se muestran a continuación junto con sus códigos respectivos de tres letras y de una letra y la polaridad:
- Alanina: (Ala, A) apolar, neutra;
 - Asparagina: (Asn, N) polar, neutra;
 - Cisteína: (Cys, C) apolar, neutra;
 - Glutamina: (Gln, Q) polar, neutra;
 - Glicina: (Gly, G) apolar, neutra;
 - Isoleucina: (Ile, I) apolar, neutra;
 - Leucina: (Leu, L) apolar, neutra;
 - Metionina: (Met, M) apolar, neutra;
 - Fenilalanina: (Phe, F) apolar, neutra;
 - Prolina: (Pro, P) apolar, neutra;
 - Serina: (Ser, S) polar, neutra;
 - Treonina: (Thr, T) polar, neutra;
 - Triptófano: (Trp, W) apolar, neutra;
 - Tirosina: (Tyr, Y) polar, neutra;
 - Valina: (Val, V) apolar, neutra; and
 - Histidina: (His, H) polar, positiva (10 %) neutra (90 %).
- Los aminoácidos cargados "positivamente" son:
- Arginina: (Arg, R) polar, positiva; y
 - Lisina: (Lys, K) polar, positiva.
- Los aminoácidos cargados "negativamente" son:
- Ácido aspártico: (Asp, D) polar, negativa; y
 - Ácido glutámico: (Glu, E) polar, negativa.
- "Identidad de secuencia de aminoácidos en porcentaje (%)" con respecto a las secuencias de anticuerpos y los homólogos descritos en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos específica., después de alinear la secuencia e introducir huecos, si es necesario, para lograr la máxima identidad de secuencia en porcentaje y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.
- Una variante de anticuerpo se entiende específicamente que incluye homólogos, análogos, fragmentos, modificaciones o variantes con un patrón de glucosilación específico, por ejemplo producido por glucoingeniería, que son funcionales y pueden servir como equivalentes funcionales, por ejemplo que se unen a las dianas específicas y con propiedades funcionales.

Un anticuerpo descrito en el presente documento puede o puede no exhibir función efectora Fc. Preferentemente el anticuerpo exhibe función efectora Fc y es funcionalmente activo en un ensayo SBA y/u OPK. Los anticuerpos específicos pueden estar desprovistos de un resto Fc activo, de esta manera, cualquiera compuesto por dominios de anticuerpo que no contienen una parte Fc de un anticuerpo o que no contienen un sitio de unión al receptor Fc γ 1, o que comprende dominios de anticuerpo que carecen de función efectora Fc, por ejemplo por modificaciones para reducir funciones efectoras Fc. Los anticuerpos alternativos pueden diseñarse por ingeniería para incorporar modificaciones para aumentar funciones efectoras Fc, en particular para potenciar la actividad OPK y/o SBA.

Tales modificaciones pueden efectuarse por mutagénesis, por ejemplo mutaciones en el sitio de unión al receptor Fc γ 1 o por derivados o agentes que interfieren con la actividad ADCC y/o CDC de un formato de anticuerpo, de manera que se logra la reducción o el aumento de la función efectora Fc.

Una reducción significativa de la función efectora Fc se entiende típicamente que se refiere a la función efectora Fc de menos del 10 % del formato sin modificar (tipo silvestre), preferentemente menos del 5 %, como se mide por la actividad ADCC y/o CDC. Un aumento significativo de la función efectora Fc se entiende típicamente que se refiere a un aumento en la función efectora Fc de al menos el 10 % del formato sin modificar (tipo silvestre), preferentemente al menos el 20 %, el 30 %, el 40 % o el 50 %, como se mide por la actividad ADCC y/o CDC.

El término variantes de “glucoingeniería” con respecto a secuencias de anticuerpo puede referirse a variantes de glucosilación que tienen propiedades inmunogénicas modificadas, ADCC y/o CDC como resultado de la glucoingeniería. Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, poseyendo cada isótopo una matriz distinta de estructuras de carbohidratos N-unidas, cuya variabilidad afecta al ensamblaje, la secreción o la actividad funcional de la proteína. Los anticuerpos de tipo IgG1 son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación N unido conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos en Asn297 se entierran entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie las funciones efectoras tales como la muerte bacteriana mediada por el complemento dependiente de anticuerpo o la toma por las células fagocíticas. La retirada del N-Glucano en N297, por ejemplo a través de la mutación de N297, por ejemplo en A, o T299 da como resultado típicamente formatos de anticuerpo aglucosilados con función efectora reducida.

Las diferencias principales en la glucosilación de anticuerpos ocurren entre las líneas celulares y se ven incluso diferencias minoritarias para una línea celular dada crecida en diferentes condiciones de cultivo. La expresión en células bacterianas proporciona típicamente un anticuerpo aglucosilado. Las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisector, se informó que tenía una actividad funcional (ADCC) mejorada (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180). Además de la elección de las células hospedadoras, los factores que afectan a la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de los medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares.

La frase “sitio de unión a antígeno” o “sitio de unión” se refiere a la parte de un anticuerpo que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígeno se forma por restos de aminoácido de las regiones variables (“V”) N-terminales de las cadenas pesadas (“H”) y/o ligeras (“L”), o los dominios variables de las mismas. Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras, denominadas “regiones hipervariables”, se interponen entre tramos de los flancos más conservados conocidos como regiones marco. El sitio de unión a antígeno proporciona una superficie que es complementaria a la superficie tridimensional de un epítipo o antígeno unido y las regiones hipervariables se denominan “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR”. El sitio de unión incorporado en la CDR se denomina también en el presente documento “sitio de unión a CDR”.

El término “antígeno” como se usa en el presente documento intercambiamente con los términos “diana” o “antígeno diana” debe referirse a una molécula diana entera o un fragmento de dicha molécula reconocida por un sitio de unión a antígeno. Específicamente, las subestructuras de un antígeno, por ejemplo un polipéptido o una estructura de carbohidrato, generalmente denominados “epítopos”, por ejemplo epítopos de linfocitos B o epítopos de linfocitos T, que son inmunológicamente relevantes, pueden reconocerse por dicho sitio de unión. Los antígenos específicos como los antígenos O25b u O25a se proporcionan como antígenos aislados si no en forma de las células o fracciones celulares de *E. coli*.

El término “epítipo” como se usa en el presente documento debe referirse en particular a una estructura molecular que puede formar completamente un compañero de unión específico o ser parte de un compañero de unión específico a un sitio de unión de un anticuerpo. Un epítipo puede ser bien de origen natural o artificial y estar compuesto por un carbohidrato, una estructura peptídica, un ácido graso, una sustancia bioquímica o inorgánica o derivados de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Si un epítipo está comprendido por una estructura peptídica, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, incluirá habitualmente al menos 3 aminoácidos, preferentemente de 5 a 40 aminoácidos y más preferentemente entre aproximadamente 10-20 aminoácidos. Los

epítomos pueden ser lineales o bien epítomos conformacionales. Un epítomo lineal está comprendido por un único segmento de una secuencia primaria de un polipéptido o una cadena de carbohidrato. Los epítomos lineales pueden ser contiguos o solaparse. Los epítomos conformacionales están comprendidos por aminoácidos o carbohidratos puestos juntos plegando el polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no están necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal. Específicamente y con respecto a antígenos polipeptídicos un epítomo conformacional o discontinuo se caracteriza por la presencia de dos o más restos de aminoácidos discretos, separados en la secuencia primaria, pero que se ensamblan en una estructura consistente en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína/el antígeno nativos.

En el presente documento el término “epítomo” debe referirse particularmente al epítomo único reconocido por un anticuerpo, o la mezcla de epítomos que comprende variantes de epítomos, cada uno reconocido por un anticuerpo que reconoce específicamente la diana, por ejemplo el epítomo reconocido específicamente por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos designados 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 y 8D10-C8. Específicamente, el epítomo marcado como diana por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 y 8D10-C8 es un epítomo carbohidrato.

El término “expresión” se entiende de la siguiente manera. Las moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de codificación deseada de un producto de expresión tal como por ejemplo un anticuerpo como se describe en el presente documento, y las secuencias control tales como por ejemplo un promotor en unión operativa, pueden usarse para fines de expresión. Los hospedadores transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin embargo, el ADN relevante también puede integrarse en el cromosoma hospedador. Específicamente el término se refiere a una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula hospedadora.

El ADN codificante es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos particular para un polipéptido particular o una proteína tal como por ejemplo un anticuerpo. El promotor de ADN es una secuencia de ADN que inicia, regula o de otra manera media o controla la expresión del ADN codificante. El ADN promotor y el ADN codificante pueden ser del mismo gen o de genes diferentes y pueden ser del mismo o diferentes organismos. Los vectores de clonación recombinantes incluirán normalmente uno o más sistemas de replicación para la clonación o la expresión, o uno o más marcadores para la selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y una o más casetes de expresión.

Los “vectores” usados en el presente documento se definen como secuencias de ADN que se requieren para la transcripción de secuencias de nucleótido recombinantes, es decir de genes recombinantes y la traducción de sus ARNm en un organismo hospedador adecuado.

Una “casete de expresión” se refiere a una secuencia codificante de ADN o un segmento de ADN que codifica para un producto de expresión que puede insertarse en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción de casete se diseñan para asegurar la inserción de la casete en el marco de lectura apropiado. Generalmente, el ADN extraño se inserta en uno o más sitios de restricción del ADN del vector, y después se transporta por el vector dentro de una célula hospedadora junto con el ADN del vector transmisible. Un segmento o una secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también puede denominarse una “construcción de ADN”.

Los vectores de expresión comprenden la casete de expresión y adicionalmente comprenden de forma habitual un origen para la replicación autónoma en las células hospedadoras o un sitio de integración del genoma, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo un gen de síntesis de aminoácidos o un gen que confiere resistencia a antibióticos tales como zeocina, kanamicina, G418 o higromicina), un número de sitios de escisión de enzimas de restricción, una secuencia promotora adecuada y un terminador de la transcripción, cuyos componentes se unen operativamente juntos. El término “vector” como se usa en el presente documento incluye secuencias de nucleótidos que se replican autónomamente así como secuencias de nucleótido integrantes del genoma. Un tipo común de vector es un “plásmido”, que generalmente es una molécula auto-contenida de ADN de doble cadena que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede introducirse fácilmente en una célula hospedadora adecuada. Un vector plasmídico normalmente contiene ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN extraño. Específicamente, el término “vector” o “plásmido” se refiere a un vehículo por el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo un gen extraño) puede introducirse en una célula hospedadora, de manera que transforme al hospedador y promueva la expresión (por ejemplo transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

La frase “célula hospedadora” como se usa en el presente documento debe referirse a células del sujeto primario transformadas para producir una proteína recombinante particular, tales como un anticuerpo como se describe en el presente documento y cualquier progenie de los mismos. Debe entenderse que no toda la progenie es exactamente idéntica a la célula parental (debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas o las diferencias en el ambiente), sin embargo, dicha progenie alterada se incluye en estos términos, siempre que la progenie retenga la misma

funcionalidad que aquella de la célula originalmente transformada. La frase "línea celular hospedadora" se refiere a una línea celular de células hospedadoras como se usa para expresar un gen recombinante para producir polipéptidos recombinantes tales como anticuerpos recombinantes. La frase "línea celular" como se usa en el presente documento se refiere a un clon establecido de un tipo celular particular que ha adquirido la capacidad de proliferar durante un periodo de tiempo prolongado. Dicha célula hospedadora o línea celular hospedadora puede mantenerse en cultivo celular y/o cultivarse para producir un polipéptido recombinante.

Una "respuesta inmune" a una composición, por ejemplo una composición inmunogénica, en el presente documento también denominada "inmunógeno" que comprende un antígeno o epítipo, o una vacuna como se describe en el presente documento es el desarrollo en el hospedador o sujeto de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Habitualmente, dicha respuesta consiste en el sujeto produciendo anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T ayudantes, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos dirigidos específicamente contra un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés.

Una "respuesta inmune protectora" se entiende como una respuesta inmune terapéutica y se refiere a una respuesta inmune a un antígeno derivado de un patógeno, que de alguna manera previene, mejora, trata o al menos parcialmente arresta los síntomas, los efectos secundarios o el avance de la enfermedad. Específicamente la respuesta inmune protectora se dispara que proporciona un rendimiento significativamente mejor de una infección inducida o natural o un desafío de toxina en comparación con aquel de la población no inmune.

Un inmunógeno o una composición inmunogénica comprende habitualmente el antígeno o el epítipo y un vehículo, que puede comprender específicamente un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta y/o redirige la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune por varios mecanismos incluyendo reclutamiento de linfocitos, estimulación de linfocitos b y/o T y estimulación de macrófagos. Los vehículos ejemplares son liposomas o péptidos catiónicos; los adyuvantes ejemplares son fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio, MF59 u oligonucleótido CpG.

El término "aislado" o "aislamiento" como se usa en el presente documento con respecto a un ácido nucleico, un anticuerpo u otro compuesto debe referirse a dicho compuesto que se ha separado suficientemente del ambiente al que de forma natural se asociaría, de tal manera que exista en forma "sustancialmente pura". "Aislado" no significa necesariamente la exclusión de mezclas sintéticas o artificiales con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad fundamental y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a la purificación incompleta. En particular, las moléculas de ácidos nucleicos aisladas descritas en el presente documento también se entiende que incluye aquellas sintetizadas químicamente.

