

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 278**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/12** (2006.01)

**A61K 39/40** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2012 PCT/GB2012/052222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13038156**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2012 E 12761789 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2758432**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes de las exotoxinas principales TcdA y TcdB de Clostridium difficile**

30 Prioridad:

**16.09.2011 US 201161535532 P**

**26.04.2012 US 201261638731 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.10.2019**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)  
Allée de la Recherche 60  
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**HUMPHREYS, DAVID PAUL;  
LIGHTWOOD, DANIEL JOHN;  
TYSON, KERRY LOUISE;  
KNIGHT, DAVID EDWARD ORMONDE;  
HERVÉ, KARINE JEANNINE MADELEINE;  
COMPSON, JOANNE ELIZABETH;  
PAGE, MATTHEW JON TIMOTHY;  
PAYNE, ANDREW CHARLES;  
FISHER, NICOLA LOUISE;  
MACKENZIE, BRENDON y  
COX, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 729 278 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos neutralizantes de las exotoxinas principales TcdA y TcdB de *Clostridium difficile*

La presente invención se refiere a anticuerpos de exotoxinas de *Clostridium difficile*, por ejemplo TcdA y TcdB, a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, a procesos de producción de dichos anticuerpos y a composiciones y al uso de anticuerpos y composiciones en el tratamiento y/o la profilaxis, en particular el tratamiento o la profilaxis de infección por *Clostridium difficile*, colitis pseudomembranosa, colitis fulminante y/o megacolon tóxico.

Las dos exotoxinas principales TcdA y TcdB se han establecido como los determinantes principales de la patogenicidad de *Clostridium difficile* en un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo*. Las cepas no toxigénicas no son patógenas para animales y el hombre (1, 2). Hasta la fecha, está todavía por establecer una comprensión completa del papel de la toxina binaria (3).

Ambas toxinas son enterotóxicas y citotóxicas, pero la suma de evidencias sugiere que TcdA es una enterotoxina más potente que TcdB, mientras que se observa típicamente que TcdB es ~1000x más citotóxica que TcdA (4). Aunque ambas toxinas son capaces de inducir una respuesta inflamatoria, TcdA parece ayudar a la migración de la TcdB más inflamatoria más profundamente en la mucosa intestinal (5).

En conjunto, una gran colección de datos generados durante más de 30 años apoya un modelo donde es probable que ambas toxinas sean importantes en el proceso de enfermedades humanas. Es probable que TcdA inicie un daño intestinal temprano (concretamente, antes que TcdB) y rápido (concretamente en 1-3 horas) mediante la pérdida de uniones estrechas y la destrucción de puntas de vellosidades y por ello diarrea, probablemente mediante pérdida de fluidos impulsada por albúmina. Este daño a la integridad del revestimiento intestinal posibilita a TcdB ejercer su potencial molar superior (TcdB se cita típicamente que es 1000x más citotóxica que TcdA) más rápida y eficazmente (concretamente, más profundamente en el tejido, dianas celulares alternativas y dañando órganos accedidos sistémicamente). Cualquier toxina puede ser eficaz sola *in vitro* sobre células y tejidos humanos o animales. Cualquier toxina puede ser eficaz sola *in vivo* en animales dependiendo de otros factores desencadenantes tales como daño mecánico, sobrecarga de barrera y sensibilidades específicas del hospedador. Resulta ahora evidente que, en hámsteres, al menos una de TcdA o TcdB sola suministrada por una infección intestinal por *Clostridium difficile* puede causar la muerte (1). Está bien establecido que las cepas A-B+ son capaces de causar síntomas y muerte en seres humanos (6,7). Sin embargo, la mayoría (~95 %) de cepas clínicas son A+B+, por ello los fármacos orientados a tratar infecciones por *Clostridium difficile* (ICD) deben ser capaces de neutralizar las actividades y eliminar ambas toxinas eficazmente.

La ICD es lo más típicamente una infección nosocomial de pacientes ancianos o aquellos con comorbilidades complicadas. Sin embargo, se ha señalado un aumento de las infecciones extrahospitalarias. La infección está casi siempre asociada a o inducida por el uso de antibióticos de amplio espectro. Los costes sanitarios asociados se estima que son de más de 1000 millones de dólares al año solo en EE. UU. Estos costes son debidos sobre todo a los pacientes que tienen estancias hospitalarias más largas. Las terapias actuales implican el uso de antibióticos tales como clindamicina, vancomicina o fidaxomicina que destruyen las células de *Clostridium difficile* en el intestino. Las terapias actuales abordan la infección bacteriana, pero no afrontan ni previenen directamente la patogénesis significativa causada por TcdA y TcdB, que son los contribuyentes principales a los síntomas y mortalidad de ICD.

Los síntomas de ICD en seres humanos incluyen diarrea de leve a grave, colitis pseudomembranosa (CSM) y colitis fulminante o el denominado megacolon tóxico. La muerte es el resultado en un 5-15 % de los pacientes que reciben el mejor cuidado. Por tanto, actualmente no hay una terapia específica disponible para pacientes para prevenir el daño y lesiones causadas por toxinas de *C. difficile* después de la infección.

Suscitar una respuesta de anticuerpo mediante vacunación y administración parenteral de anticuerpos policlonales y monoclonales se ha mostrado capaz de proteger a animales de los síntomas de diarrea y muerte (8-15). Estudios tempranos en hámsteres sugerían que los anticuerpos contra TcdA sola eran todo lo necesario para protección. Sin embargo, el uso de cepas con delección funcional de TcdA o TcdB demuestra que cualquiera de las toxinas es capaz de causar diarrea en hámsteres, pero que ambas toxinas juntas son más eficaces (1).

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos monoclonales (Mab) pueden ofrecer eficacia, seguridad, ventajas de fabricación y regulatorias frente a anticuerpos policlonales derivados de suero o sueros hiperinmunitarios derivados de suero. Por estas razones, los Mab son habitualmente la opción preferida para productos terapéuticos.

Ha habido una serie de intentos de generar Mab protectores contra TcdA y TcdB. El más avanzado de estos en clínica es una mezcla de 2 Mab IgG1, uno contra cada TcdA y TcdB originalmente llamados CDA1 y MDX1388 desarrollados por MBL y Medarex. Se demostraron incapaces de proteger completamente a hámsteres en modelos de infecciones agudas o recidivas (15). Esta combinación de Mab se está desarrollando ahora como MK3415A por Merck Inc. En un ensayo humano de fase II, MK3415A daba como resultado una reducción estadísticamente significativa de la recurrencia de la enfermedad ( $p=0,006$ ) (véase también Lowy et al., NEJM (2010) 362: 197-205) pero no afectaba a la duración/gravedad de la diarrea o a las tasas de mortalidad (16). Véanse también Babcock et al Infection and Immunity Nov 2006, páginas 6339 a 6347 y WO2006/121422. Esto puede significar que estos anticuerpos pueden ser útiles solo para prevenir la recurrencia de la infección. La recurrencia de la infección es el resultado en

aproximadamente un 25 % de pacientes. Por tanto, habrá probablemente una población de pacientes significativa en que estos anticuerpos no sean eficaces.

5 Para poder tener una influencia positiva sobre la diarrea (por ejemplo, como resultado de daño agudo en las uniones estrechas del intestino debido a TcdA) y la muerte (por ejemplo, como resultado de un mal estado nutricional prolongado, estrés por deshidratación e iniciación de una cascada inflamatoria, lesión anatómica extendida en el revestimiento intestinal y posiblemente daño en órganos distantes debido a la toxina sistémica TcdB más que a TcdA), se requieren Mab con afinidad superior, neutralización de toxinas, prevención superior de la pérdida de RETE (resistencia eléctrica transepitelial), decoración de antígenos e inmunoeeliminación de antígenos.

### Compendio de la presente invención

10 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal neutralizante o fragmento de unión específico de TcdA, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 49, y una cadena ligera que comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 47.

15 La divulgación proporciona también un Mab o varios con un nivel muy alto de potencia *in vitro* e *in vivo* que tienen el potencial de tener impacto sobre la duración y gravedad de la diarrea y la tasa de mortalidad en seres humanos que padecen infección por *Clostridium difficile* (ICD).

Se proporciona también una composición farmacéutica según la presente invención que comprende un anticuerpo monoclonal adicional o fragmento de unión del mismo específico de TcdA seleccionado independientemente de:

20 i) una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-L3;

25 ii) una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 34 para CDR-H1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 35 para CDR-H2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 36 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 31 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 32 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 33 para CDR-L3; y

30 iii) una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 54 para CDR-H1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 55 para CDR-H2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 56 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 51 para CDR-L1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 52 para CDR-L2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 53 para CDR-L3.

35 Los anticuerpos de la presente divulgación son útiles porque es probable que proporcionen un medio de tratamiento de la gravedad y duración de los síntomas de una infección primaria tal como diarrea en un paciente o prevengan la muerte y no solo prevengan la recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

En al menos algunas realizaciones, los anticuerpos según la presente divulgación no muestran reducción de la potencia en presencia de altas concentraciones de toxina.

### Descripción detallada de la presente invención

40 Específico, como se emplea en la presente memoria, pretende hacer referencia a un anticuerpo que solo reconoce el antígeno del que es específico o un anticuerpo que tiene una afinidad de unión significativamente mayor por el antígeno del que es específico en comparación con la unión a antígenos de los que no es específico, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de unión.

La afinidad de unión puede medirse por ensayos estándares tales como resonancia de plasmón de superficie, tales como BIAcore.