Con referencia a los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, a veces se usa la frase "ácido nucleico aislado". Esta frase, cuando se aplica al ADN, se refiere a una molécula de ADN que se separa de las secuencias a las que está inmediatamente contigua en el genoma de origen natural del organismo en el que se originó. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o un vector vírico, o integrada en el ADN genómico de una célula procarionota o eucariota o un organismo hospedador. Cuando se aplica al ARN, la frase "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada como se define anteriormente. De forma alternativa, la frase puede referirse a una molécula de ARN que se ha separado suficientemente de otros ácidos nucleicos a los que se asociaría en su estado natural (es decir, en las células o los tejidos). Un "ácido nucleico aislado" (bien ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.

Con referencia a los polipéptidos o proteínas, tales como anticuerpos o epítopos descritos en el presente documento, el término "aislado" debe referirse específicamente a compuestos que están libres o sustancialmente libres de material al que se asocian de forma natural tales como otros compuestos con los que se encuentran en su ambiente natural, o el ambiente en el que se preparan (por ejemplo cultivo celular) cuando dicha preparación es por tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los compuestos aislados pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y aislarse aún para fines prácticos - por ejemplo, los polipéptidos o polinucleótidos pueden mezclarse con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia. En particular, el anticuerpo aislado descrito en el presente documento difiere de preparaciones de suero policlonal elevadas contra cepas O25(a), porque se proporciona en forma aislada y purificada, preferentemente se proporciona en una preparación que comprende el anticuerpo aislado como la única sustancia activa. Esto no excluye, sin embargo, que el anticuerpo aislado se proporcione en un producto de combinación que comprenda un número limitado de anticuerpos bien definidos (aislados) adicionales. Los anticuerpos aislados pueden proporcionarse igualmente en un vehículo sólido, semi-líquido o líquido, tal como perlas.

El término "neutralizante" o "neutralización" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a cualquier molécula que inhiba un patógeno, tal como *E. coli* MDR de que infecte a un sujeto, o que inhiba que el patógeno promueva infecciones produciendo toxinas proteicas potentes o que inhiba que las toxinas dañen una célula diana en un sujeto, independientemente del mecanismo por el que se logre la neutralización. La neutralización

puede lograrse, por ejemplo, por un anticuerpo que inhiba la unión y/o la interacción de la endotoxina de *E. coli* MDR con su receptor cognado en las células diana (por ejemplo la unión al receptor TLR4). La neutralización puede ocurrir además por la retirada de las moléculas de endotoxina de la circulación por funciones medidas por Fc.

- 5 La potencia de neutralización se determina típicamente en un ensayo convencional, por ejemplo, un ensayo LAL, donde la inhibición de la actividad biológica de la endotoxina se mide, por ejemplo, por colorimetría.

La frase "*E. coli* MDR" se entiende de la siguiente manera: Las infecciones con *E. coli* resistente a múltiples fármacos que están en una porción significativa se deben al linaje clonal ST131-O25b:H4, que emergió solamente
10 en la última década y se volvió un clon resistente dominante globalmente propagado. *E. coli* multi-resistente se entiende particularmente como aquellas cepas que demuestran resistencia a tres o más clases de antibióticos, por ejemplo los siguientes agentes/grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, nitrofurantoína, trimetoprim (y sus combinaciones), fosfomicina, polimixinas, cloranfenicol, aztreonam, tigeciclina.

15 El polisacárido capsular ácido (CPS, por sus siglas en inglés) es una capa espesa tipo mucosa que rodea la mayoría del patógeno *E. coli*. Es, de esta manera, sorprendente que el epítipo específico reconocido por un anticuerpo descrito en el presente documento estuviera accesible tanto en la cepa encapsulada como en la no encapsulada de *E. coli* MDR.

20 Los anticuerpos que combaten o neutralizan *E. coli* MDR están interfiriendo con los patógenos y las reacciones patogénicas, de esta manera son capaces de limitar o prevenir la infección y/o aliviar una afección de enfermedad que resulta de dicha infección, o de inhibir la patogénesis de *E. coli* MDR, en particular la diseminación y la replicación en o dentro de compartimentos/sitios del cuerpo estériles del hospedador. Con respecto a esto los
25 "anticuerpos protectores" se entienden en el presente documento como anticuerpos que son responsables de la inmunidad a un agente infeccioso observado en inmunidad activa o pasiva. En particular, los anticuerpos protectores como se describen en el presente documento se usan posiblemente para fines terapéuticos, por ejemplo, para profilaxis o terapia, para prevenir, mejorar, tratar o al menos arrestar parcialmente síntomas de la enfermedad, efectos secundarios o avance de la enfermedad inducida por un patógeno. Específicamente, los anticuerpos
30 protectores son capaces de matar o impedir la replicación de las células de *E. coli* vivas induciendo actividades de suero bactericidas u opsonofagocíticas, o retirar las células bacterianas enteras o las moléculas de LPS de las mismas de los sitios del cuerpo estériles después de las aplicaciones terapéuticas (es decir, dadas en una infección establecida). Alternativamente, los anticuerpos protectores aplicados profilácticamente inhiben el establecimiento de una infección (es decir, la extensión de *E. coli* desde sitios no estériles a compartimentos del cuerpo estériles) por
35 uno de los mecanismos anteriormente mencionados u otros distintos.

La frase "antígeno O25b" se entiende en el presente documento el O-antígeno LPS con la estructura elucidada en el ejemplo 2 y la Figura 3 (a). La estructura es similar, pero distinta a aquella del antígeno O25(a). O25b se entiende en el presente documento como un serotipo, que es similar, pero distinto de O25a (véase la Figura 3(a)).

40 La frase "antígeno O25" se entiende en el presente documento como el antígeno hecho de la unidad de repetición de pentasacárido descrita por Kenne et al. (Kenne L, Lindberg B, Madden JK, Lindberg AA, Gemski P Jr. Structural studies of the *Escherichia coli* O-antigen 25. Carbohydr Res. 28;122(2):249-56, 1983). Antes de identificar el antígeno O25b, el término O25 se ha usado para O25a como se describe en el presente documento (véase la Figura
45 3 (b)).

La frase "antígeno O25a" se entiende en el presente documento como un sinónimo para antígeno O25.

50 El término "recombinante" como se usa en el presente documento debe significar "siendo preparado por o el resultado de ingeniería genética". Un hospedador recombinante comprende específicamente un vector de expresión o un vector de clonación, o se ha diseñado por ingeniería genética para contener una secuencia de ácidos nucleicos recombinantes, en particular que emplea una secuencia de nucleótidos extraña al hospedador. La frase "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que
55 es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulinas humanas o un híbrido preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinantes combinatorios y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulinas para otras secuencias de ADN.
60 Dichos anticuerpos recombinantes comprenden anticuerpos diseñados por ingeniería para que incluyan redistribuciones y mutaciones que ocurren, por ejemplo, durante la maduración de anticuerpos.

65 Como se usa en el presente documento, el término "especificidad" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión que es determinante del ligando cognado de interés en una población heterogénea de moléculas. De esta manera, en condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo), un anticuerpo se une específicamente a su diana particular y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una

muestra. La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad o avidez de unión alta, media o baja, como se seleccione. La unión selectiva se logra habitualmente si la constante de unión o la dinámica de unión es al menos 10 veces diferente (entendida como al menos 1 logaritmo de diferencia), preferentemente la diferencia es al menos 100 veces (entendida como al menos 2 logaritmos de diferencia) y más preferido al menos 1000 veces (entendida como al menos 3 logaritmos de diferencia). El término “especificidad” o “unión específica” se entiende también que se aplica a aglutinantes que se unen a una o más moléculas, por ejemplo aglutinantes específicos cruzados.

El anticuerpo descrito en el presente documento, específicamente, es selectivo uniendo solamente el antígeno O25b, o uniendo preferentemente el antígeno O25b con respecto al antígeno O25a, o uniendo el O25b con afinidad más alta en comparación con suero policlonal elevado contra cepas O25a, cuyo suero se une al antígeno O25b con una afinidad baja. De esta manera, el anticuerpo descrito en el presente documento puede entenderse que se une diferencialmente a esos antígenos, por ejemplo al menos con igual afinidad, o más de igual afinidad, tales como con una afinidad diferente con una diferencia de Kd de al menos 1 log, preferentemente al menos 2 log, más preferentemente al menos 3 log. Dicho anticuerpo que se une selectivamente al antígeno O25b con respecto al antígeno O25a se usa preferentemente para fines diagnósticos o terapéuticos. Para algunos fines diagnósticos un anticuerpo se usa específicamente que se une solamente al antígeno O25b de manera detectable.

El uso de la frase “que tiene la misma especificidad”, “que tiene el mismo sitio de unión” o “que se une al mismo epítipo” indica que los anticuerpos monoclonales equivalentes exhiben las mismas o esencialmente las mismas, es decir, características de inmunorreacción (unión) similares y compiten por la unión a una secuencia de unión de diana pre-seleccionada. La especificidad relativa de una molécula de anticuerpo para una diana particular puede determinarse relativamente por ensayos de competición, por ejemplo como se describe en Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988).

El término “sujeto” como se usa en el presente documento debe referirse a un mamífero de sangre caliente, en particular, un ser humano. En particular el uso médico descrito en el presente documento o el método respectivo de tratamiento se aplica a un sujeto en necesidad de profilaxis o tratamiento de una afección de enfermedad asociada a una infección de *E. coli* MDR o que padece una enfermedad, incluyendo enfermedad de fase temprana o enfermedad de fase tardía. El término “paciente” incluye sujetos humanos y mamíferos distintos que reciben tratamiento profiláctico o bien terapéutico. El término “tratamiento” se entiende de esta manera que incluye tanto tratamiento profiláctico como terapéutico.

Un sujeto se trata por ejemplo para la profilaxis o la terapia de afecciones de enfermedad de *E. coli* MDR. En particular el sujeto se trata, que está bien en riesgo de infección o desarrollando dicha enfermedad o recurrencia de la enfermedad, o un sujeto que padece dicha infección y/o enfermedad asociada a dicha infección.

Específicamente el término “profilaxis” se refiere a medidas preventivas que se destinan a abarcar la prevención de la aparición de la patogénesis o medidas profilácticas para reducir el riesgo de patogénesis.

Específicamente, el método para tratar, prevenir o retrasar una afección de enfermedad en un sujeto como se describe en el presente documento es interfiriendo con la patogénesis de *E. coli* MDR como agente causal de la afección.

La frase “sustancialmente puro” o “purificado” como se usa en el presente documento debe referirse a una preparación que comprende al menos el 50 % (p/p), preferentemente al menos el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 % de un compuesto, tal como una molécula de ácido nucleico o un anticuerpo. La pureza se mide por procedimientos apropiados para el compuesto (por ejemplo métodos cromatográficos, electroforesis en gel de acrilamida, análisis de HPLC y similares).

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz”, usada intercambiamente con cualquiera de las frases “cantidad eficaz” o “cantidad suficiente” de un compuesto, por ejemplo un anticuerpo o inmunógeno descrito en el presente documento, es una cantidad o actividad suficiente, cuando se administra al sujeto para efectuar resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos y, como tal, una cantidad eficaz o un sinónimo de la misma depende del contexto en el que se esté aplicando.

Una cantidad eficaz se entiende que significa una cantidad de compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir dichas enfermedades o trastornos. En el contexto de la enfermedad, las cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo como se describe en el presente documento se usan específicamente para tratar, modular, atenuar, revertir o afectar una enfermedad o afección que se beneficia de una inhibición de la patogénesis de *E. coli* MDR, por ejemplo, la adhesión y la colonización de las superficies mucosas, la replicación sin control dentro de los sitios del cuerpo estériles y la toxicidad de las células hospedadoras por productos bacterianos.

La cantidad del compuesto que corresponderá a dicha cantidad eficaz variará dependiendo de diversos factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto o el hospedador a tratarse y similares, pero puede sin embargo

determinarse de forma rutinaria por un experto en la materia.

El anticuerpo o el inmunógeno descritos en el presente documento pueden usarse profilácticamente para inhibir la aparición de la infección de *E. coli* MDR o terapéuticamente para tratar la infección de *E. coli* MDR, particularmente infecciones de *E. coli* MDR que se sabe que son refractarias o en el caso del sujeto específico, han demostrado ser refractarias al tratamiento con otra terapia convencional de antibióticos.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo como se describe en el presente documento, tal como se proporciona a un paciente humano en necesidad del mismo, puede estar específicamente en el intervalo de 0,5-500 mg, preferentemente 1-400 mg, incluso más preferido hasta 300 mg, hasta 200 mg, hasta 100 mg o hasta 10 mg, aunque pueden indicarse dosis mayores por ejemplo para tratar afecciones de enfermedades agudas.

Además, un tratamiento o régimen de prevención de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo descrito en el presente documento puede consistir en una administración única, o comprender alternativamente una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse al menos una vez al año, al menos una vez al medio año o al menos una vez al mes. Sin embargo, en otro aspecto, el anticuerpo puede administrarse al sujeto desde aproximadamente una vez a la semana hasta aproximadamente una administración diaria para un tratamiento dado. La longitud del periodo de tratamiento depende de una diversidad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, bien enfermedad aguda o crónica, la edad del paciente, la concentración y la actividad del formato del anticuerpo. Se apreciará también que la dosificación eficaz usada para el tratamiento o la profilaxis puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un régimen particular de tratamiento o profilaxis. Los cambios en la dosificación pueden resultar y ser aparentes por ensayos diagnósticos convencionales conocidos en la técnica. En algunos casos, puede requerirse la administración crónica.