45 En una realización, la CE<sub>50</sub> es menor de 75, 70, 60, 65, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5 ng/ml de infección por *Clostridium difficile* en ensayos de cultivo celular y el paciente. Esto es significativamente menor (más potente) que anticuerpos conocidos y se cree que es un factor importante de por qué los anticuerpos de la presente divulgación tienen un impacto significativo y positivo sobre la supervivencia de sujetos que reciben tratamiento.

50 Como se emplea en la presente memoria, potencia es la capacidad del anticuerpo de desencadenar una respuesta biológica apropiada, por ejemplo neutralización de los efectos nocivos de toxinas, a una dosis o concentración dada. Los ejemplos de potencia incluyen el porcentaje de neutralización máxima de la actividad de toxina (extensión de la protección), la concentración relativa mínima de Mab a antígeno (p. ej., CE<sub>50</sub>), la velocidad y durabilidad de la actividad de neutralización.

5 En ensayos de cultivo celular, podría observarse neutralización como uno o más de los siguientes: prevención de la unión de toxina a células, inmunoprecipitación de toxina de la solución, prevención de la pérdida de forma y conformación celular, prevención de la pérdida de estructuras citoesqueléticas, prevención de la pérdida de uniones estrechas de monocapa celular y resistencia eléctrica transepitelial, prevención de la muerte celular, apoptosis y producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y MIP1 $\alpha$ .

En ensayos de seccionamiento y explante de tejidos, puede observarse neutralización, por ejemplo, como la prevención de necrosis y/o la acumulación de fluidos edematosos.

10 En ensayos *in vivo*, puede observarse neutralización como uno o más de los siguientes: prevención de la acumulación de fluidos en asas ileales ligadas y prevención de la necrosis de tejido intestinal, diarrea, formación pseudomembranosa y muerte de animales.

La presente divulgación incluye un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

QASQISISNALA	SEQ ID NO: 1
SASSLAS	SEQ ID NO: 2
QYTHYSHTSKNP	SEQ ID NO: 3
GFTISSYYMS	SEQ ID NO: 4
IISGGHFTWYANWAKG	SEQ ID NO: 5
AYVSGSSFNGYAL	SEQ ID NO: 6

En una realización, las secuencias 1 a 3 están en una cadena ligera del anticuerpo.

15 En una realización, las secuencias 4 a 6 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 1 es CDR L1, la SEQ ID NO: 2 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 3 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 4 es CDR H1, la SEQ ID NO: 5 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 6 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 1 es CDR L1, la SEQ ID NO: 2 es CDR L2, la SEQ ID NO: 3 es CDR L3, la SEQ ID NO: 4 es CDR H1, la SEQ ID NO: 5 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 6 es CDR H3.

20 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 922 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 7:

DPVMTQSPSTLSASVGRVTITCQASQISISNALAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLASGVPSRFK  
 GSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQYTHYSHTSKNPFGGGTKVEIK

en la que las CDR se subrayan y el constructo se hace referencia en la presente memoria como 922.g1 VK (gL1).

25 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 7 en la Figura 1 y en la SEQ ID NO: 8 en la misma.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 922 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 9:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYYMSWVRQAPGKGLEWIGIIISGGHFTWYANW  
AKGRFTISSDSTTVYLQMNSLRDEDTATYFCARAYVSGSSFNGYALWGQGTLVTVS

30 en la que las CDR se subrayan y el constructo se hace referencia en la presente memoria como 922.g1 VH (gH1).

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 9 en la Figura 1 y en la SEQ ID NO: 10 en la misma.

En una realización, el anticuerpo comprende las regiones variables mostradas en las SEQ ID NO: 7 y 9.

35 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

QASQSIISNYLA	SEQ ID NO: 11
SASTLAS	SEQ ID NO: 12
QYSHYGTGVFGA	SEQ ID NO: 13
AFSLSNYMS	SEQ ID NO: 14
IISGSGNALKWYASWPKG	SEQ ID NO: 15
NYVGSYSYGM DL	SEQ ID NO: 16

En una realización, las secuencias 11 a 13 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 14 a 16 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 11 es CDR L1, la SEQ ID NO: 12 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 13 es CDR L3.

5 En una realización, la SEQ ID NO: 14 es CDR H1, la SEQ ID NO: 15 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 16 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 11 es CDR L1, la SEQ ID NO: 12 es CDR L2, la SEQ ID NO: 13 es CDR L3, la SEQ ID NO: 14 es CDR H1, la SEQ ID NO: 15 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 16 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 923 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 17:

DVVM TQSPSSLSASV GDRVTITCQASQSIISNYLA WYQQKPGKVPKLLIYSASTLASGVP SRFK

10 GSGSGTQFTLT ISSLQPEDVATYYCQYSHYGTGVFGAFGGG TKVEIK

en la que las CDR se subrayan y el constructo se hace referencia en la presente memoria como CA923.g1 gL1

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 17 en la Figura 1 y en la SEQ ID NO: 18 en la misma.

15 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 923 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 19:

EVQLVESGGGLVQP GGSRLR LSCAASAFSLSNYMSWVRQAPGKGLEWIGI IISGSGNALKWYAS

WPKGRFTISKDSTTVYLQMN SLRAEDTATYFCARNYVGSYSYGM DLWGQGLT LTVS

en la que las CDR se subrayan y el constructo se hace referencia en la presente memoria como CA923.g1 gH1

20 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 19 en la Figura 2 y en la SEQ ID NO: 20 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO 17: y la SEQ ID NO: 19.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

QASQSISSYFS	SEQ ID NO: 21
GASTLAS	SEQ ID NO: 22
QCTDYSGIYFGG	SEQ ID NO: 23
GFSLSSYMS	SEQ ID NO: 24
IISGSGSTTFTWYASWAKG	SEQ ID NO: 25
AYVGSYSYGFDP	SEQ ID NO: 26

25

En una realización, las secuencias 21 a 23 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 24 a 26 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 21 es CDR L1, la SEQ ID NO: 22 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 23 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 24 es CDR H1, la SEQ ID NO: 25 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 26 es CDR H3.

- 5 En una realización, la SEQ ID NO: 21 es CDR L1, la SEQ ID NO: 22 es CDR L2, la SEQ ID NO: 23 es CDR L3, la SEQ ID NO: 24 es CDR H1, la SEQ ID NO: 25 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 26 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 993 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 27:

DVVMTQSPSTLSASVGRVTITCQASQSISSYFSWYQQKPGKAPQLLIYGASTLASGVPSRFK  
GSGSGTELTLTITSSLPDDFATYYCQCTDYSGIYFGGFGGGTKVEIK

- 10 en la que las CDR se subrayan y el constructo se hace referencia en la presente memoria como CA993.g1 gL1

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 27 en la Figura 2 y en la SEQ ID NO: 28 en la misma.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 993 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 29:

- 15

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWIGIISSGSSTTFTWYA  
SWAKGRFTISKSTTVYLQMNSLKTEDTATYFCARAYVGSSTSYGFDPWGQGTLLTVS

en la que las CDR se subrayan y el constructo se hace referencia en la presente memoria como CA993.g1 gH1

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 29 en la Figura 2 y en la SEQ ID NO: 30 en la misma.

- 20 En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO : 27 y la SEQ ID NO: 29.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

QASQSINNYFS	SEQ ID NO: 31
GAANLAS	SEQ ID NO: 32
QNNYGVHIYGAA	SEQ ID NO: 33
GFSLSNYDMI	SEQ ID NO: 34
FINTGGITYYASWAKG	SEQ ID NO: 35
VDDYIGAWGAGL	SEQ ID NO: 36

- 25 En una realización, las secuencias 31 a 33 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 34 a 36 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 31 es CDR L1, la SEQ ID NO: 32 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 33 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 34 es CDR H1, la SEQ ID NO: 35 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 36 es CDR H3.

- 30 En una realización, la SEQ ID NO: 31 es CDR L1, la SEQ ID NO: 32 es CDR L2, la SEQ ID NO: 33 es CDR L3, la SEQ ID NO: 34 es CDR H1, la SEQ ID NO: 35 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 36 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 995 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 37:

DVVMTQSPSTLSASVGDRTITCQASQSINNYFSWYQQKPGKAPKLLIYGAANLASGVPSRFK  
 GSGSGTEYTLTISLQPDDEFATYSCQNNYGVHIYGAAFGGGKVEIK

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 37 en la Figura 3 y en la SEQ ID NO: 38 en la misma.

- 5 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 995 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 39

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSNYDMIWVRQAPGKLEYIGFINTGGITYYASWA  
 KGRFTISRDSSTVYLQMNSLRAEDTATYFCARVDDYIGAWGAGLWGQGLTIVTS

en la que las CDR están subrayadas.

- 10 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 39 en la Figura 3 y en la SEQ ID NO: 40 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 37 y la SEQ ID NO: 39.

- 15 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

QASQSISSYLS	SEQ ID NO: 41
RASTLAS	SEQ ID NO: 42
LGVYGYSNDDGIA	SEQ ID NO: 43
GIDLSSHMC	SEQ ID NO: 44
VIYHFGSTYYANWATG	SEQ ID NO: 45
AS IAGYSAFDP	SEQ ID NO: 46

En una realización, las secuencias 41 a 43 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 44 a 46 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 41 es CDR L1, la SEQ ID NO: 42 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 43 es CDR L3.

- 20 En una realización, la SEQ ID NO: 44 es CDR H1, la SEQ ID NO: 45 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 46 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 41 es CDR L1, la SEQ ID NO: 42 es CDR L2, la SEQ ID NO: 43 es CDR L3, la SEQ ID NO: 44 es CDR H1, la SEQ ID NO: 45 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 46 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 997 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 47:

ALVMTQSPSSFSASTGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFS  
 GSGSGTEYTLTISCLQSEDFATYYCLGVYGYSNDDGIAFGGGKVEIK

- 25

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 47 en la Figura 3 y en la SEQ ID NO: 48 en la misma.

- 30 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 997 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 49:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLSSHHMCWVRQAPGKGLEYIGVIYHFGSTYYANWA  
TGRFTISKDSTTVYLQMNSLRAEDTATYFCARASIAGYSAFDPWGQGLTIVTS

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 49 en la Figura 4 y en la SEQ ID NO: 50 en la misma.

- 5 En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 49.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

QASQSIYSYLA	SEQ ID NO: 51
DASTLAS	SEQ ID NO: 52
QGNAYTSNSHDNA	SEQ ID NO: 53
GIDLSSDAVG	SEQ ID NO: 54
IIATFDSTYYASWAKG	SEQ ID NO: 55
TGSWYYISGWGSYYYGMDL	SEQ ID NO: 56

- 10 En una realización, las secuencias 51 a 53 están en una cadena ligera del anticuerpo.  
 En una realización, las secuencias 54 a 56 están en una cadena pesada del anticuerpo.  
 En una realización, la SEQ ID NO: 51 es CDR L1, la SEQ ID NO: 52 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 53 es CDR L3.  
 En una realización, la SEQ ID NO: 54 es CDR H1, la SEQ ID NO: 55 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 56 es CDR H3.  
 15 En una realización, la SEQ ID NO: 51 es CDR L1, la SEQ ID NO: 52 es CDR L2, la SEQ ID NO: 53 es CDR L3, la SEQ ID NO: 54 es CDR H1, la SEQ ID NO: 55 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 56 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1000 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 57:

EIVMTQSPSTLSASVGRVTITCQASQSIYSYLAWYQQKPKAPKLLIYDASTLASGVP  
SRFK  
GSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQGNAYTSNSHDNAFGGGTKVEIK

en la que las CDR están subrayadas.

- 20 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 57 en la Figura 4 y en la SEQ ID NO: 58 en la misma.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1000 anticuerpo anti-toxina A; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 59:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCTVSGIDLSSDAVGWVRQAPGKGLEYIGIIATFDSTYYASWA  
KGRFTISKASSTTVYLQMNSLRAEDTATYFCARTGSWYYISGWGSYYYGMDLWGQGLTIVTS

- 25 en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 59 en la Figura 4 y en la SEQ ID NO: 60 en la misma.

- 30 En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 57 y la SEQ ID NO: 59.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

ES 2 729 278 T3

RASKSVSTLMH	SEQ ID NO: 61
LASNLES	SEQ ID NO: 62
QQTWNDPWT	SEQ ID NO: 63
GFTFSNYGMA	SEQ ID NO: 64
SISSSGGSTYYRDSVKG	SEQ ID NO: 65
VIRGYVMDA	SEQ ID NO: 66

En una realización, las secuencias 61 a 63 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 64 a 66 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 61 es CDR L1, la SEQ ID NO: 62 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 63 es CDR L3.

5 En una realización, la SEQ ID NO: 64 es CDR H1, la SEQ ID NO: 65 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 66 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 61 es CDR L1, la SEQ ID NO: 62 es CDR L2, la SEQ ID NO: 63 es CDR L3, la SEQ ID NO: 64 es CDR H1, la SEQ ID NO: 65 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 66 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 926 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 67:

DTVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTLMHWFQQKPGQAPKLLIYLASNLESGVPARFS

10 GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTWNDPWTFGGGTKVEIK

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 67 en la Figura 5 y en la SEQ ID NO: 68 en la misma.

15 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 926 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 69:

EVELLESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYGMAWVRQAPTKGLEWVTSISSSGGSTYYRDS

VKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTATYYCTTVIRGYVMDAWGQGLVTVS

en la que las CDR están subrayadas.

20 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 69 en la Figura 5 y en la SEQ ID NO: 70 en la misma.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

RASGSVSTLMH	SEQ ID NO: 71
KASNLAS	SEQ ID NO: 72
HQSWNSDT	SEQ ID NO: 73
GFTFSNYGMA	SEQ ID NO: 74
TINYDGRTHHYRDSVKG	SEQ ID NO: 75
ISRSHYFDC	SEQ ID NO: 76

En una realización, las secuencias 71 a 73 están en una cadena ligera del anticuerpo.

25 En una realización, las secuencias 74 a 76 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 71 es CDR L1, la SEQ ID NO: 72 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 73 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 74 es CDR H1, la SEQ ID NO: 75 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 76 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 71 es CDR L1, la SEQ ID NO: 72 es CDR L2, la SEQ ID NO: 73 es CDR L3, la SEQ ID NO: 74 es CDR H1, la SEQ ID NO: 75 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 76 es CDR H3.

- 5 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 927 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 77:

DTQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASGSVSTLMHWYQQKPGKAPKLLIYKASNLAGVPSRFS  
GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCHQSWNSDTFGQGTRLEIK

en la que las CDR están subrayadas.

- 10 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 77 en la Figura 5 y en la SEQ ID NO: 78 en la misma.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 927 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 79:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLEWVATINVDGRTHYRDS  
VKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTSIISRSHYFDCWGQGLTIVTS

- 15 en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 79 en la Figura 5 y en la SEQ ID NO: 80 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO : 77 y la SEQ ID NO: 79.

- 20 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

KASKSISNHLA	SEQ ID NO: 81
SGSTLQS	SEQ ID NO: 82
QQYDEYPYT	SEQ ID NO: 83
GFSLQSYTIS	SEQ ID NO: 84
AISGGGSTYYNLPLKS	SEQ ID NO: 85
PRWYPRSYFDY	SEQ ID NO: 86

En una realización, las secuencias 81 a 83 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 84 a 86 están en una cadena pesada del anticuerpo.

- 25 En una realización, la SEQ ID NO: 81 es CDR L1, la SEQ ID NO: 82 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 83 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 84 es CDR H1, la SEQ ID NO: 85 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 86 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 81 es CDR L1, la SEQ ID NO: 82 es CDR L2, la SEQ ID NO: 83 es CDR L3, la SEQ ID NO: 84 es CDR H1, la SEQ ID NO: 85 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 86 es CDR H3.

- 30 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1099 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 87:

DVQLTQSPSFLSASVGRVTITCKASKSISNHLAWYQEKPQKANKLLIHSSTLQSGTSPSRFS  
GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDEYPYTDFGQGTRLEIKRT

en la que las CDR están subrayadas.

En una realización, los últimos dos aminoácidos (RT) de la SEQ ID NO: 87 se omiten.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 87 en la Figura 6 y en la SEQ ID NO: 88 en la misma. En una realización, los codones que codifican los dos últimos aminoácidos (RT) se omiten.

5 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1099 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 89:

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLQSYTISWVRQPPGKGLEWIAAISGGGSTYYNLPL  
KSRVTISRDTSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRPRWYPRSYFDYWGRGTLVTVS

en la que las CDR están subrayadas.

10 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 89 en la Figura 6 y en la SEQ ID NO: 90 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO 87: y la SEQ ID NO: 89.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

RASQRISTSIH	SEQ ID NO: 91
YASQSI	SEQ ID NO: 92
QSYSSLYT	SEQ ID NO: 93
GFTFSDSYMA	SEQ ID NO: 94
SISYGGTIIQYGDSVKG	SEQ ID NO: 95
RQGTARYLDF	SEQ ID NO: 96

15 En una realización, las secuencias 91 a 93 están en una cadena ligera del anticuerpo.  
 En una realización, las secuencias 94 a 96 están en una cadena pesada del anticuerpo.  
 En una realización, la SEQ ID NO: 91 es CDR L1, la SEQ ID NO: 92 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 93 es CDR L3.  
 En una realización, la SEQ ID NO: 94 es CDR H1, la SEQ ID NO: 95 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 96 es CDR H3.  
 20 En una realización, la SEQ ID NO: 91 es CDR L1, la SEQ ID NO: 92 es CDR L2, la SEQ ID NO: 93 es CDR L3, la SEQ ID NO: 94 es CDR H1, la SEQ ID NO: 95 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 96 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1102 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 97:

NIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRISTS IHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSISGIPARFS  
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQSYSSLYTFGQGTKLEIK

25 en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 97 en la Figura 6 y en la SEQ ID NO: 98 en la misma.

30 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1102 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 99:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAVSGFTFSDSYMAWVRQAPGKLEWIASISYGGTIIQYGDS  
VKGRFTISRDNKSSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRQGTARYLDFWGGQTLVTVS

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 99 en la Figura 7 y en la SEQ ID NO: 100 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO 97: y la SEQ ID NO: 99.

- 5 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

RASESVSTLLH	SEQ ID NO: 101
KASNLAS	SEQ ID NO: 102
HQSWNSPPT	SEQ ID NO: 103
GFTFSNYGMA	SEQ ID NO: 104
IINYDASTTHYRDSVKG	SEQ ID NO: 105
YGRSHYFDY	SEQ ID NO: 106

En una realización, las secuencias 101 a 103 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 104 a 106 están en una cadena pesada del anticuerpo.

- 10 En una realización, la SEQ ID NO: 101 es CDR L1, la SEQ ID NO: 102 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 103 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 104 es CDR H1, la SEQ ID NO: 105 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 106 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 101 es CDR L1, la SEQ ID NO: 102 es CDR L2, la SEQ ID NO: 103 es CDR L3, la SEQ ID NO: 104 es CDR H1, la SEQ ID NO: 105 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 106 es CDR H3.

- 15 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1114 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 107:

ATQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVSTLLHWYQQKPGKAPKLLIYKASNLASGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQSWNSPPTFGQGTKLEIK

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 107 en la Figura 7 y en la SEQ ID NO: 108 en la misma.