Una cantidad eficaz de un inmunógeno como se describe en el presente documento, tal como se proporciona a un paciente en riesgo de desarrollar una afección de enfermedad asociada a una infección de *E. coli* MDR, puede estar específicamente en el intervalo de 1-15 mg/kg por dosis.

Por ejemplo el inmunógeno puede administrarse como una primera dosis seguida de una o más dosis potenciadoras, con un cierto marco de tiempo, de acuerdo con un esquema de inmunización de impulso principal para inducir una respuesta inmune de larga duración efectiva a una infección de *E. coli* MDR. Un horario de vacunación preferido abarcaría la administración de tres dosis, por ejemplo una primera dosis el día 0, una segunda dosis el día 5-40 y una tercera dosis el día 10-100, preferentemente los días 0, 28 y 90. De acuerdo con un horario acelerado preferido la administración puede ser los días 0, 7 y 14. Los horarios acelerados pueden indicarse para la profilaxis, por ejemplo para pacientes que tienen cirugía electiva. Habitualmente se usa alumbre como un adyuvante, por ejemplo como fosfato o hidróxido.

Por lo tanto, la presente materia objeto se basa en el descubrimiento de mAb murinos altamente específicos a O25b. Estos anticuerpos tienen gran potencial como reactivos diagnósticos para la identificación de cepas de MDR que pertenecen al linaje ST131. Adicionalmente, en particular después de la humanización, estos mAb son adecuados para su uso para la profilaxis (por ejemplo para grupos de alto riesgo) y el tratamiento de infecciones de *E. coli* causadas por cepas ST131-O25b:H4.

Se pensó que los antígenos de carbohidratos O25b y O25 (O25a) eran idénticos o muy similares basándose en el hecho de que se usa rutinariamente el suero inmune contra O25 en la identificación diagnóstica de cepas de *E. coli* que expresan antígenos O25b. El fondo genético de la síntesis del O-antígeno en las cepas ST131 no se ha elucidado completamente, sin embargo, un gen específico dentro del clúster *rfb* (que codifica la síntesis del O-antígeno) forma la base de la identificación basada en PCR de las cepas O25b. Adicionalmente, no hay datos estructurales que apoyen ninguna diferencia entre los antígenos O25(a) y O25b hasta ahora.

Fue, de esta manera, sorprendente que un anticuerpo descrito en el presente documento pudiera unir específicamente el antígeno O25b y diferenciar específicamente entre los antígenos O25b y O25a.

Para confirmar la diferencia genética entre las cepas de *E. coli* que expresan el antígeno O25b y O25a, el clúster *rfb* que codifica la síntesis del O-antígeno se secuenció a partir de una cepa disponible en el mercado 81009 (Szijarto et al, FEMS Microbiol Lett, 2012, 332:131-6) usando un método de camino de cebador empezando con oligonucleótidos específicos para los genes conservados que flanquean: *gnd* y *galF*. El contig resultante del operón *rfb* es 11.300 pb de longitud y solo parcialmente homólogo a aquel que codifica las enzimas de síntesis del antígeno O25 (número de acceso de NCBI GU014554). Se descubrió que un segmento de 2043 pb de longitud en el extremo 3' del operón *rfb* O25b no es homólogo a la región correspondiente del operón *rfb* O25, donde este segmento se reemplaza por una secuencia de 6267 pb de longitud que codifica la síntesis y el transporte de fucosa.

La estructura de la unidad de repetición (RU) biológica PS O-específica presente en el LPS aislado de *E. coli* ST131 se analizó en detalle en una fracción purificada construida mediante la sustitución del OS central con una unidad de repetición (RU). La RU del LPS ST131 es un pentasacárido O-acetilado con la estructura representada en la Figura 3.

De hecho, la estructura RU de ST131 O-PS difiere del LPS 025 RU informado por Kenne et al. (Kenne, Lindberg et al., Carbohydr Res. 1983 Oct 28; 122(2):249-56) y para mejor del conocimiento es un nuevo serotipo O entre los lipopolisacáridos de *E. coli* (Stenutz et al. FEMS Microbiol Rev. Mayo 2006; 30(3):382-403. Review). Adicionalmente, los resultados preliminares de espectrometría de masas MALDI-TOF y los análisis de composición (análisis de azúcar y metilación) de un oligosacárido central aislado de LPS ST131 apoyó el tipo K-12, que se informó previamente por Szijártó V. et al. en base a análisis genéticos (Szijarto et al, FEMS Microbiol Lett, 2012, 332:131-6). Se mostró que el LPS ST131 consiste en dos glucoformas de oligosacáridos (S) centrales principales. El tipo de glucoforma es dependiente de la presencia o ausencia del polisacárido (PS) O-específico. La glucoforma prevalectante del OS central no sustituido es la versión truncada del oligosacárido central K-12, que está desprovisto del disacárido $\rightarrow 7$ - α -Hepp-(1 \rightarrow 6)- α -Glc_p. La presencia de ese disacárido es la diferencia entre el OS central sustituido O-PP y el OS central no sustituido.

De acuerdo con un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une selectivamente al epítipo específico O25b, por ejemplo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 8D5-1G10 o cualquiera de los anticuerpos designados 6D1-1B2 u 8A1-1G8, o el anticuerpo 8D10-C8, cuyo término incluye variantes que se unen esencialmente al mismo epítipo; o que comprende el mismo sitio de unión que el anticuerpo 8D5-1G10 o cualquiera de los anticuerpos designados 6D1-1B2 u 8A1-1G8, o el anticuerpo 8D10-C8, cuyo término incluye variantes que comprenden esencialmente el mismo sitio de unión. Los anticuerpos designados 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 comprenderían particularmente un sitio de unión que diferencia específicamente entre el antígeno O25b y el antígeno O25a y que se une solamente al antígeno O25b. El anticuerpo designado 8D10-C8 comprendería particularmente un sitio de unión que une específicamente cruzado los antígenos O25b y O25a y une preferentemente el antígeno O25b en comparación con el antígeno O25a.

Se dice que los anticuerpos “se unen al mismo epítipo” o “comprenden el mismo sitio de unión” o tienen “esencialmente las mismas características de unión” si los anticuerpos compiten cruzados de manera que solamente un anticuerpo pueda unirse al epítipo en un punto de tiempo dado, es decir, un anticuerpo previene la unión o modula el efecto del otro.

El término “compite” o “compite cruzado” como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de tal manera que el resultado de unir el primer anticuerpo con su epítipo cognado disminuye detectablemente en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también disminuye detectablemente en presencia del primer anticuerpo, puede, pero no necesariamente, ser el caso. Esto es, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe detectablemente la unión del otro anticuerpo a su epítipo cognado, ya sea en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos “compiten cruzados” entre sí para unir sus respectivos epítipo o epítipos. Tanto los anticuerpos que compiten como los que compiten cruzado están descritos en el presente documento.

La competición significa en el presente documento una inhibición relativa mayor que aproximadamente el 30 % como se determina por análisis ELISA de competición, por ejemplo como se describe en la sección de Ejemplos. Puede ser deseable establecer un umbral más alto de inhibición relativa como criterio de qué es un nivel adecuado de competición en un contexto particular, por ejemplo, donde el análisis de competición se usa para seleccionar o explorar nuevos anticuerpos diseñados con la función pretendida de la unión de O25b. De esta manera, por ejemplo, es posible ajustar criterios para la unión competitiva, donde se detecte al menos el 40 % de inhibición relativa, o al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o incluso al menos el 100 %, antes de que un anticuerpo se considere suficientemente competitivo.

Específicamente, se proporciona un anticuerpo que comprende la región variable de cualquiera de los anticuerpos designados 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 u 8D10-C8, en particular al menos una de las secuencias CDR, preferentemente al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos seis de las secuencias CDR de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 y 8D10-C8 o variantes CDR de los mismos que son funcionalmente activas. Más específicamente, se proporciona cualquiera de los anticuerpos designados 6D1-1 B2, 8A1-1 G8, 8D5-1 G10 u 8D10-C8.

Específicamente, el anticuerpo designado anticuerpo 8D5-1G10 o anticuerpo 8D10-C8 o cualquier variante funcionalmente activa de los mismos puede producirse empleando el material depositado o la secuencia de nucleótido respectiva contenida en el mismo, tal como uno de los plásmidos y/o una de las células hospedadoras depositadas.

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo 8D5-1G10 o una variante funcionalmente equivalente del mismo puede derivar de un anticuerpo que comprende una región variable codificada por cualquiera de los plásmidos incorporados en las células hospedadoras depositadas bajo DSM 26763 y DSM 26762; por ejemplo, empleando una secuencia CDR parcial o mutada (puntual) del material depositado para diseñar por ingeniería el

anticuerpo específico o cualquier variante funcionalmente activa del mismo.

De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo 8D5-1G10 o una variante funcionalmente equivalente del mismo puede derivar de o emplear la región variable de un anticuerpo producido por una célula hospedadora depositada bajo DSM 26763 y/o DSM 26762; por ejemplo, empleando una secuencia parcial, por ejemplo una o más de las secuencias CDR, del material depositado para diseñar por ingeniería el anticuerpo específico o cualquier variante funcionalmente activa del mismo.

Específicamente, la variante de anticuerpo 6D1-1B2 u 8A1-1G8 es una variante CDR del anticuerpo 8D5-1G10 que es funcionalmente activa, por ejemplo, con alteraciones parciales en al menos una de las secuencias CDR.

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo 8D10-C8 o una variante funcionalmente equivalente del mismo puede derivar de un anticuerpo que comprende una región variable codificada por cualquiera de los plásmidos incorporados en las células hospedadoras depositadas bajo DSM 28171 y/o DSM 28172; por ejemplo empleando una secuencia CDR parcial o mutada (puntual) del material depositado para diseñar por ingeniería el anticuerpo específico o cualquier variante funcionalmente activa del mismo.

De acuerdo con un aspecto específico adicional, el anticuerpo 8D10-C8 o una variante funcionalmente equivalente del mismo puede derivar de o emplear la región variable de un anticuerpo producido por una célula hospedadora depositada bajo DSM 28171 y/o DSM 28172; por ejemplo, empleando una secuencia parcial, por ejemplo una o más de las secuencias CDR, del material depositado para diseñar por ingeniería el anticuerpo específico o cualquier variante funcionalmente activa del mismo.

Ciertos aspectos descritos en el presente documento se refieren a dichos anticuerpos variantes, preferentemente anticuerpos monoclonales, lo más preferentemente anticuerpos murinos, humanizados o humanos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde cualquiera de la región variable de cadena pesada o VH o las CDR respectivas comprende una secuencia de aminoácidos como deriva del plásmido depositado respectivo y/o de la célula hospedadora depositada respectiva.

Ciertos aspectos descritos en el presente documento se refieren a dichos anticuerpos variantes, preferentemente anticuerpos monoclonales, lo más preferentemente anticuerpos murinos, humanizados o humanos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde cualquiera de la región variable de cadena ligera o VL o las CDR respectivas comprende una secuencia de aminoácidos como deriva del plásmido depositado respectivo y/o de la célula hospedadora depositada respectiva.

Ciertos aspectos descritos en el presente documento se refieren a dichos anticuerpos variantes, preferentemente anticuerpos monoclonales, lo más preferentemente anticuerpos murinos, humanizados o humanos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde cualquiera de las regiones variables VH/VL o las CDR respectivas comprende una secuencia de aminoácidos como deriva de los plásmidos depositados respectivos y/o de las células hospedadoras depositadas respectivas.

Ciertos aspectos descritos en el presente documento se refieren a dichos anticuerpos variantes, que comprenden las secuencias de unión respectivas, tales como las secuencias variables y/o las secuencias CDR, como derivan del material depositado, donde las secuencias de unión, por ejemplo cualquier secuencia CDR, comprende una secuencia que tiene al menos un 60 %, al menos un 70 % o al menos un 80 % o al menos un 90 % o al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad a la secuencia de aminoácidos como deriva del material depositado y donde la variante es una variante funcionalmente activa.

Como se describe en el presente documento, las moléculas de anticuerpo caracterizadas, por ejemplo, por la capacidad de competir con el anticuerpo monoclonal 8D5-1G10 u 8D10-C8 para unirse al antígeno O25b. Cualquiera de los anticuerpos 6D1-1B2, 8A1-1G8, 8D5-1G10 es un anticuerpo IgG3 murino y el anticuerpo 8D10-C8 es un anticuerpo IgG2b murino que lleva cadenas ligeras kappa, que se aislaron y caracterizaron. Los dominios variables del anticuerpo 8D5-1G10 o del anticuerpo 8D10-C8 se expresan por el material depositado como se hace referencia en el presente documento. De esta manera, las características de unión como se determina por la cadena ligera y la cadena pesada y los dominios VL/VH del anticuerpo 8D5-1G10 o del anticuerpo 8D10-C8 se desvelan completamente en el presente documento, permitiendo su uso como un anticuerpo parental o la comparación con variantes funcionalmente activas o anticuerpos que compiten descritos en el presente documento.

El dominio variable maduro de la cadena pesada de 8D5-1G10 (8D5-1G10-HC) se produce por ejemplo empleando la célula hospedadora de DSM 26762, o la información de secuencia respectiva del plásmido codificante incorporado en la misma.