- 20 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1114 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 109:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKLEWVAIINYDASTTHYRDS  
VKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRYGRSHYFDYWGQGLTVTS

en la que las CDR están subrayadas.

- 25 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 109 en la Figura 7 y en la SEQ ID NO: 110 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 107 y la SEQ ID NO: 109.

- 30 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

RASESVSTLLH	SEQ ID NO: 111
KASNLAS	SEQ ID NO: 112
HQSWNSPPT	SEQ ID NO: 113
GFTFSNYGMA	SEQ ID NO: 114
IINYDASTTHYRDSVK	SEQ ID NO: 115
YGRSHYFDY	SEQ ID NO: 116

En una realización, las secuencias 111 a 113 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 114 a 116 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 111 es CDR L1, la SEQ ID NO: 112 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 113 es CDR L3.

5 En una realización, la SEQ ID NO: 114 es CDR H1, la SEQ ID NO: 115 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 116 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 111 es CDR L1, la SEQ ID NO: 112 es CDR L2, la SEQ ID NO: 113 es CDR L3, la SEQ ID NO: 114 es CDR H1, la SEQ ID NO: 115 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 116 es CDR H3.

10 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (injerto 8 de anticuerpo 114 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 117:

DTVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVSTLLHWYQQKPGKAPKLLIYKASNLASGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQSWNSPPTFGQGTKLEIK

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 117 en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 118 en la misma.

15 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (injerto 8 de anticuerpo 114 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 119:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKLEWVAIINYDASTTHYRDS  
VKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRYGRSHYFDYWGQGLVTVS

en la que las CDR están subrayadas.

20 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 119 en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 120 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 117 y la SEQ ID NO: 119.

25 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

KASQNIYMYLN	SEQ ID NO: 121
NTNKLHT	SEQ ID NO: 122
LQHKSFPYT	SEQ ID NO: 123
GFTFRDSFMA	SEQ ID NO: 124
SISYEGDKTYGDSVKG	SEQ ID NO: 125
LTITTS GDS	SEQ ID NO: 126

En una realización, las secuencias 121 a 123 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 124 a 126 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 121 es CDR L1, la SEQ ID NO: 122 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 123 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 124 es CDR H1, la SEQ ID NO: 125 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 126 es CDR H3.

- 5 En una realización, la SEQ ID NO: 121 es CDR L1, la SEQ ID NO: 122 es CDR L2, la SEQ ID NO: 123 es CDR L3, la SEQ ID NO: 124 es CDR H1, la SEQ ID NO: 125 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 126 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1125 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 127:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNIYMYLNWYQQKPGKAPKRLIYNTNKLHTGVPSRFS  
GSGSGTEYTLTISSLPEDFATYYCLQHKSFPYTFGQGTKLEIK

- 10 en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 127 en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 128 en la misma.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1125 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 129:

- 15

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDSSFMAWVRQAPGKGLEWVASISYEGDKTYYGDS  
VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTIITSGDSWGQGTMTVSS

en la que las CDR están subrayadas.

En una realización, el último aminoácido (S) de la SEQ ID NO: 129 se omite.

- 20 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 129 en la Figura 9 y en la SEQ ID NO: 130 en la misma. En una realización, el codón AGC que codifica el último aminoácido S se omite.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 127 y la SEQ ID NO: 129.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

KASQHVGTNVD	SEQ ID NO: 131
GASIRYT	SEQ ID NO: 132
LQYNYPYT	SEQ ID NO: 133
GFIFSNFGMS	SEQ ID NO: 134
SISPSGGNAYYRDSVKG	SEQ ID NO: 135
RAYSSPFAF	SEQ ID NO: 136

- 25 En una realización, las secuencias 131 a 133 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 134 a 136 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 131 es CDR L1, la SEQ ID NO: 132 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 133 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 134 es CDR H1, la SEQ ID NO: 135 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 136 es CDR H3.

- 30 En una realización, la SEQ ID NO: 131 es CDR L1, la SEQ ID NO: 132 es CDR L2, la SEQ ID NO: 133 es CDR L3, la SEQ ID NO: 134 es CDR H1, la SEQ ID NO: 135 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 136 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1129 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 137:

DTQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQHVGTNVDWYQQKPGKVPKLLIYGASIRYTGVPDRFT  
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLQYNYPYTFGQGTKLEIK

en la que las CDR están subrayadas

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 137 en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 138 en la misma.

- 5 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1129 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 139:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFIFSNFGMSWVRQAPGKGLEWVASISPSGGNAYYRDS  
 VKGRFTISRDN SKTTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTRRAYSSPFAFWGQGLTVTVSS

en la que las CDR están subrayadas

- 10 En una realización, el último aminoácido (S) de la SEQ ID NO: 139 se omite.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 139 en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 140 en la misma. En una realización, el codón AGC que codifica el último aminoácido S se omite.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 137 y la SEQ ID NO: 139.

- 15 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

KASKSISNHLA	SEQ ID NO: 141
SGSTLQP	SEQ ID NO: 142
QQYDEYPYT	SEQ ID NO: 143
GFSLNSYTIT	SEQ ID NO: 144
AISGGGTYFNSALKS	SEQ ID NO: 145
PRWYPRSYFDY	SEQ ID NO: 146

En una realización, las secuencias 141 a 143 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 144 a 146 están en una cadena pesada del anticuerpo.

- 20 En una realización, la SEQ ID NO: 141 es CDR L1, la SEQ ID NO: 142 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 143 es CDR L3.

En una realización, la SEQ ID NO: 144 es CDR H1, la SEQ ID NO: 145 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 146 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 141 es CDR L1, la SEQ ID NO: 142 es CDR L2, la SEQ ID NO: 143 es CDR L3, la SEQ ID NO: 144 es CDR H1, la SEQ ID NO: 145 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 146 es CDR H3.

- 25 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1134 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera):

DVQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASKSISNHLAWYQEKP GKANKLLIHSGSTLQPGT  
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDEYPYTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 147 en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 147 en la Figura 9 y en la SEQ ID NO: 148 en la misma.

- 30 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1134 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 149:

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLNSYTTITWVRQPPGKGLEWIAAISGGGSTYFNSAL

KSRVTISRDTSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRPRWYPRSYFDYWGRGTLVTVS

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 149 en la Figura 9 y en la SEQ ID NO: 150 en la misma.

- 5 En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 147 y la SEQ ID NO: 149.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

KASQNVGNNVA	SEQ ID NO: 151
YASNRFT	SEQ ID NO: 152
QRVYQSTWT	SEQ ID NO: 153
GFSLTSYYVH	SEQ ID NO: 154
CIRTGGNTEYQSEFKS	SEQ ID NO: 155
GNYGFAY	SEQ ID NO: 156

- 10 En una realización, las secuencias 151 a 153 están en una cadena ligera del anticuerpo.  
 En una realización, las secuencias 154 a 156 están en una cadena pesada del anticuerpo.  
 En una realización, la SEQ ID NO: 151 es CDR L1, la SEQ ID NO: 152 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 153 es CDR L3.  
 En una realización, la SEQ ID NO: 154 es CDR H1, la SEQ ID NO: 155 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 156 es CDR H3.  
 15 En una realización, la SEQ ID NO: 151 es CDR L1, la SEQ ID NO: 152 es CDR L2, la SEQ ID NO: 153 es CDR L3, la SEQ ID NO: 154 es CDR H1, la SEQ ID NO: 155 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 156 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1151 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 157:

AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGNNVAWYQHKPGKAPKLLIYYASNRFTGVPSRFT

GGGYGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQRVYQSTWTFGQGTKVEIK

en la que las CDR están subrayadas.

- 20 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 157 en la Figura 9 y en la SEQ ID NO: 158 en la misma.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1151 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 159:

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYYVHWVRQPPGKGLEWMGCIIRTGGNTEYQSEF

- 25 KSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGFAYWGQGTTLVTVS

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 159 en la Figura 9 y en la SEQ ID NO: 160 en la misma.

- 30 En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 157 y la SEQ ID NO: 159.

La presente divulgación proporciona también un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR seleccionadas de:

KASQNINKYLD	SEQ ID NO: 161
NIQSLHT	SEQ ID NO: 162
FQHNSGW	SEQ ID NO: 163
GFTFTQAAMF	SEQ ID NO: 164
RISTKSNNFATYYPDSVKG	SEQ ID NO: 165
PAYYYDGTVPFAY	SEQ ID NO: 166

En una realización, las secuencias 161 a 163 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una realización, las secuencias 164 a 166 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una realización, la SEQ ID NO: 161 es CDR L1, la SEQ ID NO: 162 es CDR L2 y la SEQ ID NO: 163 es CDR L3.

5 En una realización, la SEQ ID NO: 164 es CDR H1, la SEQ ID NO: 165 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 166 es CDR H3.

En una realización, la SEQ ID NO: 161 es CDR L1, la SEQ ID NO: 162 es CDR L2, la SEQ ID NO: 163 es CDR L3, la SEQ ID NO: 164 es CDR H1, la SEQ ID NO: 165 es CDR H2 y la SEQ ID NO: 166 es CDR H3.

En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena ligera, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1153 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 167:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNINKYLDWYQQKPGKVPKLLIYNIQSLHTGIPSRFS

10 GSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYCFQHNSGWTFGQGRLEIK

en la que las CDR están subrayadas.

Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 167 en la Figura 10 y en la SEQ ID NO: 168 en la misma.

15 En una realización, se proporciona una región variable, tal como una región variable de cadena pesada, con la siguiente secuencia (anticuerpo 1153 anticuerpo anti-toxina B; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 169:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTQAAMFWRQASGKGLGEGARISTKSNNFATYYP

DSVKGRFTISRDDSKNTVYVYLMNSLKTEDTAVYYCTAPAYYYDGTVPFAYWGQGLTVTS

en la que las CDR están subrayadas.

20 Se muestra la secuencia polinucleotídica que codifica la SEQ ID NO: 169 en la Figura 10 y en la SEQ ID NO: 170 en la misma.

En una realización, un anticuerpo según la invención comprende regiones variables mostradas en la SEQ ID NO: 167 y la SEQ ID NO: 169.

25 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo que comprende 6 CDR independientemente seleccionadas de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 161, 162, 163, 164, 165 y 166.

30 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo anti-TcdA que comprende 6 CDR independientemente seleccionadas de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 53, 54, 55 y 56.

35 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-TcdB que comprende 6 CDR independientemente seleccionadas de las SEQ ID NO 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 161, 162, 163, 164, 165 y 166.

En una realización, se proporciona un anticuerpo que comprende dos regiones variables independientemente seleccionadas de las SEQ ID NO: 7, 9, 17, 19, 27, 29, 37, 39, 47, 49, 57, 59, 67, 69, 77, 79, 87, 89, 97, 99, 107, 109, 117, 119, 127, 129, 137, 139, 147, 149, 157 y 159.

5 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo que comprende dos regiones variables independientemente seleccionadas de las SEQ ID NO: 7, 9, 17, 19, 27, 29, 37, 39, 47, 49, 57 y 59.

En una realización, se proporciona un anticuerpo que comprende dos regiones variables independientemente seleccionadas de las SEQ ID NO: 67, 69, 77, 79, 87, 89, 97, 99, 107, 109, 117, 119, 127, 129, 137, 139, 147, 149, 157 y 159.

En una realización, los anticuerpos según la invención están humanizados.

10 La presente divulgación proporciona también un anticuerpo o anticuerpos que están dirigidos a la porción de "unión celular" C-terminal de la toxina TcdA y/o TcdB.

En una realización, un anticuerpo según la invención es adecuado para neutralizar toxina A o toxina B.

Neutralizar como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a la eliminación o reducción de efectos dañinos/nocivos de la toxina diana, por ejemplo al menos un 50 % de reducción del efecto dañino relevante.

15 Los inventores han establecido, usando comparaciones internas entre anticuerpos descubiertos en esta solicitud y por comparación frente a anticuerpos bien descritos en la materia (Babcock et al. 2006; Lowy et al., 2010) que algunos anticuerpos tienen la característica deseable de mantener una neutralización eficaz (por ejemplo, baja CE<sub>50</sub> y alto % de protección) incluso a altas concentraciones de toxina. Otros anticuerpos, incluyendo aquellos descritos en la materia, no mantienen una neutralización de toxina eficaz a altas concentraciones de toxina.

20 Las concentraciones eficaces de toxina pueden definirse como una "dosis letal" (DL) en estudios de titulación en ausencia de anticuerpos neutralizantes. Los ensayos de neutralización se realizan típicamente a una DL del 50 % de la destrucción celular completa (*concretamente*, una DL<sub>50</sub>) pero pueden realizarse más rigurosamente a una DL<sub>80</sub>.

25 Pueden realizarse también ensayos en condiciones considerablemente más exigentes tales como DL<sub>90</sub>, DL<sub>95</sub> y/o DL<sub>máx</sub> (DL<sub>máx</sub> es la cantidad de toxina máxima que puede incluirse en un ensayo limitada por el volumen de ensayo y la concentración/solubilidad máxima de la toxina). Tales ensayos aspiran a imitar los estadios tempranos de infección de seres humanos cuando el crecimiento de *C. difficile* en el intestino es generalizado y la diarrea y otros síntomas conducen a teorizar que las concentraciones de toxina están al máximo. Los anticuerpos que neutralizan eficazmente las actividades de toxina dañinas en condiciones de alta concentración de toxina se cree por los presentes inventores que tienen especial valor clínico para el control de síntomas en infecciones humanas. En una realización, el anticuerpo o anticuerpos de la presente divulgación tienen, por ejemplo, bajos valores de CE<sub>50</sub> y/o alto % de protección de la muerte celular útiles para una o más de DL<sub>80</sub>, DL<sub>90</sub>, DL<sub>95</sub> y/o DL<sub>máx</sub>. En una realización, la CE<sub>50</sub> en una o más de las últimas situaciones es de 15 ng/ml o menos, por ejemplo 10 ng/ml o menos, tal como 5 ng/ml o menos, en particular 1 ng/ml o menos. En una realización, el % de protección de muerte celular es >90 % o >75 % o >50 %.

30 Por tanto, en una realización la presente divulgación proporciona un anticuerpo o una combinación de anticuerpos que mantienen la neutralización de toxinas incluso en presencia de altos niveles de toxina, por ejemplo como se mide en un ensayo proporcionado en la presente memoria.

35 El efecto dañino de la toxina puede medirse, por ejemplo, en un ensayo in vitro adecuado. En una realización, se mide la neutralización en un ensayo dado en el Ejemplo 1 siguiente. Se proporciona también un anticuerpo o anticuerpos identificados en un ensayo de neutralización, por ejemplo en el que se mantiene la potencia del anticuerpo en presencia de altos niveles de toxina.

Toxina A se usa intercambiamente con TcdA.

Toxina B se usa intercambiamente con TcdB.

En una realización, un anticuerpo según la invención es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo.

45 En una realización, un anticuerpo monoclonal según la invención es capaz de neutralizar TcdA con muy alta potencia y afinidad.

En una realización, un anticuerpo monoclonal según la invención es capaz de neutralizar TcdA con muy alta potencia y afinidad y alta avidéz.

La avidéz como se emplea en la presente memoria hace referencia a la fuerza combinada de múltiples afinidades de unión.

50 En una realización, un anticuerpo monoclonal según la invención es capaz de neutralizar TcdA con muy alta potencia y afinidad y alta avidéz y alta valencia de unión.

La valencia de unión como se emplea en la presente memoria hace referencia a la capacidad de un anticuerpo monoclonal de unirse a un antígeno múltiples veces. La alta valencia de la unión da como resultado por ello altos niveles de decoración de antígeno con anticuerpos y/o altos niveles de reticulación de moléculas de toxina, que se cree que es ventajoso.

- 5 Los Mab anti-TcdA según la presente divulgación pueden ser adecuados para neutralizar los efectos tempranos de TcdA, por ejemplo sobre células, tales como pérdida de uniones estrechas.

Unión estrecha como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a la zona impermeable de conexión entre células en una monocapa o estructura de tejido anatómico. No aparece pérdida de fluido cuando las uniones estrechas retienen su integridad estructural y funcional. La pérdida de uniones estrechas es una indicación de que la célula se ha comprometido por la toxina y está bien documentado que es una etapa temprana en los efectos tóxicos de TcdA y TcdB (25) y da como resultado la pérdida de fluido que contiene suero, inmunoglobulina e iones (26, 3). La pérdida de uniones estrechas se cree que es la primera etapa del inicio de la diarrea en seres humanos.

10 El sistema de ensayo de RETE puede usarse para medir la pérdida de unión estrecha *in vitro*. RETE es un acrónimo para ensayo de resistencia eléctrica transepitelial y se emplea generalmente para medir la permeabilidad de una capa celular diferenciada representativa de un revestimiento endotelial intestinal Sin embargo, en el contexto del cribado de anticuerpos, la pérdida de RETE puede emplearse para identificar anticuerpos que retardan o previenen el daño a las uniones estrechas y por ello es un sustituto de protección contra daño de tejido que conduce a diarrea.

15 A menudo se emplean células Caco-2, puesto que derivan de células de colon humanas y son conocidas por formar monocapas diferenciadas con las células conectadas por uniones estrechas. Está comercialmente disponible un kit en Becton-Dickinson llamado sistema de placa Caco-2 BioCoat HTS (BD Biosciences/ 354802). Las instrucciones en el kit son adecuadas para pruebas en el presente contexto. La resistencia de la membrana cambia cuando se ha comprometido la membrana.

20 Generalmente, el anticuerpo se preincubará con toxina antes de la adición al sistema de RETE para establecer si el anticuerpo puede prevenir o retardar el daño a la membrana causado por la toxina. El ensayo puede realizarse durante un periodo adecuado, por ejemplo 24 horas, tomando medidas en ciertos puntos temporales. Los presentes inventores han establecido que el punto temporal de 4 horas es particularmente discriminante de anticuerpos terapéuticamente útiles. La concentración de toxina empleada en el ensayo de RETE está generalmente en el intervalo de 100-200 ng/ml, lo más preferiblemente 125 ng/ml

25 La concentración de anticuerpo (por ejemplo IgG1) empleada en el ensayo de RETE está generalmente en el intervalo de 4 a 2000 ng/ml, por ejemplo de 50 a 1000 ng/ml, tal como de 100 a 500 ng/ml.

En una realización, la  $CE_{50}$  del anticuerpo en el ensayo de RETE empleado en dichas condiciones es de al menos 200 ng/ml, por ejemplo menos de 100 ng/ml, tal como aproximadamente 60-80 ng/ml.

30 En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-TcdA o un anticuerpo anti-TcdB adecuado para uso como agente terapéutico en el tratamiento o la prevención de infección por *C. difficile*, en el que dicho anticuerpo se cribó y seleccionó empleando un ensayo de RETE.