El dominio variable maduro de la cadena ligera de 8D5-1G10 (8D5-1G10-LC) se produce por ejemplo empleando la célula hospedadora de DSM 26763, o la información de secuencia respectiva del plásmido codificante incorporado en la misma.

El dominio variable maduro de la cadena pesada de 8D10-C8 (8D10-C8-HC) se produce por ejemplo empleando la célula hospedadora de DSM 28172, o la información de secuencia respectiva del plásmido codificante incorporado en la misma.

5 El dominio variable maduro de la cadena ligera de 8D10-C8 (8D10-C8-LC) se produce por ejemplo empleando la célula hospedadora de DSM 28171, o la información de secuencia respectiva del plásmido codificante incorporado en la misma.

10 La afinidad de unión diferencial para unir preferentemente el antígeno O25b con respecto a otros antígenos de *E. coli*, por ejemplo cualquier antígeno de carbohidrato distinto del antígeno O25 o antígenos centrales, es preferentemente al menos 10 veces más alta, es decir, con una diferencia de Kd de al menos 10, preferentemente al menos 100 veces más alta, más preferentemente al menos 1000 veces más alta.

15 La afinidad de unión diferencial para unir preferentemente el antígeno O25b es específicamente al menos 5 veces, o al menos 6 veces, o al menos 7 veces, o al menos 8 veces, o al menos 9 veces, o al menos 10 veces más alta, en comparación con el suero tipificado comercial, tal como el antisuero de alto título de O25 de *E. coli* de Statens Serum Institut (N.º 81369).

20 La afinidad de unión diferencial para unir preferentemente el antígeno O25b con respecto al antígeno O25a es específicamente al menos igual o más que igual, por ejemplo al menos 1,5 veces, o al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 4 veces, o al menos 5 veces, o al menos 6 veces, o al menos 7 veces, o al menos 8 veces, o al menos 9 veces, o al menos 10 veces más alta.

25 Los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento se unen a cualquiera de dichos antígenos individuales, en particular el antígeno O25b, con una alta afinidad, en particular con una tasa de "on" alta y/o de "off" baja, o alta avidez de unión. La afinidad de unión de un anticuerpo se caracteriza habitualmente en términos de la concentración del anticuerpo, en que la mitad de los sitios de unión a antígeno están ocupados, conocida como la constante de disociación (Kd o K_D). Habitualmente un aglutinante se considera un aglutinante de alta afinidad con una Kd < 10⁻⁷ M, en algunos casos, por ejemplo para fines terapéuticos con afinidades más altas, por ejemplo con una Kd < 10⁻⁸ M, preferentemente, una Kd < 10⁻⁹ M, incluso más preferida es una Kd < 10⁻¹⁰ M.

Aún, en un aspecto particularmente preferido las afinidades de unión a antígeno individuales son de afinidad media, por ejemplo, con una Kd de menos de 10⁻⁶ y hasta 10⁻⁷ M, por ejemplo cuando se une a al menos dos antígenos.

35 Pueden proporcionarse aglutinantes de afinidad media como se describe en el presente documento, preferentemente junto con un proceso de maduración de afinidad, si es necesario.

40 La maduración de afinidad es el proceso por el que se producen los anticuerpos con afinidad aumentada por un antígeno diana. Con cambios estructurales de un anticuerpo, incluyendo mutagénesis de aminoácidos o como consecuencia de mutación somática en segmentos génicos de inmunoglobulinas, las variantes de un sitio de unión a un antígeno se producen y se seleccionan para afinidades mayores. Los anticuerpos madurados de afinidad pueden exhibir una afinidad de varios logaritmos mayor que un anticuerpo parental. Los anticuerpos parentales únicos pueden someterse a maduración de afinidad. Alternativamente los conjuntos de anticuerpos con afinidad de unión similar al antígeno diana pueden considerarse estructuras parentales que varían para obtener anticuerpos sencillos de afinidad madurada o conjuntos de afinidad madurada de dichos anticuerpos.

50 La variante de afinidad madurada preferida de un anticuerpo descrito en el presente documento exhibe al menos un aumento de 10 veces en la afinidad de unión, preferentemente al menos un aumento de 100 veces. La maduración de afinidad puede emplearse en el transcurso de las campañas de selección que emplean bibliotecas respectivas de moléculas parentales, bien con anticuerpos que tienen afinidad de unión media para obtener el anticuerpo descrito en el presente documento que tiene la propiedad de unión a la diana específica de una afinidad de unión de Kd < 10⁻⁷ M. Alternativamente, la afinidad puede aumentarse incluso más por maduración de afinidad del anticuerpo descrito en el presente documento para obtener los altos valores que corresponden a una Kd de menos de 10⁻⁸ M o menos de 10⁻⁹ M, preferentemente menos de 10⁻¹⁰ M o incluso menos de 10⁻¹¹ M, lo más preferido en el intervalo picomolar.

55 Un aspecto específico se refiere a un anticuerpo descrito en el presente documento caracterizado por una actividad funcional antibacteriana específica, tal como muerte bacteriana mediada por el complemento y toma y muerte opsonofagocítica.

60 Las células efectoras fagocíticas pueden activarse a través de otra vía que emplea la activación del complemento. Los anticuerpos que se unen a los antígenos de superficie en los microorganismos atraen al primer componente de la cascada del complemento con su región Fc e inician la activación del sistema del complemento "clásico". Esto resulta en la estimulación de células efectoras fagocíticas, que en última instancia matan las bacterias diana por mecanismos dependientes del complemento y de anticuerpos (CDC)

65 De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo descrito en el presente documento tiene una actividad

citotóxica en presencia de células efectoras inmunes como se mide en un ensayo convencional de SBA u OPK. Una actividad citotóxica como se determina por uno de los ensayos SBA u OPK puede mostrarse para un anticuerpo descrito en el presente documento, si hay un aumento significativo en el porcentaje de la muerte bacteriana en comparación con un control. La actividad bactericida relacionada con SBA u OPK se mide preferentemente como el aumento de porcentaje absoluto, que es preferentemente mayor del 5 %, más preferentemente mayor del 10 %, incluso más preferido mayor del 20 %, el 30 %, el 40 % o el 50 %.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden identificarse u obtenerse empleando un método de hibridoma. En dicho método, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

El medio de cultivo donde las células de hibridoma crecen se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células del hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA).

Por ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden obtenerse de anticuerpos de origen (parentales), por ejemplo obtenidos inmunizando ratones con un mutante no encapsulado de una cepa ST131-O25b:H4 representativa 81009 (por ejemplo, 81009 Δ kps::kan) reemplazando el clúster *kps* (que codifica la síntesis capsular) con una casete que codifica resistencia a kanamicina. Las muestras de suero obtenidas de los ratones pueden analizarse después y el bazo del ratón que muestra el título de IgG más alto contra el antígeno O25b (en ELISA y Transferencia Western) puede usarse para la generación del hibridoma. Después de la subclonación, los clones de hibridoma pueden seleccionarse, que secretan anticuerpos específicos para los antígenos O25b así como se unen a la superficie de cepas de *E. coli* de tipo silvestre vivas que expresan antígenos O25b. Estos mAb pueden purificarse después a partir de sobrenadantes de hibridoma para ensayar además su unión específica del antígeno O25b y posiblemente para su afinidad de unión diferencial para unir preferentemente el antígeno O25b con respecto al antígeno O25a y el diseño por ingeniería de anticuerpos, por ejemplo para diferentes fines diagnósticos o terapéuticos.

Los anticuerpos de unión diferencial, denominados también en el presente documento anticuerpos selectivos, en algunos casos, emergen a través de detección contra antígenos únicos. Para aumentar la probabilidad de aislar clones de unión diferencial uno aplicaría múltiples presiones de selección detectando de forma progresiva contra los diferentes antígenos. Las estrategias de selección de mAb especiales emplean los componentes O25b y O25a u otros antígenos de *E. coli* de una manera alternativa.

El antígeno o antígenos recombinantes pueden usarse para seleccionar anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos, por ejemplo una biblioteca de anticuerpos de visualización de levaduras.

En cualquier caso, la unión selectiva puede mejorarse además por métodos de optimización de anticuerpos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas regiones de las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden someterse a una o más estrategias de optimización, incluyendo mezcla de cadenas ligeras, mutagénesis de destino, amalgamiento de CDR y mutagénesis dirigida de CDR y/o regiones marco seleccionadas.

Los métodos de detección para identificar anticuerpos con las propiedades de unión selectivas deseadas pueden realizarse por tecnologías de visualización (usando fagos, células bacterianas, de levaduras o de mamíferos). La reactividad puede evaluarse basándose en ELISA, transferencia Western o tinción de superficie con Citometría de flujo, por ejemplo usando ensayos convencionales.

Una vez que se han identificado los anticuerpos de unión diferencial con las propiedades deseadas, puede determinarse el epítipo o epítipos dominantes reconocidos por los anticuerpos. Los métodos para el mapeo de epítipos se conocen bien en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en Epitope Mapping: A Practical Approach, Westwood y Hay, eds., Oxford University Press, 2001.

El mapeo de epítipos se refiere a la identificación del epítipo al que se une un anticuerpo. Hay muchos métodos conocidos por aquellos expertos en la materia para determinar la localización de epítipos en las proteínas, incluyendo el análisis cristalográfico del complejo antígeno-anticuerpo, los ensayos de competición, los ensayos de expresión de fragmento génico y los ensayos a base de péptidos sintéticos. Un anticuerpo que se "une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se entiende en el presente documento de la siguiente manera. Cuando dos anticuerpos reconocen epítipos que son idénticos o epítipos estéricamente solapantes, los anticuerpos se denominan uniéndose al mismo o esencialmente el mismo o sustancialmente los mismos epítipos. Un método comúnmente usado para determinar si dos anticuerpos se unen a epítipos idénticos o estéricamente solapantes es el ensayo de competición, que puede configurarse en todos los números de diferentes formatos, usando bien

antígenos etiquetados o anticuerpos etiquetados. Habitualmente, un antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pocillos y se mide la capacidad de los anticuerpos sin etiquetar para bloquear la unión de los anticuerpos etiquetados usando etiquetas radiactivas o enzimáticas.

5 Una vez que se identifican los anticuerpos con las propiedades de unión diferencial deseadas, dichos anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpo pueden producirse por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, técnicas de hibridoma o tecnología de ADN recombinante.

10 Los anticuerpos monoclonales recombinantes pueden producirse, por ejemplo, aislando el ADN que codifica las cadenas de anticuerpo requeridas y transfectando una célula hospedadora recombinante con las secuencias codificantes para la expresión, usando vectores de expresión recombinantes bien conocidos, por ejemplo los plásmidos descritos en el presente documento o la casete o casetes de expresión que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de anticuerpos. Las células hospedadoras recombinantes pueden ser

15 De acuerdo con un aspecto específico, la secuencia de nucleótidos puede usarse para la manipulación genética para humanizar el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede diseñarse por ingeniería para parecerse más cercanamente a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune, si el anticuerpo se usa en pruebas clínicas y tratamientos en humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpos para obtener una afinidad mayor para el O25b diana y una mayor eficiencia contra *E. coli* MDR. Será evidente para un experto en la materia que puede realizarse uno o más cambios de polinucleótidos al anticuerpo y mantener todavía su capacidad de unión a la diana O25b.

25 La producción de moléculas de anticuerpo, por diversos medios, se entiende bien generalmente. La Patente de EE.UU. 6331415 (Cabilly et al.), por ejemplo, describe un método para la producción recombinante de anticuerpos donde las cadenas pesadas y ligeras se expresan simultáneamente a partir de un único vector o de dos vectores separados en una única célula. Wibbenmeyer et al. (1999, *Biochim Biophys Acta* 1430(2):191 -202) y Lee y Kwak (2003, *J. Biotechnology* 101 : 189-198) describen la producción de anticuerpos monoclonales a partir de cadenas pesadas y ligeras producidas separadamente, usando plásmidos expresados en cultivos separados de *E. coli*.
30 Diversas técnicas distintas relevantes a la producción de anticuerpos se proporcionan, por ejemplo, en Harlow, et al., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

35 Si se desea, el anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo 8D5-1G10 o el anticuerpo 8D10-C8 o el sitio de unión o CDR respectivos pueden secuenciarse y la secuencia de polinucleótidos o una secuencia variante o mutante de la misma pueden clonarse después en un vector para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo puede mantenerse en un vector en una célula hospedadora y la célula hospedadora puede expandirse después y congelarse para un uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular puede llevarse a cabo a través de la clonación de genes de anticuerpo a partir de linfocitos B por medios conocidos en la técnica.

40 Otro aspecto se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica la producción del anticuerpo recombinante descrito en el presente documento.

45 Otro aspecto se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica la producción del epítipo recombinante descrito en el presente documento, o una molécula que comprende dicho epítipo descrito en el presente documento. Sin embargo, el epítipo descrito en el presente documento también puede producirse sintéticamente, por ejemplo a través de cualquiera de los métodos de síntesis bien conocidos en la técnica.