35 En un aspecto, se proporciona un método de cribado en un anticuerpo en un ensayo de RETE de la capacidad de retardar o prevenir la pérdida de uniones estrechas. En una realización, el anticuerpo o anticuerpos cribados son anticuerpos anti-TcdA. En una realización, el anticuerpo o anticuerpos cribados son anticuerpos anti-TcdAB. En una realización, el anticuerpo o anticuerpos cribados son una combinación de anticuerpos anti-TcdA y anti-TcdB. En una realización, el método comprende la etapa de identificar un anticuerpo o anticuerpos apropiados y expresar cantidades adecuadas del mismo. En una realización, el método comprende la etapa adicional de formular dicho anticuerpo o anticuerpos en una formulación farmacéutica. En una realización, el método comprende la etapa adicional de administrar dicho anticuerpo o anticuerpos o dicha formulación a un paciente necesitado de ello.

40 En una realización, múltiples anticuerpos de la divulgación pueden ser capaces de unirse a la toxina diana (TcdA o TcdB), lo que puede ayudar a la inmunoeliminación de la toxina.

Múltiples anticuerpos como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a múltiples copias de un anticuerpo con la misma secuencia o a un anticuerpo con la misma secuencia de aminoácidos o a un anticuerpo específico del mismo antígeno diana, pero con una secuencia de aminoácidos diferente.

45 En una realización, los anticuerpos según la invención son específicos del antígeno diana, por ejemplo específicos de un epítipo en el antígeno diana.

En una realización, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse al antígeno diana en dos o más localizaciones, por ejemplo dos o tres localizaciones, tal como cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más localizaciones, por ejemplo la toxina puede comprender dominios repetidos y por tanto un anticuerpo puede ser específico de un epítipo, y de hecho ese epítipo puede estar presente en el antígeno varias veces, concretamente

en más de una localización. Por tanto, los anticuerpos dados pueden unirse al mismo epítipo múltiples veces en localizaciones diferentes en el antígeno.

5 En una realización, el anticuerpo se une al antígeno dado múltiples veces, por ejemplo de 2 a 20 veces, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 veces. En una realización, el anticuerpo se une al antígeno dado al menos 3 veces. Esta unión múltiple se cree que es importante en la neutralización y/o eliminación de la toxina. Sin desear ligarse a teoría alguna, se cree que la unión múltiple, por ejemplo 3 veces, concretamente por decoración con 3 o más fragmentos de Fc, es importante para desencadenar la eliminación rápida de la toxina (24) sobre todo por el hígado y el bazo (27, 28).

En una realización, el anticuerpo anti-TcdA se une 3 o más veces, por ejemplo de 3 a 16 veces.

10 En una realización, el anticuerpo anti-TcdA se une 12 veces.

En una realización, el anticuerpo anti-TcdA se une 2 veces.

En una realización, un anticuerpo anti-TcdA se une al dominio de unión celular terminal catalítico de TcdA.

En una realización, el anticuerpo anti-TcdB se une 2 o más veces, por ejemplo 2 veces.

En una realización, un anticuerpo anti-TcdB se une al dominio de unión celular terminal catalítico de TcdB.

15 En una realización, el anticuerpo o anticuerpos según la divulgación son capaces de reticular moléculas de toxina, por ejemplo un brazo de la molécula de anticuerpo se une a una molécula de toxina y otro de los anticuerpos se une a un epítipo en una molécula de toxina diferente, formando así una especie de complejo inmunitario. La formación de este último puede facilitar también la activación del sistema inmunitario para eliminar la toxina relacionada y minimizar así los efectos nocivos *in vivo* de la misma.

20 En una realización, se activa una respuesta inmunitaria innata, tal como complemento.

En una realización, el anticuerpo o anticuerpos de la divulgación tienen una alta potencia contra toxinas derivadas de cepas de diferentes ribotipos, por ejemplo 003, 027, 078.

25 En una realización, los anticuerpos contra TcdA pueden tener una  $CE_{50}$  en el intervalo de 0,1-100 ng/ml, tal como 1 a 10 ng/ml, y una inhibición máxima en el intervalo de 50-100 % a concentraciones de toxina de  $DL_{80-95}$ , por ejemplo contra toxinas de cepas de ribotipos 003, 027 y 078.

En una realización, los anticuerpos contra TcdA pueden tener una  $CE_{50}$  en el intervalo de 0,1-100 ng/ml, tal como 1 a 10 ng/ml y una inhibición máxima en el intervalo de 60-100, 70-100, 80-100 o 90-100 % a concentraciones de toxina de  $DL_{80-95}$ , por ejemplo contra toxinas de cepas de ribotipos 003, 027 y 078.

30 En una realización, los anticuerpos contra TcdB pueden tener una  $CE_{50}$  en el intervalo de 0,1-100 ng/ml, tal como 1 a 10 ng/ml y una inhibición máxima en el intervalo de 50-100 % a concentraciones de toxina de  $DL_{80-95}$ , por ejemplo contra toxinas de cepas de ribotipo 003.

En una realización, los anticuerpos contra TcdB pueden tener una  $CE_{50}$  en el intervalo de 0,1-100 ng/ml, tal como 1 a 10 ng/ml y una inhibición máxima en el intervalo de 60-100, 70-100, 80-100 o 90-100 % a concentraciones de toxina de  $DL_{80-95}$ , por ejemplo contra toxinas de cepas de ribotipo 003.

35 En una realización, se proporcionan combinaciones de anticuerpos según la invención, por ejemplo combinaciones de anticuerpos específicos de TcdA, combinaciones de anticuerpos específicos de TcdB o combinaciones de anticuerpos específicos de TcdA y anticuerpos específicos de TcdB.

Las combinaciones de anticuerpos específicos de TcdA harán referencia generalmente a combinaciones de anticuerpos dirigidos a diferentes epítopos en el antígeno diana TcdA, o al menos con diferentes propiedades de unión.

40 Las combinaciones de anticuerpos específicos de TcdB harán referencia generalmente a combinaciones de anticuerpos dirigidos a diferentes epítopos en el antígeno diana TcdB, o al menos con diferentes propiedades de unión.

Las combinaciones pueden comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 anticuerpos distintos, por ejemplo 2, 3, 4 o 5 anticuerpos.

45 En una realización, se proporciona una combinación de un anticuerpo anti-TcdA según la presente divulgación y dos anti-TcdB, por ejemplo en la que el anticuerpo anti-TcdA es 997 y donde los anticuerpos anti-TcdB son 1125 y 1151

50 Se proporciona también una combinación de un anticuerpo anti-TcdA que comprende una región variable de cadena pesada con una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 49 y una región variable ligera con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 47 y dos anticuerpos anti-TcdB, el primero con una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 129 y una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 127, y el segundo con una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 159 y una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 157.

Distintos anticuerpos como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a anticuerpos con diferentes secuencias de aminoácidos, que pueden unirse al mismo epítipo o a diferentes epítipos en el antígeno diana.

5 Se proporciona también por la presente divulgación una región específica o epítipo de TcdA que se une por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 49 y la secuencia de cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 47.

10 Se proporciona también por la presente divulgación una región específica o epítipo de TcdB que se une por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 129 y la secuencia de cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 127 o un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 159 y la secuencia de cadena ligera dada en la SEQ ID NO: 157.

15 Esta región específica o epítipo de las toxinas TcdA o TcdB puede identificarse por cualquier método de cartografía de epítipos adecuado conocido en la materia en combinación con uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de tales métodos incluyen cribado de péptidos de longitudes variables derivados de toxinas para unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que pueda unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos pueden producirse sintéticamente o por digestión proteolítica del polipéptido de toxina. Los péptidos que se unen al anticuerpo pueden identificarse, por ejemplo, por análisis espectrométrico de masas. En otro ejemplo, puede usarse espectroscopía de RMN o cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitépico que se une a un anticuerpo de la presente invención puede usarse, si es necesario, como inmunógeno para obtener anticuerpos antagonísticos adicionales que se unen al mismo epítipo.

20 Los anticuerpos que bloquean de forma cruzada la unión de un anticuerpo según la presente invención pueden ser útiles de forma similar en la neutralización de la actividad de toxina. Por consiguiente, la presente invención proporciona también un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por TcdA o TcdB, que bloquea de forma cruzada la unión de uno cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente a TcdA o TcdB y/o se bloquea de forma cruzada en la unión de estas toxinas por uno cualquiera de esos anticuerpos. En una realización, tal anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria. En otra realización, el anticuerpo neutralizante bloqueante cruzado se une a un epítipo que bordea a y/o se superpone con el epítipo unido por el anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria. En otra realización, el anticuerpo neutralizante bloqueante cruzado de este aspecto de la invención no se une al mismo epítipo que un anticuerpo de la presente invención o un epítipo que bordea a y/o se superpone con dicho epítipo.

25 Los anticuerpos bloqueantes cruzados pueden identificarse usando cualquier método adecuado en la materia, por ejemplo, usando ELISA competitiva o ensayos BIAcore donde la unión del anticuerpo bloqueante cruzado a TcdA o TcdB previene la unión de un anticuerpo de la presente invención o *viceversa*.

30 En una realización, se proporciona un método de generación de un anticuerpo anti-TcdA o anti-TcdB, en particular un anticuerpo neutralizante y/o un anticuerpo que bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo descrito en la presente memoria, comprendiendo dicho método las etapas de inmunizar un hospedador con un antígeno adecuado, por ejemplo un antígeno mostrado en una cualquiera de las SEQ ID NO: 173 a 194 o una combinación de las mismas. Dicho método puede comprender también una o más de las siguientes etapas, por ejemplo, identificar un anticuerpo de interés (en particular, usando un ensayo funcional tal como un ensayo de RETE), expresar el anticuerpo de interés y, opcionalmente, formular el anticuerpo en forma de una composición farmacéuticamente aceptable.

Por tanto, en un aspecto la presente divulgación proporciona un método de inmunización de un hospedador con una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 173 a 194 o una combinación de las mismas.

35 En una realización, los anticuerpos según la invención tienen una afinidad por el antígeno diana de 10 nM o menos, por ejemplo 1 nM o menos, tal como 900 pM, en particular 800 pM, 700 pM, 600 pM o 500 pM, tal como 60 pM.

En una realización, la afinidad es por TcdA o TcdB o un fragmento de las mismas. En un ejemplo, el fragmento es TcdA123 correspondiente a los residuos S1827-D2249 de TcdA. En un ejemplo, el fragmento es TcdA456 correspondiente a los residuos G2205-R2608. En una realización, el fragmento es TcdB1234 correspondiente a los residuos S1833-E2366 de TcdB.

40 En una realización, los anticuerpos según la invención o una combinación de los mismos tienen una CE<sub>50</sub> de 200 ng/ml o menos, por ejemplo 150 ng/ml o menos, tal como 100 ng/ml o menos, tal como en el intervalo de 0,1 a 10 ng/ml.

Los anticuerpos componentes individuales de mezclas no requieren tener una CE<sub>50</sub> en dicho intervalo a condición de que, cuando se usan en combinación con uno o más anticuerpos, la combinación tenga una CE<sub>50</sub> en dicho intervalo.

45 Ventajosamente, los anticuerpos de la invención son estables, por ejemplo son térmicamente estables a temperaturas superiores a 50 °C tales como 60 o 70 °C.

- Los anticuerpos y combinaciones según la presente invención tienen también una o más de las siguientes propiedades ventajosas: baja tasa de disociación, alta afinidad, alta potencia, la capacidad de unirse múltiples veces al antígeno diana para neutralizar la toxina mediante un mecanismo que reduce la pérdida de actividad de RETE medible, para estimular o ayudar a la repuesta inmunitaria natural del hospedador, para catalizar o ayudar a la inmunoeeliminación del patógeno (o toxina) y/o para educar el sistema inmunitario a responder apropiadamente al patógeno (o toxina).
- Los residuos en los dominios variables de anticuerpo se numeran convencionalmente según un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, EE. UU. (de aquí en adelante "Kabat *et al.* (supra)"). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indica otra cosa.
- Las denominaciones de residuo de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos real puede contener menos aminoácidos o adicionales que en la numeración de Kabat estricta correspondientes a un acortamiento, o inserción, de un componente estructural, tanto de región marco como determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura de dominio variable básica. La numeración de Kabat correcta de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".
- Las CDR del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 196, 901 - 917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Por tanto, a menos que se indique otra cosa, "CDR-H1" como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a los residuos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición topológica de bucle de Chothia.
- Las CDR del dominio variable de cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat.
- Los anticuerpos para uso en la presente invención pueden obtenerse usando cualquier método adecuado conocido en la materia. El polipéptido/proteína de toxina A y/o toxina B, incluyendo proteínas de fusión, por ejemplo proteínas de fusión toxina-Fc o células que expresan (de forma recombinante o natural) el polipéptido (tal como linfocitos T activados) puede usarse para producir anticuerpos que reconocen específicamente las toxinas diana. El polipéptido de toxina puede ser el polipéptido de longitud completa o un fragmento biológicamente activo o derivado del mismo.
- Los polipéptidos pueden prepararse mediante procesos bien conocidos en la materia a partir de células hospedadoras genomanipuladas que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se usan intercambiamente a menos que se especifique otra cosa. La secuencia para TcdA del ribotipo 027 se da en la SEQ ID NO: 171 (número de acceso a Uniprot C9YJ37) y la secuencia para TcdB del ribotipo 027 se da en la SEQ ID NO: 172 (número de acceso a Uniprot C9YJ35).
- El polipéptido de antígeno puede ser en algunos casos parte de una proteína mayor tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada con un marcaje de afinidad.
- Los anticuerpos generados contra el polipéptido de antígeno pueden obtenerse, cuando es necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase por ejemplo *Handbook of Experimental Immunology*, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos, pueden inmunizarse. Sin embargo, ratones, conejos, cerdos y ratas son generalmente los más adecuados.
- Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la materia tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today*, 4:72) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pág. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).
- Los anticuerpos para uso en la invención pueden generarse también usando métodos de anticuerpo linfocítico único por clonación y expresión de ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos únicos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15): 7843-78481; los documentos WO92/02551; WO2004/051268 y la solicitud de patente internacional número WO2004/106377.
- Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos injertados con CDR) son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véanse, p. ej. los documentos US 5.585.089; WO91/09967). Se apreciará que puede ser necesario solo transferir los residuos determinantes de la especificidad de las CDR en lugar de la CDR entera (véase, por ejemplo Kashmiri *et al.*, 2005, *Methods*, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden

comprender opcionalmente además uno o más residuos marco derivados de la especie no humana de la que derivaban las CDR.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula de anticuerpo humanizado" hace referencia a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donante (p. ej., un anticuerpo monoclonal de murino) injertadas en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (p. ej., un anticuerpo humano). Para revisión, véase Vaughan et al, *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. En una realización, en lugar de transferir la CDR completa, se transfieren solo uno o más de los residuos determinantes de la especificidad de una cualquiera de las CDR descritas anteriormente en la presente memoria al marco de anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). En una realización, se transfieren solo los residuos determinantes de la especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente en la presente memoria al marco de anticuerpo humano. En otra realización, se transfieren solo los residuos determinantes de la especificidad de cada una de las CDR descritas anteriormente en la presente memoria al marco de anticuerpo humano.

Cuando las CDR o residuos determinantes de la especificidad se injertan, puede usarse cualquier secuencia marco de región variable aceptora apropiada con respecto a la clase/tipo de anticuerpo donante del que derivan las CDR, incluyendo regiones marco de ratón, primate y humana. Adecuadamente, el anticuerpo humanizado según la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marco aceptoras humanas así como una o más de las CDR proporcionadas en la presente memoria.

Por tanto, se proporciona en una realización un anticuerpo humanizado que se une a toxina A o toxina B, en la que el dominio variable comprende regiones marco aceptoras humanas y CDR donantes ho humanas.

Son ejemplos de marcos humanos que pueden usarse en la presente invención KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., supra). Por ejemplo, pueden usarse, KOL y NEWM para la cadena pesada, puede usarse REI para la cadena ligera y pueden usarse EU, LAY y POM tanto para la cadena pesada como la cadena ligera. Como alternativa, pueden usarse secuencias de línea germinal humana; estas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las cadena pesada y ligera aceptoras no necesitan derivar necesariamente del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas que tienen regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

También, en un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, pueden cambiarse residuos inhabituales por residuos de aparición más frecuente para esta clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, pueden cambiarse residuos seleccionados en las regiones marco aceptoras de modo que correspondan con el residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann et al., 1998, *Nature*, 332, 323-324). Tales cambios deberían mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Se expone un protocolo para seleccionar residuos en las regiones marco aceptoras que pueden necesitar cambiarse en el documento WO 91/09967.

Generalmente, las secuencias de anticuerpo divulgadas en la presente memoria descriptiva están humanizadas.

La invención proporciona también secuencias que son un 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % similares a una secuencia o anticuerpo divulgado en la presente memoria.

"Identidad", como se usa en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se usa en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que pueden sustituirse a menudo por otro incluyen, pero sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Pueden calcularse fácilmente los grados de identidad y similitud (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing. Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1*, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987,

Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el software BLAST™ disponible en NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. y States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656,).

5 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención incluyen una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesada y ligera de longitud completa o un fragmento de las mismas y pueden ser, pero sin limitación, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticuerpos de dominio único (p. ej., VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bivalentes, trivalentes o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores (véanse, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, p.  
10 ej. biespecíficos, o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/22853 y WO05/113605). Las variantes de anticuerpo biespecíficas y multiespecíficas se consideran especialmente en este ejemplo, puesto que la finalidad es neutralizar dos proteínas diana independientes: TcdA y TcdB. Las regiones variables de anticuerpos divulgadas en la presente memoria pueden configurarse de tal modo que produzcan una variante de anticuerpo único que sea capaz de unirse a y neutralizar TcdA y TcdB.

20 En una realización, el anticuerpo según la presente divulgación se proporciona como proteína de fusión de unión a TcdA o TcdB que comprende un resto de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAb) ligados directa o indirectamente con el mismo, por ejemplo como se describe en el documento WO2009/040562.

25 En una realización, la proteína de fusión comprende anticuerpos de dos dominios, por ejemplo como apareamiento pesado variable (VH) y ligero variable (VL), opcionalmente ligados por un enlace disulfuro, por ejemplo como se describe en el documento WO2010/035012.

30 En una realización, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma o similar especificidad por el anticuerpo o anticuerpos de dominio único. En una realización, el Fab o Fab' tiene una especificidad diferente por el anticuerpo o anticuerpos de dominio único, es decir, la proteína de fusión es multivalente. En una realización, una proteína de fusión multivalente según la presente invención tiene un sitio de unión a albúmina, por ejemplo un par VH/VL, que proporciona a la misma un sitio de unión a albúmina.

En una realización, la proteína de fusión multivalente según la invención se une a TcdA y TcdB.

En una realización, la proteína de fusión multivalente según la invención se une a TcdB en múltiples posiciones, por ejemplo tiene distintas regiones de unión específicas de dos epítomos diferentes.

35 Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse con respecto a la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras, que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, pueden usarse dominios de región constante de IgG humana, especialmente de isotipos IgG1 e IgG3, cuando la molécula de anticuerpo se pretende para usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo se pretende para fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpo, p. ej. para simplemente neutralizar o agonizar un antígeno. Se apreciará que pueden usarse también las variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, pueden usarse moléculas de IgG4 en que la serina en posición 214 se ha cambiado a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. Se entenderá también por un  
40 especialista en la materia que los anticuerpos pueden experimentar una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y extensión de estas modificaciones dependen a menudo de la línea celular hospedadora usada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxiterminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995).