50 Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o epítipo puede tener cualquier característica adecuada y comprender cualquier rasgo o combinaciones adecuadas del mismo. De esta manera, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o epítipo puede estar en forma de ADN, ARN o un híbrido del mismo y puede incluir bases de origen no natural, un esqueleto modificado, por ejemplo un esqueleto de fosforotioato que promueve la estabilidad del ácido nucleico o ambos. El ácido nucleico puede incorporarse ventajosamente en una casete de expresión, un vector o un plásmido descrito en el presente documento, que comprenden rasgos que promueven la expresión, la
55 replicación y/o la selección deseadas en una célula o células hospedadoras diana. Los ejemplos de dichos rasgos incluyen un componente de origen de replicación, un componente de gen de selección, un componente promotor, un componente de elemento potenciador, un componente de secuencia de poliadenilación, un componente de terminación y similares, numerosos ejemplos adecuados de los cuales se conocen.

60 La presente divulgación proporciona además las construcciones de ADN recombinante que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Estas construcciones recombinantes se usan junto con un vector, tal como un plásmido, un fagémido, un fago o un vector vírico, dentro del que se inserta una molécula de ADN que codifica cualquier anticuerpo desvelado.

65 Los anticuerpos monoclonales se producen usando cualquier método que produzca moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales

incluyen los métodos de hibridoma de Kohler et al. (1975, Nature 256:495-497) y el método del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications pp 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)).

5 La descripción se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o un inmunógeno como se describe en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse, como se describe en el presente documento, como una inyección de bolo o infusión o por infusión continua. Los vehículos farmacéuticos adecuados para facilitar dichos medios de administración se conocen bien en la técnica.

10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen generalmente cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción adecuados y similares que son fisiológicamente compatibles con un anticuerpo o la composición relacionada o la combinación descritos en el presente documento. Los ejemplos adicionales de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de cualquiera de los mismos.

15 En uno de dichos aspectos, un anticuerpo puede combinarse con uno o más vehículos apropiados para una ruta de administración deseada, los anticuerpos pueden, por ejemplo, mezclarse con cualquiera de lactosa, sacarosa, almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ácido esteárico, talco, estearato magnésico, óxido magnésico, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato sódico, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y opcionalmente comprimirse o encapsularse además para la administración convencional. Alternativamente, un anticuerpo puede disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de sésamo, goma tragacanto y/o diversos tampones. Otros vehículos, adyuvantes y modos de administración se conocen bien en la técnica farmacéutica. Un vehículo puede incluir un material de liberación controlada o un material de retardo de tiempo, tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o junto con una cera u otros materiales bien conocidos en la técnica.

20 Los vehículos adicionales farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Las formulaciones líquidas pueden ser soluciones, emulsiones o suspensiones y pueden incluir excipientes tales como agentes de suspensión, solubilizantes, tensioactivos, conservantes y agentes quelantes.

25 Se contemplan las composiciones farmacéuticas donde se formulan un anticuerpo o un inmunógeno descrito en el presente documento, y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones estables del anticuerpo o el inmunógeno descrito en el presente documento se preparan para su almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones para su uso para administración *in vivo* son específicamente estériles, preferentemente en forma de una solución acuosa estéril. Esto se cumple fácilmente filtrando a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. El anticuerpo y otros agentes terapéuticamente activos desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas y/o atrparse en microcápsulas.

30 La administración de la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un inmunógeno descrito en el presente documento puede realizarse de una diversidad de formas, incluyendo oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraótica, transdérmica, mucosa, típicamente, por ejemplo, geles, bálsamos, lociones, cremas, etc., intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonarmente, por ejemplo empleando tecnología inhalable o sistemas de transporte pulmonar, vaginal, parenteral, rectal o intraocularmente.

35 Las formulaciones ejemplares como se usan para la administración parenteral incluyen aquellas adecuadas para inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una solución estéril, una emulsión o una suspensión.

40 En un aspecto, el anticuerpo o el inmunógeno descrito en el presente documento es el único agente terapéuticamente activo administrado a un sujeto, por ejemplo, como una monoterapia de modificación o de prevención de la enfermedad.

45 Alternativamente, el anticuerpo o inmunógeno descrito en el presente documento se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos distintos, incluyendo pero no limitado al tratamiento convencional, por ejemplo antibióticos, inhibidores esteroideos y no esteroideos de la inflamación y/u distinta terapia basada en anticuerpos, por ejemplo, empleando agentes antibacterianos o antiinflamatorios.

50 Una terapia de combinación emplea particularmente un régimen convencional, por ejemplo como se usa para el tratamiento de la infección de *E. coli* MDR. Esto puede incluir antibióticos, por ejemplo tigeclina, linezolid, metilina y/o vancomicina.

En una terapia de combinación, el anticuerpo puede administrarse como una mezcla o concomitantemente con uno u otros regímenes terapéuticos, por ejemplo bien antes, simultáneamente o bien después de la terapia concomitante.

5 La administración profiláctica de inmunógenos en algunos casos puede emplear una vacuna que comprende el inmunógeno descrito en el presente documento, es decir, una vacuna monovalente. Aún, puede usarse una vacuna multivalente que comprende diferentes inmunógenos para inducir una respuesta inmune contra el mismo o diferentes patógenos diana.

10 Las propiedades biológicas del anticuerpo, el inmunógeno o las preparaciones farmacéuticas respectivas descritos en el presente documento pueden caracterizarse *ex vivo* en experimentos de células, tejidos y organismos enteros. Como se conoce en la técnica, los fármacos se ensayan normalmente *in vivo* en animales, incluyendo pero no limitado a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir una efectividad de un fármaco para un tratamiento contra una enfermedad o un modelo de enfermedad o para medir una farmacocinética, farmacodinámica, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden denominarse modelos de enfermedad. Los productos terapéuticos se ensayan normalmente en ratones, incluyendo pero no limitados a ratones desnudos, ratones SCID, ratones de xenoinjerto y ratones transgénicos (incluyendo de genes activados y de genes inactivados). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo para su uso como un producto terapéutico o un profiláctico con la vida media, función efectora, actividad neutralizante (cruzada) y/o respuesta inmune apropiadas tras la inmunoterapia activa o pasiva. Cualquier organismo, preferentemente mamíferos, puede usarse para las pruebas. Por ejemplo debido a su similitud genética a humanos, los primates, monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y de esta manera pueden usarse para ensayar la efectividad, toxicidad, farmacocinética, farmacodinámica, vida media u otra propiedad del agente o la composición objeto. Los ensayos en humanos se requieren en última instancia para aprobarlos como fármacos y de esta manera por supuesto estos experimentos se contemplan. De esta manera, el anticuerpo, el inmunógeno y las composiciones farmacéuticas respectivas descritos en el presente documento pueden ensayarse en humanos para determinar su efectividad terapéutica o profiláctica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

30 La descripción también se refiere al anticuerpo objeto descrito en el presente documento para fines diagnósticos, por ejemplo para su uso en métodos para detectar y determinar cuantitativamente la concentración de una carga bacteriana o el anticuerpo como inmunorreactivo o diana en una muestra de fluido biológico.

35 La descripción también se refiere a métodos para detectar el grado de sepsis o infección de *E. coli* MDR en una muestra biológica, por ejemplo la carga de una muestra con *E. coli* MDR, tal como un fluido corporal, que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con un anticuerpo descrito en el presente documento. El anticuerpo descrito en el presente documento puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos, ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA).

40 El ensayo diagnóstico preferido se realiza como sigue. Los anticuerpos específicos de antígeno diana se inmovilizan sobre perlas de látex que se incuban con bacterias presentes en o aisladas a partir de fluidos corporales. La reacción positiva puede detectarse a simple vista debido a la agregación de las perlas de látex coloreadas en presencia del antígeno cognado correspondiente expresado sobre la superficie de las bacterias.

45 Un fluido corporal como se usa, descrito en el presente documento, incluye muestras biológicas de un sujeto, tales como un extracto de tejido, orina, sangre, suero, muestras fecales y flemas.

50 En un aspecto, el método comprende poner en contacto un soporte sólido con un exceso de un cierto tipo de fragmento de anticuerpo que forma específicamente un complejo con la diana, en condiciones que permiten que el anticuerpo se una a la superficie del soporte sólido. El soporte sólido resultante al que se une el anticuerpo después se pone en contacto con una muestra de fluido biológico de manera que la diana en el fluido biológico se une al anticuerpo y forma un complejo diana-anticuerpo. El complejo puede etiquetarse con un marcador detectable. Alternativamente, bien la diana o bien el anticuerpo pueden etiquetarse antes de la formación del complejo. Por ejemplo, un marcador (etiqueta) detectable puede conjugarse al anticuerpo. El complejo puede detectarse después y determinarse cuantitativamente detectando de esta manera y determinando cuantitativamente la concentración de la diana en la muestra de fluido biológico.

60 Para aplicaciones particulares el anticuerpo descrito en el presente documento se conjuga a una etiqueta o una molécula indicadora, seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, dioxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos. Los anticuerpos conjugados a marcadores o moléculas indicadoras pueden usarse, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos diagnósticos, por ejemplo para diagnosticar la infección por *E. coli* MDR o afecciones de enfermedad asociadas a la misma.

65

El anticuerpo descrito en el presente documento puede conjugarse a otras moléculas que permitan la detección sencilla de dicho conjugado, por ejemplo, en ensayos de unión (por ejemplo ELISA) y estudios de unión.

Otro aspecto descrito en el presente documento se refiere a un kit que comprende un anticuerpo, que puede incluir, además de uno o más anticuerpos, diversos agentes diagnósticos o terapéuticos. Un kit puede incluir también instrucciones para su uso en un método diagnóstico o terapéutico. Dichas instrucciones pueden, por ejemplo, proporcionarse en un dispositivo incluido en el kit, por ejemplo, herramientas o un dispositivo para preparar una muestra biológica para fines diagnósticos, tales como separar una fracción que contiene células y/o proteínas antes de determinar la carga de *E. coli* MDR para diagnosticar una enfermedad. Ventajosamente, dicho kit incluye un anticuerpo y un agente diagnóstico o reactivo que pueden usarse en uno o más de los diversos métodos diagnósticos descritos en el presente documento. En otro aspecto preferido, el kit incluye un anticuerpo, por ejemplo en forma liofilizada, que incluye opcionalmente instrucciones y un medio para reconstituir el liofilizado y/o en combinación con vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden mezclarse antes de su uso para formar una composición inyectable para la administración a término cercano.

Los anticuerpos designados 8D5-1G10 y 8D10-C8, específicamente cualquiera de las cadenas ligeras y/o cadenas pesadas del anticuerpo, se caracteriza además por el material biológico depositado en DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b / Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE).

Los depósitos se refieren a cultivos de *E. coli* transformados, conteniendo cada uno un plásmido clonado con un inserto de un gen de interés. Los genes de interés son los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal de ratón 8D5-1G10 (IgG3) y las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal de ratón 8D10-C8 (IgG2b).

DSM 26763 es una célula hospedadora *E. coli* transformada con un plásmido que comprende la secuencia codificante del dominio variable de la cadena ligera de 8D5-1G10 (8D5-1G10-LC). *Escherichia coli* 8D5-1G10-VL = DSM 26763, fecha de deposición: 15 de enero, 2013; depositante: Arsanis Biosciences GmbH, Viena, Austria.

DSM 26762 es una célula hospedadora *E. coli* transformada con un plásmido que comprende la secuencia codificante del dominio variable de la cadena pesada de 8D5-1G10 (8D5-1G10-HC). *Escherichia coli* 8D5-1G10-VH = DSM 26762, fecha de deposición: 15 de enero, 2013; depositante: Arsanis Biosciences GmbH, Viena, Austria.

DSM 28171 es una célula hospedadora *E. coli* transformada con un plásmido que comprende la secuencia codificante del dominio variable de la cadena ligera de 8D10-C8 (8D10-C8-LC). *Escherichia coli* 8D10-C8-VL = DSM 28171, fecha de deposición: 11 de diciembre, 2013; depositante: Arsanis Biosciences GmbH, Viena, Austria.

DSM 28172 es una célula hospedadora *E. coli* transformada con un plásmido que comprende la secuencia codificante del dominio variable de la cadena pesada de 8D10-C8 (8D10-C8-HC). *Escherichia coli* 8D10-C8-VH = DSM 28172, fecha de deposición: 11 de diciembre, 2013; depositante: Arsanis Biosciences GmbH, Viena, Austria.

La materia objeto de las siguientes definiciones se describe en el presente documento:

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente el antígeno O25b de cepas de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos (MDR).
2. Anticuerpo de acuerdo con la definición 1, que es específico cruzado para unir los antígenos O25b y O25 y/o se une preferentemente al antígeno O25b con respecto a un antígeno O25a de *E. coli*, preferentemente con una afinidad más alta en comparación con la unión al antígeno O25b por un suero policlonal generado contra cepas de *E. coli* O25 (ahora conocidas y denominadas en el presente documento O25a) según se determina por inmunoensayo, en comparación con el suero tipificado policlonal generado contra cepas O25a, preferentemente donde el anticuerpo tiene al menos una afinidad igual por ambos, los antígenos O25b y O25a, según se determina por inmunoensayo, preferentemente inmunotransferencia, ELISA u otros métodos inmunológicos.
3. Anticuerpo de acuerdo con la definición 1 o 2, donde el antígeno O25b es prevalente en una o más cepas ST131-O25b:H4.
4. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 3, donde el epítipo reconocido por el anticuerpo está presente en la superficie de las cepas ST131-O25b:H4 encapsuladas y no encapsuladas.
5. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 4, que tiene un sitio de unión de un anticuerpo monoclonal de longitud completa o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos un dominio de anticuerpo que incorpora un sitio de unión, cuyo anticuerpo es preferentemente un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos murinos, de llama, conejo, cabra, vaca, quiméricos, humanizados o humanos, anticuerpos de cadena pesada, Fab, Fd, scFv y anticuerpos de único dominio como VH, VHH o VL, preferentemente un anticuerpo IgG1 humano.
6. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 5, que tiene una afinidad para unirse al antígeno O25b con una Kd de menos de 10^{-7} M, preferentemente de menos de 10^{-8} M.
7. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 6, que exhibe potencia bactericida *in vitro* en una muestra de suero que comprende cepas de *E. coli* MDR de tipo silvestre y/o que estimula la captación de cepas de *E. coli* MDR de tipo silvestre por células fagocíticas *in vitro*.

8. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 7, donde el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo designado 8D5-1G10 u 8D10-C8.

9. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 8, donde el anticuerpo comprende el mismo sitio de unión que un anticuerpo designado 8D5-1 G10 u 8D10-C8.

5 10. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 9, donde el anticuerpo se deriva de un anticuerpo, que se caracteriza por una región variable, que es

- obtenible a partir de una célula hospedadora depositada bajo DSM 26763 y/o DSM 26762, o una variante funcionalmente activa de la misma; u

10 - obtenible a partir de una célula hospedadora depositada bajo DSM 28171 y/o DSM 28172, o una variante funcionalmente activa de la misma.

11. Anticuerpo de acuerdo con la definición 10, que comprende

15 A

(a) una región variable de la cadena ligera del anticuerpo producida por u obtenible de una célula hospedadora depositada bajo DSM 26763; y/o

20 (b) una región variable de la cadena pesada del anticuerpo producida por u obtenible de una célula hospedadora depositada bajo DSM 26762;

(c) o una variante funcionalmente activa de (a) y/o (b)

o B

25 (a) una región variable de la cadena ligera del anticuerpo producida por u obtenible de una célula hospedadora depositada bajo DSM 28171; y/o

(b) una región variable de la cadena pesada del anticuerpo producida por u obtenible de una célula hospedadora depositada bajo DSM 28172;

30 (c) o una variante funcionalmente activa de (a) y/o (b).

12. Anticuerpo de acuerdo con la definición 10 u 11, donde la variante funcionalmente activa comprende una CDR con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 60 % de identidad de secuencia.

35 13. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 10 a 12, donde la variante funcionalmente activa difiere del anticuerpo parental en al menos una mutación puntual en la secuencia de aminoácidos, preferentemente en la CDR, donde el número de mutaciones puntuales en cada una de las secuencias de aminoácidos de la CDR son 0, 1, 2 o 3.

14. Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos.

A

40 - que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo designada 8D5-1G10-LC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 26763; y/o

- que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo designada 8D5-1 G10-HC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 26762;

45 o B

- que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo designada 8D10-C8-LC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 28171; y/o

50 - que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo designada 8D10-C8-HC comprendida en una célula hospedadora depositada bajo DSM 28172.

15. Una casete de expresión que comprende una secuencia de codificación para expresar una cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, cuya casete de expresión o secuencia de codificación se deriva de un plásmido de acuerdo con la definición 14.

55 16. Método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, en donde una célula hospedadora se transforma con un plásmido de la definición 14 o la casete de expresión de acuerdo con la definición 15.

60 17. Una célula hospedadora que comprende un plásmido de acuerdo con la definición 14 o la casete de expresión de acuerdo con la definición 15.

18. La célula hospedadora de acuerdo con la definición 17, que se deposita bajo

A

65 - DSM 26763 y/o DSM 26762;

o B

- DSM 28171 y/o DSM 28172.

- 5 19. Método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, en donde una célula hospedadora de acuerdo con la definición 17 o 18 se cultiva o se mantiene en condiciones para producir dicho anticuerpo.
20. Un método para identificar un anticuerpo candidato que comprende:
- 10 (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y
(b) evaluar la unión de un anticuerpo en o producido por la muestra con un epítipo reconocido por el anticuerpo designado como 8D5-1G10 u 8D10-C8, donde una reacción positiva entre el anticuerpo y el epítipo identifica al anticuerpo como anticuerpo candidato.
- 15 21. Un método para identificar un anticuerpo candidato que comprende:
- (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y
(b) evaluar la unión de un anticuerpo en o producido por la muestra con antígeno O25b de una cepa ST131-O25b:H4 y antígeno O25a de una cepa de *E. coli* no MDR, donde una reacción positiva específica entre el anticuerpo y el antígeno O25b con respecto al antígeno O25a identifica al anticuerpo como anticuerpo candidato.
- 20 22. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, que comprende
- 25 (a) proporcionar un anticuerpo candidato identificado de acuerdo con la definición 20 o 21; y
(b) producir un anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo candidato, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión al epítipo que el anticuerpo candidato.
- 30 23. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, que comprende
- (a) inmunizar a un animal no humano con un epítipo reconocido por el anticuerpo designado 8D5-1G10 u 8D10-C8;
(b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de linfocitos B aislados;
(c) seleccionar las líneas celulares obtenidas en b) para identificar una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal que se une al epítipo; y
(d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión al epítipo que el anticuerpo monoclonal.
- 35 24. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, que comprende
- 40 (a) inmunizar un animal no humano con antígeno O25b de una cepa ST131-O25b:H4 y aislar linfocitos B productores de anticuerpos;
(b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de linfocitos B aislados;
(c) seleccionar las líneas celulares para identificar una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal que se une preferentemente al antígeno O25b con respecto al antígeno O25a de *E. coli*; y
(d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión al epítipo que el anticuerpo monoclonal.
- 45 25. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, para su uso en el tratamiento de un sujeto con riesgo o que padece una infección por *E. coli* MDR, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo para limitar la infección en el sujeto o para mejorar una afección de enfermedad que es el resultado de dicha infección, preferentemente para el tratamiento o la profilaxis de la pielonefritis, bacteriemia secundaria, sepsis, peritonitis, meningitis y neumonía asociada a ventilador.
- 50 26. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la definición 25, para la muerte bactericida de *E. coli* MDR, preferentemente una cepa ST131-O25b:H4 independientemente del polisacárido capsular expresado por la cepa.
- 55 27. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la definición 25 o 26, donde el anticuerpo se administra en una formulación parenteral o mucosa.
- 60 28. Preparación farmacéutica de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, que comprende preferentemente una formulación parenteral o mucosa, que contiene opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
29. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, para su uso diagnóstico para determinar la infección por *E. coli* en un sujeto provocada por cepas MDR que expresan el LPS O25b, tal como en infecciones del tracto urinario superior e inferior, incluyendo cistitis o uretritis, pielonefritis ascendente o hematógena, especialmente en pacientes diabéticos, así como con bacteriemia, sepsis, peritonitis o colonización intestinal.
- 65 30. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la definición 29, donde una infección sistémica con *E. coli* MDR en un sujeto se determina *ex vivo* al poner en contacto una muestra de fluido corporal de dicho sujeto con el

anticuerpo, donde una reacción inmune específica del anticuerpo determina la infección.

31. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la definición 29 o 30, en donde se analiza una muestra de fluido corporal para determinar la reacción inmune específica, cuya muestra se selecciona del grupo que consiste en orina, sangre, aislados de sangre o cultivos sanguíneos, aspirado, esputo, fluido de lavado de sujetos intubados y materia fecal.

32. Anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las definiciones 29 a 31, donde el serotipo de *E. coli* se determina *in vitro* a partir de un cultivo de *E. coli* puro recuperado de un espécimen clínico.

33. Preparación diagnóstica de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13, que contiene opcionalmente el anticuerpo con una etiqueta y/o un reactivo de diagnóstico adicional con una etiqueta y/o una fase sólida para inmovilizar al menos uno del anticuerpo y el reactivo diagnóstico.

34. Epitopo aislado reconocido por el anticuerpo designado 8D5-1G10 u 8D10-C8.

35. Un inmunógeno que comprende:

(a) un epitopo de acuerdo con la definición 34;

(b) opcionalmente, epitopos adicionales no asociados de forma nativa con dicho epitopo de (a); y

(c) un vehículo.

36. Inmunógeno de acuerdo con la definición 35, en donde dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende preferentemente sustancias tamponantes y/o adyuvantes.

37. Inmunógeno de acuerdo con la definición 35 o 36, en una formulación de vacuna, preferentemente para uso parenteral.

38. Inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las definiciones 35 a 37, para su uso en el tratamiento de un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de dicho inmunógeno para proteger al sujeto de una infección por *E. coli* MDR, o para prevenir una afección de enfermedad que es el resultado de dicha infección.

39. Inmunógeno de acuerdo con la definición 38, para provocar una respuesta inmune protectora.

40. Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 13 o un epitopo de acuerdo con la definición 35.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Dichos ejemplos, son, sin embargo, meramente representativos de métodos para practicar una o más realizaciones de la presente invención y no deben leerse limitando el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: anticuerpos específicos O25b

Los presentes inventores generaron un mutante no encapsulado de una cepa ST131-O25b:H4 representativa 81009 (81009Δ*kps*::*kan*, [Szijarto et al, FEMS Microbiol Lett, 2012, 332:131-6]) reemplazando el clúster *kps* (que codifica la síntesis capsular) con una casete que codifica resistencia a kanamicina. Se usaron dosis subletales de células vivas o inactivadas en formaldehído de esta cepa mutante para inmunizar ratones 4 veces a intervalos de dos semanas. Posteriormente, las muestras de suero obtenidas de los ratones se analizaron y se usó el bazo del ratón que mostró el título de IgG más alto contra el antígeno O25b (en ELISA, inmunotransferencia y tinción de superficie) para la generación de hibridoma. Después de la subclonación, los clones de hibridoma se seleccionaron, que secretaron anticuerpos específicos para los antígenos O25b purificados así como se unieron a la superficie de cepas de *E. coli* de tipo silvestre vivas que expresan antígenos O25b. Estos mAb pueden purificarse después a partir de sobrenadantes de hibridoma para ensayos adicionales.

Como se representa en la Figura 1, todos los anticuerpos unidos a varios aislados clínicos diferentes se determinaron ser cepas ST131-O25b:H4 independientemente del polisacárido capsular expresado (K5, K2 o tipos K desconocidos). Con respecto a la unión a cepas que expresan el antígeno O25a hubo dos tipos de mAb identificados. Un grupo representado por el mAb 8D5-1G10, no se unió a la superficie de las cepas O25a, mientras que el otro grupo de mAb representado por 8D10-C8 era reactivo cruzado a las cepas O25a. Ninguno de los mAb, sin embargo, podía unirse a cualquier cepa de *E. coli* que expresara antígenos no relacionados, es decir O2 (Figura 1) u otros tipos O (no mostrados).

La especificidad de los mAb se confirmó además por ensayos de inmunotransferencia usando LPS purificado (Figura 2). Los mAb reconocieron las moléculas de LPS de cepas ST131 que contenían el antígeno O25b, sin embargo fueron diferentes en su potencial reactivo cruzado a los antígenos LPS O25a. Mientras que el mAb 8D5-1G10 reaccionó exclusivamente con el antígeno O25b, el mAb 8D10-C8 fue reactivo cruzado a O25a. Esta reactividad cruzada observada se comparó con aquella exhibida por el suero tipificado O25 comercial (Statens Serum Institut, antisuero de alto título de O25 de *E. coli*, N.º 81369) usado rutinariamente para la detección de cepas ST131-O25b. El suero de conejo comercial mostró clara preferencia hacia la unión a antígenos O25a frente al LPS O25b. En contraste, el mAb murino 8D10-C8 reaccionó con moléculas de LPS O25b al menos con la misma intensidad que a las moléculas de O25a. Los análisis cuantitativos posteriores revelaron que la relación de intensidad de unión a O25b frente a O25a es al menos 10 veces más alta en el caso de mAb 8D10-C8 en

comparación con el suero tipificado comercial.

Los datos anteriores juntos sugieren que hay dos tipos de mAb específicos de O25b, aquellos, que son altamente específicos a O25b, y aquellos que reconocen un epítipo compartido por los antígenos O25a y O25b. En consecuencia, los datos de los presentes inventores confirman que la estructura de P25b de hecho difiere de aquella del antígeno clásico O25 (es decir, O25a). La estructura novedosa de la subunidad O25b se elucidó como se describe en el Ejemplo 2.

Los dominios variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de los mAb específicos de O25b se amplificaron a partir de clones de hibridoma usando RT-PCR con cebadores de cadenas pesadas y ligeras degeneradas y se secuenciaron. Las secuencias se analizaron con BLAST para la base de datos de Ig así como con IMGT/V-QUEST y las regiones CDR se definieron de acuerdo con la nomenclatura Kabat.

Las secuencias de cadenas variables ligeras y pesadas de mAb 8D5-1G10 se clonaron en vectores respectivos, que se usaron para transformar las células hospedadoras *E. coli* depositadas en DSMZ bajo los números de acceso: DSM 26763 y DSM 26762.

Las secuencias de cadenas variables ligeras y pesadas de mAb 8D10-C8 se clonaron en vectores respectivos, que se usaron para transformar las células hospedadoras *E. coli* depositadas en DSMZ bajo los números de acceso: DSM 28171 y DSM 28172.

Ejemplo 2: Análisis estructural del antígeno O25b

El LPS de *E. coli* ST131 se aisló por el método de fenol caliente/agua y se purificó por diálisis, digestión de proteinasa K y ultracentrifugación. El rendimiento promedio de las preparaciones de LPS fue el 2,61 % de masa bacteriana seca. El LPS se analizó por SDS-PAGE, mostrando fracciones que consisten en oligosacáridos (OS) centrales sustituidos con diferentes números de unidades de repetición (RU) de oligosacáridos así como oligosacáridos centrales no sustituidos. El polisacárido O-específico (O-PS) y diferentes componentes de oligosacáridos se liberaron por hidrólisis ácida suave y se aislaron por filtración en gel en Bio-Gel P-10. Las fracciones se analizaron por análisis de azúcar y metilación, espectroscopía RMN y espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF.

La estructura del O-PS RU se determinó con el uso de una fracción que consistía en el OS central sustituido con una única RU. Los análisis de monosacáridos indicaron la presencia de Rha, Glc, Gal, Hep y una menor cantidad de GlcN. Se identificaron cantidades equimolares de derivados de Rhap terminal, Glcp terminal, Glcp 3,6-sustituido, Rhap 3-sustituido, con cantidades traza de GlcpN 3-sustituido y se designaron al O-PS RU. Los acetatos de alditol parcialmente metilados restantes de Hepp 7-sustituido, Glcp 6-sustituido, Glcp 2-sustituido, Galp terminal, Glcp 3,6-sustituido y Hepp terminal constituyeron el oligosacárido central del tipo K-12. Los derivados de Hepp 3,4-sustituido, Hepp 3,4,7-sustituido y Kdo no pudieron detectarse durante los análisis de azúcar y metilación convencionales debido a la sustitución por P y PPEtn y la presencia del grupo carboxilo, respectivamente.

La estructura de la RU del PS O-específico del LPS ST131 se determinó con el uso de espectroscopía RMN. La asignación completa de las resonancias O-PS ¹H and ¹³C se logró combinando la información obtenida de los experimentos COSY, TOCSY y NOESY, así como HSQC-DEPT, HMBC y HSQC-TOCSY. El espectro ¹H, ¹³C HSQCDEPT contenía señales para 13 protones anoméricos y carbonos y un sistema de espín Kdo. Estas señales derivan del oligosacárido central así como de la una RU del PS O-específico. La región de alto campo contenía una señal de CH₃ del grupo O-acetilo, una señal de CH₃ del grupo N-acetilo así como dos señales de campo arriba de CH₃ características de los azúcares 6-desoxi (Rha). Los espectros indicaron una estructura de tetrasacárido del oligosacárido investigado. Debido a la alta heterogeneidad relacionada con P, PP y PPEtn, los sistemas de espín completos de ocho azúcares del extremo no reductor se resolvieron completamente con énfasis en la estructura RU y su enlace al OS central K-12.

Las conectividades inter-resto entre los restos de azúcar adyacentes se observaron por experimentos NOESY y HMBC. Los espectros de HMBC exhibieron picos cruzados entre el protón anomérico y el carbono en la posición del enlace y entre el carbono anomérico y el protón en la posición del enlace, que confirmó la secuencia de los restos de azúcar en la región no reductora del polisacárido.

Basándose en estas mediciones, la unidad de repetición del PS O25b específico se determinó (Figura 3 (a)) que es un pentasacárido con →3)-β-GlcpNAc (resto K) como un resto de la sustitución RU del primer resto del OS central: →7)-α-Hepp (resto L). Debido a una posible contaminación de las fracciones de PS más largas, fue imposible identificar la posición de sustitución del primer RU por la posterior RU de la cadena O-específica. Además sin análisis estructurales detallados adicionales de esas fracciones, la presencia de GlcNAc en posteriores unidades de repetición como α-anómero (que se informó previamente para algunos de los lipopolisacáridos de *E. coli*) pudo descartarse.

Los pesos moleculares del OS central, OS central sustituido con una RU y finalmente el O-PS RU se confirmó con el

uso de MALDI-TOF MS (datos no mostrados). Todos los espectros se interpretaron en base de la estructura elucidada en el presente documento de la RU de LPS ST131 y las glucoformas previamente identificadas de OS central K-12 (Duda et al. Microbiology. Jun 2011;157(Pt 6):1750-60. doi: 10.1099/mic.0.046912-0. Epub 3 Mar 2011; Muller-Loennies et al. J Biol Chem. 5 Sep 2003 ;278(36):34090-101. Epub 20 Jun 2003). El análisis MALDI-MS de espectros de baja resolución de fracción que consistía en OS central sustituido con O-PS más cortos mostró agrupaciones de iones con los siguientes iones prevalentes: m/z 2797,2, m/z 3659,6, m/z 4522,0 y m/z 5383,6 atribuidos al OS central (con P y PPEtn) sustituido con 1, 2, 3 y 4 RU respectivamente. La diferencia de masas promedio entre estos iones fue 826,1 Da y coincidió con la masa promedio calculada de la RU PS O-específica (861,8 Da, RU-H2O).

Tomando en consideración el peso molecular de la RU y comparando los resultados de MS para otras fracciones, los presentes inventores han mostrado la presencia de la glucoforma OS central más larga que consiste en el disacárido $\rightarrow 7$ - α -Hepp-(1 \rightarrow 6)- α -Glc_p en la región central externa como un lugar de sustitución con la primera RU (Figura 3 (a)). Se mostró que el LPS ST131 consistía en dos glucoformas OS centrales principales. El tipo de glucoforma depende de la presencia o la ausencia del PS O-específico. La glucoforma prevalente del OS central no sustituido es la versión truncada del oligosacárido central K-12, que está desprovisto del disacárido $\rightarrow 7$ - α -Hepp-(1 \rightarrow 6)- α -Glc_p. Dicho disacárido es la diferencia entre el OS central sustituido O-PS y el OS central no sustituido.

Ejemplo 3: ensayo diagnóstico específico de *E. coli* O25b

El mAb específico de O25b 8D5-1G10 se unió a perlas de látex de 1 μ m de diámetro (Polysciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las perlas acopladas a látex se ensayaron para su potencial para aglutinar diferentes cepas de *E. coli*. Un conjunto de bacterias (aproximadamente 10⁸ ufc) se mezcló con 10 μ l de una suspensión al 1 % de perlas de látex acopladas a mAb en PBS. Como se representa en la Figura 4 las cepas de *E. coli* que expresaban antígenos O25b mostraron un patrón de aglutinación fuerte después de la agitación suave durante unos pocos segundos. Por el contrario, las cepas de *E. coli* que expresaban los antígenos O25a o O2 no se aglutinaron con el mismo reactivo. Por lo tanto, este reactivo diagnóstico putativo se considera ser más específico que el reactivo de aglutinación del estado de la técnica actualmente usado (es decir, suero de conejo policlonal contra O25) usado para la detección de *E. coli* positivo a O25b (y O25a).

Adicionalmente, ya que se recomienda usar el suero anti-O25 comercial con células de *E. coli* muertas por calor (es decir, lisadas) en ensayos de aglutinación, los presentes inventores ensayaron si los mAb O25b - bien purificados o acoplados a perlas de látex - tendrían una sensibilidad más alta, es decir, si son capaces de aglutinar células *E. coli* vivas en presencia de polisacáridos capsulares intactos. Se ensayó un gran panel de aislados clínicos O25b y los resultados con algunas cepas representativas se presentan en la Tabla I. La mejora en la sensibilidad se encontró en dos aspectos: i) las cepas representativas n.º 1 y n.º 2 eran aglutinables tanto con mAb específicos de O25b libres como acoplados a perlas en una forma no muerta por calor (es decir bacterias vivas tomadas directamente de una placa de agar), mientras que la aglutinación con el suero de conejo O25 comercial requirió la lisis por calor previa de las bacterias, ii) las cepas representativas n.º 3 y n.º 4 no eran capaces de aglutinarse con el suero comercial incluso en una forma muerta por calor, mientras que los mismos lisados dieron resultado positivo con el mAb 8D5-1G10 purificado. De forma importante, cuando el mismo anticuerpo se acopló a perlas de látex, la aglutinación se desarrolló incluso con células bacterianas nativas. Estos resultados indican una sensibilidad superior de los mAb acoplados a perlas en los ensayos de aglutinación, que se corrobora por el hecho de que todas las cepas de *E. coli* O25b positivas probadas dieron una aglutinación bastante positiva con este reactivo incluso sin ningún tratamiento previo (es decir, sin producir un lisado muerto por calor). Además, al usar este reactivo como una herramienta diagnóstica para la detección de bacterias que expresan O25b tiene la ventaja sobre la técnica basada en PCR que solamente da un resultado positivo con bacterias que de hecho expresan el antígeno diana. Por ejemplo, la cepa representativa n.º 5 en la Tabla I fue PCR positiva para el gen específico O25b usado rutinariamente en diagnósticos, sin embargo, fue negativa en cualquier ensayo de aglutinación. Esta cepa ha demostrado exhibir un tosco fenotipo LPS (sin expresar antígenos O), por lo tanto, el resultado de PCR podría considerarse como un falso positivo. Evitar dicha positividad falsa es de gran importancia, cuando dichos ensayos se usan como diagnósticos de compañía, es decir, para seleccionar pacientes infectados con cepas de *E. coli* que expresan O25b que podrían beneficiarse de enfoques terapéuticos específicos de O25b.

También se probó el potencial para detectar moléculas de LPS O25b libres por los mAb acoplados a perlas de látex. Se incubaron diferentes cantidades de LPS O25b altamente purificado en el intervalo de 1-1000 ng con 10 μ l de una suspensión de perlas al 1 % en PBS. Como se representa en la Figura 5, se vio un patrón de aglutinación dependiente de dosis: los mejores resultados se obtuvieron con 100 ng de LPS libre, la aglutinación todavía era detectable con 1000 o 10 ng, mientras que era indetectable con 1 ng de LPS O25b libre.

Tabla I: Comparación de los resultados de aglutinación obtenidos con diversas cepas O25b usando suero tipificado O25 comercial y mAb 8D5-1G10 específico de O25b.

Cepa O25b	PCR rfb _{O25b}	Aglutinación por suero tipificado O25 (comercial) de lisados muertos por calor	Aglutinación por mAb O25b de		Aglutinación por 8D5-1G10 acoplado a perlas de bacterias vivas (no muertas por calor)
			Lisados (muertos por calor)	Células vivas (no muertas por calor)	
#1	+	+	+	+	+
#2	+	+	+	+	+
#3	+	-	-	+	+
#4	+	-	-	+	+
#5	+	-	-	-	-

5 **Ejemplo 4: Efecto antibacteriano de mAb específicos de O25b**

El efecto protector potencial de mAb específicos de O25b (con o sin reactividad cruzada a O25a) se ensayó en un modelo de bacteriemia murina letal. Grupos de 5 ratones recibieron 100 µg de 8D5-1G10 u 8D10-C8 purificados, intraperitonealmente. 24 h después los ratones se desafiaron intravenosamente con una dosis letal (previamente determinada en un experimento piloto) de la cepa 81009 de *E. coli* (2×10^8 UFC/ratón) que expresa el antígeno O25b. La letalidad de los ratones se monitorizó diariamente durante 3 semanas. La Figura 6 muestra los resultados combinados de 2 experimentos independientes con resultado similar. Mientras que el 90 % de los ratones inmunizados en simulacro con PBS sucumbieron a la infección, ambos mAb probados proporcionaron un aumento estadísticamente significativo (prueba de Logrank) en la supervivencia durante el periodo monitorizado de 3 semanas post-infección.

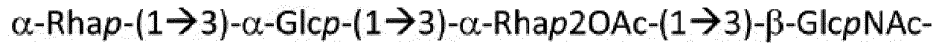
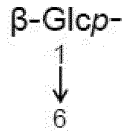
Para corroborar estos datos *in vivo*, también se probó el efecto bactericida de los mAb purificados *in vitro*. 2 ml de un cultivo semi-log de la cepa 81009 de *E. coli* se lavó dos veces en PBS y se re-suspendió a una concentración final de 5×10^5 UFC/ml. 10 µl de esta suspensión bacteriana se pre-incubó durante 15 minutos a 4 °C con 4 µg de los mAb respectivos diluidos en 40 µl de tampón RPMI-1640 suplementado con 3 % de albúmina humana. Posteriormente, se añadieron 50 µl de suero humano en conjunto (adsorbido previamente con la cepa 81009 de *E. coli*) a la reacción y se incubó a 37 °C durante 1, 2 y 3 h. Las UFC y las concentraciones de anticuerpo finales en la reacción fueron 5×10^4 UFC/ml y 40 µg/ml respectivamente en un volumen total de 100 µl. Se colocaron en placa alícuotas de 10 µl sobre placas TBS para el recuento de colonias en los puntos de tiempo especificados.

Como se representa en la Figura 7, ambos mAb ensayados fueron capaces de disminuir significativamente las UFC durante el periodo de estudio de 3 horas. Por el contrario, las bacterias mixtas con un mAb irrelevante o sin anticuerpos mostraron un crecimiento constante en este medio. En el caso de que el complemento se inactivó en las muestras de suero (por incubación de 30 min a 56 °C), no se observó muerte bacteriana por ningún mAb (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que ambos mAb O25b específicos pueden disparar el efecto bactericida mediado por el complemento.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno que comprende el antígeno O25b **caracterizado por** la estructura de unidad de repetición de O25b.

5



y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 2. El inmunógeno de la reivindicación 1, que comprende sustancias tamponantes y/o adyuvantes.
3. Un inmunógeno de la reivindicación 1 o 2 para su uso para provocar una respuesta inmune protectora.
- 15 4. Un inmunógeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde una formulación parenteral del inmunógeno se administra por administración subcutánea o intramuscular.
5. Una vacuna que comprende el inmunógeno de la reivindicación 1 o 2, para su uso en el tratamiento de una infección por *E. coli* MDR en un sujeto.
- 20 6. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, para la prevención de una afección de enfermedad que es el resultado de dicha infección.
7. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, donde el tratamiento se combina con un tratamiento con al menos un agente terapéutico o profiláctico adicional.
- 25 8. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el agente se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, inhibidores esteroideos de la inflamación, inhibidores no esteroideos de la inflamación y mezclas de los mismos.
- 30 9. La vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, cuyo tratamiento se combina con una terapia basada en anticuerpos.

Fig. 1

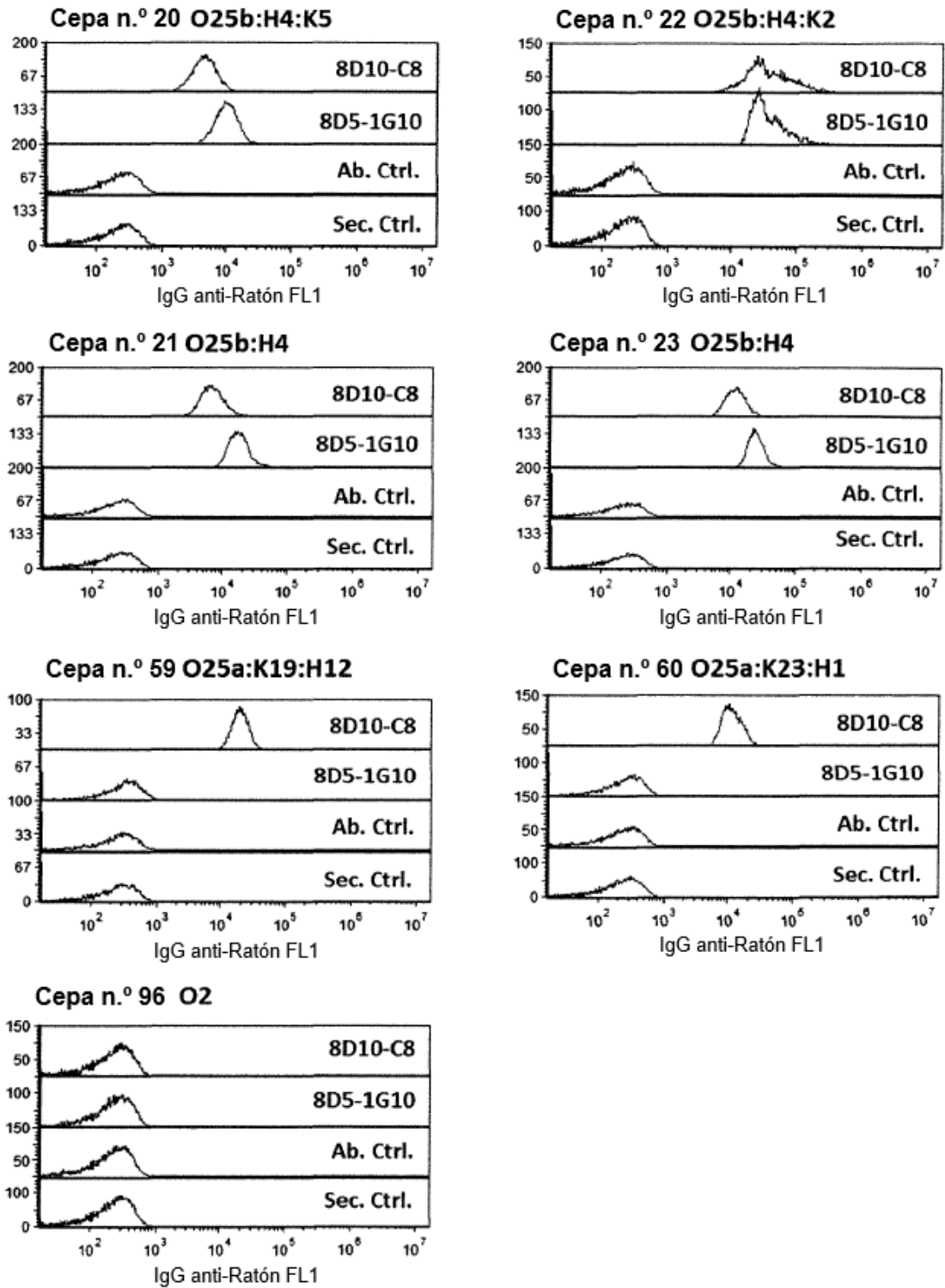


Fig. 2

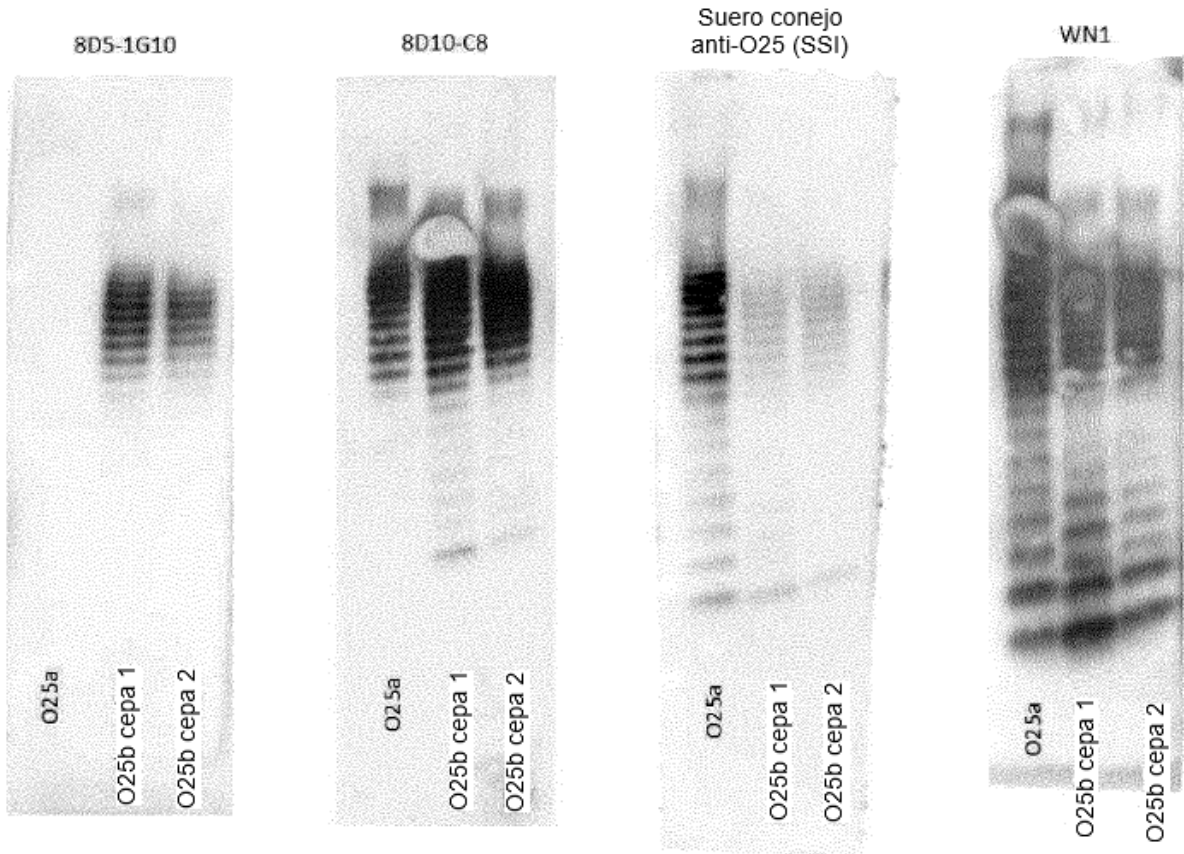


Fig. 3

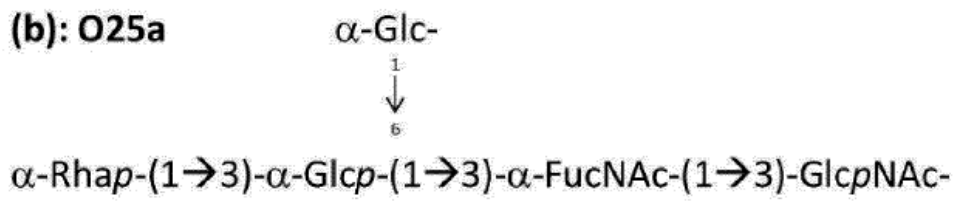
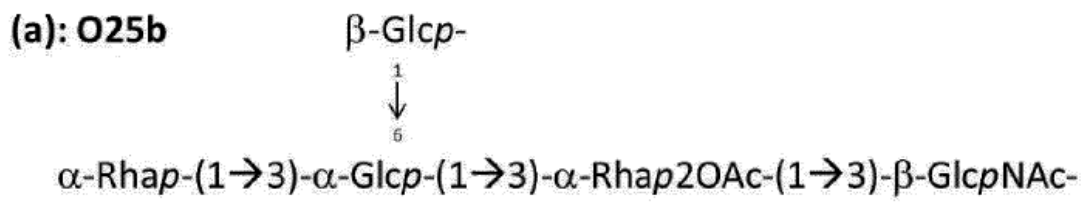


Fig. 4

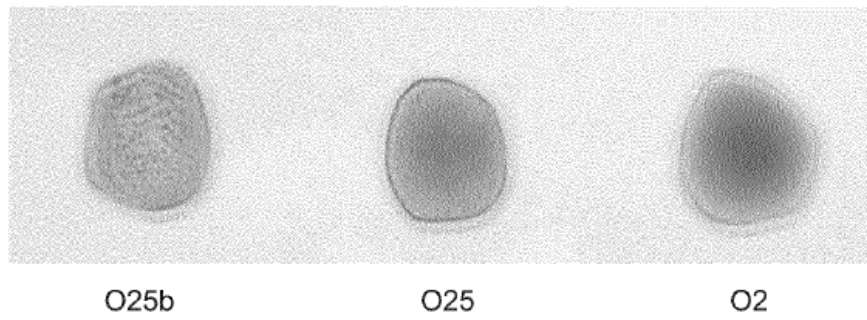


Fig. 5

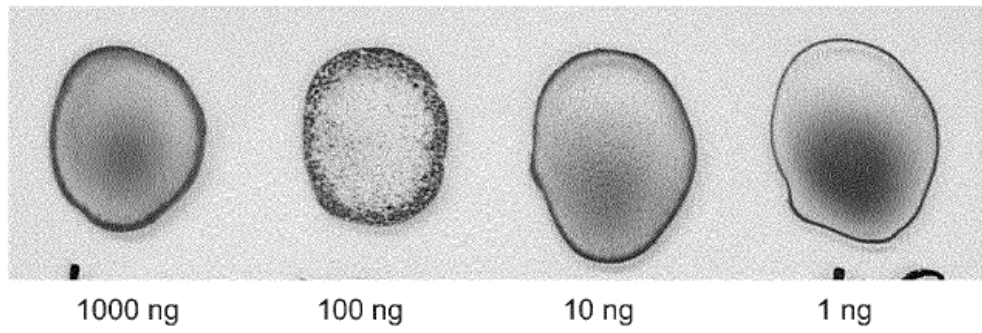


Fig. 6

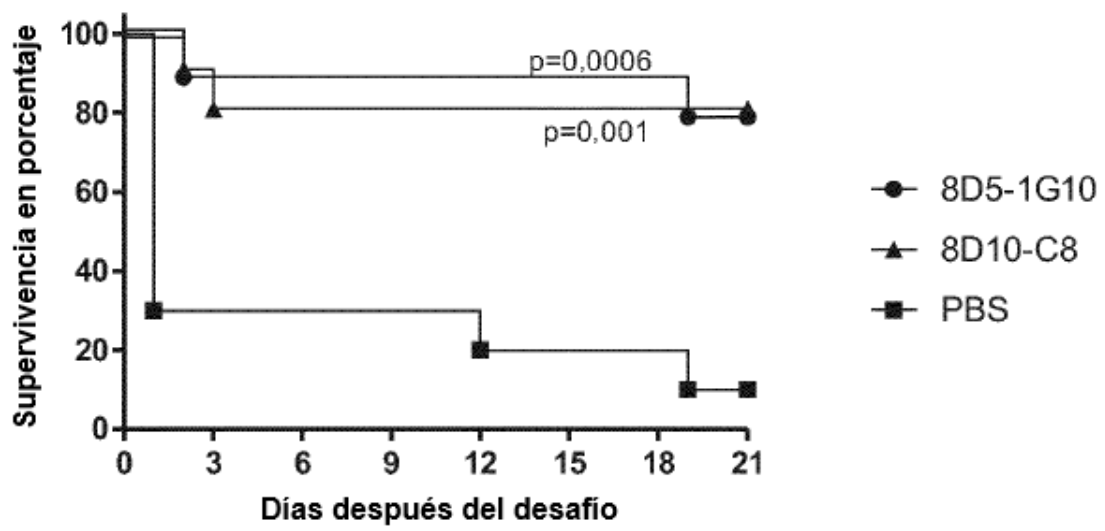


Fig. 7