En una realización, la cadena pesada de anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera de anticuerpo comprende un dominio CL, kappa o bien lambda.

55 Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, dando así a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga global "observada" dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, del entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y de las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al que una molécula particular o superficie accesible al disolvente de la misma no porta carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo y fragmentos

de la invención pueden genomanipularse para tener un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede conducir a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular perfiles de solubilidad y/o estabilidad adecuados y/o características de purificación mejoradas.

5 Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado genomanipulado para tener un punto isoeléctrico diferente del anticuerpo identificado originalmente del que deriva. El anticuerpo puede genomanipularse, por ejemplo, reemplazando un residuo de aminoácido tal como reemplazando un residuo de aminoácido por uno o más residuos de aminoácido básicos. Como alternativa, pueden introducirse residuos de aminoácido básicos o pueden retirarse residuos de aminoácido ácidos. Como alternativa, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente alto, pueden introducirse residuos ácidos para rebajar el pI, según se requiera. Es importante, después de manipular el pI, tener cuidado de retener la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Por tanto, en una realización, el anticuerpo o fragmento genomanipulado tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Programas tales como \*\* ExpASY [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), y [http://www.iut-aries.up.univ-mrs.fr/w3bb/d\\_abim/compo-p.html](http://www.iut-aries.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html), pueden usarse para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

15 Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en la materia. La afinidad de los anticuerpos o variantes de los mismos puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la materia, incluyendo BIAcore, usando una proteína natural o recombinante aislada apropiada o una proteína/polipéptido de fusión adecuado.

20 La presente invención se refiere por lo tanto también a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención que tienen una afinidad mejorada por TcdA o TcdB, según sea apropiado. Tales variantes pueden obtenerse mediante una serie de protocolos de maduración de afinidad, incluyendo mutación de CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), transposición de cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), transposición de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), presentación en fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) discute estos métodos de maduración de afinidad.

Afinidad mejorada como se emplea en la presente memoria en este contexto hace referencia a una mejora frente a la molécula de partida.

30 Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una molécula efectora única o dos o más de tales moléculas ligadas para formar un resto único que puede enlazarse con los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, este puede prepararse por procedimientos de ADN químicos o recombinantes estándares en que el fragmento de anticuerpo se liga directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la materia (véanse Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, pág. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 y WO03/031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, la ligación puede conseguirse usando procedimientos de ARN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

40 La expresión molécula efectora como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros de origen sintético o natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse por RMN o espectroscopía de ESR.

45 Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados tales como <sup>111</sup>In y <sup>90</sup>Y, Lu177, bismuto213, californio252, iridio192 y wolframio88/renio188; o fármacos tales como, pero sin limitación, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

50 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas y transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas o toxina de difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno en tejido, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una lincina, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

55 Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales

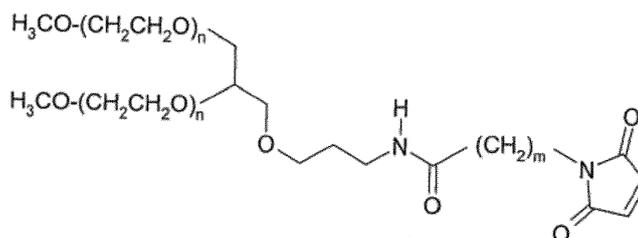
- luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la patente de EE. UU. nº 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico.
- 5 Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aecurina y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In y <sup>99</sup>Tc.
- 10 En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo in vivo, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el suministro del anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO05/117984.
- 15 Cuando la molécula efectora es un polímero, puede ser en general un polímero de origen sintético o natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homopolisacárido o heteropolisacárido.
- Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.
- 20 Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol, polivinilalcohol de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente polietilenglicol opcionalmente sustituido tal como metoxipolietilenglicol o derivados del mismo.
- Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.
- "Derivados" como se usa en la presente memoria pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidados y similares. El grupo reactivo puede ligarse directamente o a través de un segmento ligador al polímero. Se apreciará que el residuo de tal grupo formará parte en algunos casos del producto como grupo ligante entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.
- 25 El tamaño del polímero puede variar como se desee, pero estará generalmente en un intervalo medio de peso molecular de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño de polímero puede seleccionarse en particular basándose en el uso pretendido del producto, por ejemplo la capacidad de localizarse en ciertos tejidos tales como tumores o extender la vida media en circulación (para revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de pequeño peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones en que el producto permanece en circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.
- 30 Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un polietilenglicol, o, especialmente, un metoxipolietilenglicol o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.
- 35 En un ejemplo, los anticuerpos para uso en la presente invención están enlazados con restos de polietilenglicol (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden estar enlazadas a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden aparecer naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden genomanipularse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véanse por ejemplo los documentos US 5.219.996; US 5.667.425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir el enlazamiento de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que puede enlazarse la molécula efectora. Pueden usarse múltiples sitios para enlazar dos o más moléculas de PEG.
- 40 Adecuadamente, las moléculas de PEG se ligan covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero enlazada al fragmento de anticuerpo modificado puede ligarse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el fragmento. El ligamiento covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace de azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de enlazamiento, pueden usarse moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidados y derivados de cisteína. Puede usarse un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero como se describe anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster  $\alpha$ -halogenocarboxílico, p.ej. yodoacetamida, una imida, p.ej. maleimida, una vinilsufona o un disulfuro.
- 55

Tales materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nektar, antiguamente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible en Nektar, antiguamente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible en Nektar, antiguamente Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado o diFab que está PEGilado, concretamente tiene PEG (polietilenglicol) enlazado covalentemente con el mismo, p. ej. según el método divulgado en los documentos EP 0948544 o EP1090037 [véanse también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531-545]. En un ejemplo, el PEG está enlazado con una cisteína en la región de bisagra. En un ejemplo, un fragmento de Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida ligado covalentemente a un único grupo tiol en una región de bisagra modificada. Puede ligarse covalentemente un residuo de lisina al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina puede enlazarse un polímero de metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG enlazado con el fragmento Fab puede ser por lo tanto de aproximadamente 40.000 Da.

Las moléculas de PEG particulares incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilamida de lisina modificada con N,N'-bis(metoxipolietilenglicol) de PM 20.000, también conocida como PEG2MAL40K (obtenible en Nektar, antiguamente Shearwater).

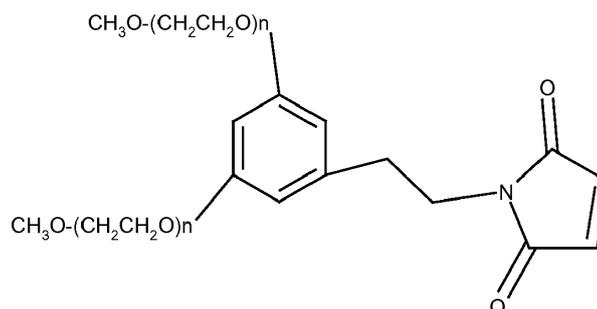
Las fuentes alternativas de ligadores de PEG incluyen NOF, que suministra GL2-400MA2 (en la que m en la estructura siguiente es 5) y GL2-400MA (donde m es 2) y n es aproximadamente 450:



m es 2 o 5

Es decir, cada PEG es de aproximadamente 20.000 Da.

Otras moléculas efectoras de PEG alternativas del tipo siguiente:



están disponibles en Dr Reddy, NOF y Jenkem.

En una realización, se proporciona un anticuerpo que está PEGilado (por ejemplo, con un PEG descrito en la presente memoria) enlazado a través de un residuo de aminoácido de cisteína en o aproximadamente en el aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo el aminoácido 226 de la cadena pesada (por numeración secuencial).

En una realización, uno de ciertos anticuerpos según la presente divulgación tiene las siguientes propiedades:

Anticuerpo	Afinidad (pM)		Valencia de unión	CE <sub>50</sub> (ng/ml)
	TcdA <sub>123</sub>	TcdA <sub>456</sub>	TcdA, est.	
CA922	4,06	2,59	16	1,21
CA923	64,7	312	12	160,42
CA995	nulo	119	1	37,64
CA997	132	66,8	12	6,25
CA1000	73,3	84,1	2	19,73

La presente invención proporciona también composiciones tales como una composición farmacéutica de anticuerpo o combinación de anticuerpos definida en la presente memoria.

5 La presente invención proporciona también una composición que comprende al menos dos anticuerpos según la invención, por ejemplo en la que al menos un anticuerpo en la misma es específico de TcdA y al menos un anticuerpo en la misma es específico de TcdB o, como alternativa, al menos dos anticuerpos específicos de TcdA o al menos dos anticuerpos específicos de TcdB.

En una realización, se proporciona una composición que comprende múltiples anticuerpos específicos de TcdA y opcionalmente uno o más anticuerpos específicos de TcdB.

10 La divulgación proporciona también una composición que comprende múltiples anticuerpos específicos de TcdB y opcionalmente uno o más anticuerpos específicos de TcdA.

Por tanto, en una realización se proporciona una composición que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 anticuerpos según la invención, concretamente anticuerpos distintos.

15 La invención describe una mezcla particular que comprende 3 Mab, un Mab que es específico de TcdA y dos anticuerpos que son específicos de TcdB. Esta mezcla demostraba muy altos niveles de protección de muerte e inflamación intestinal por una dosis oral infecciosa letal de *Clostridium difficile* en hámsteres.

20 En particular, se proporciona una composición que comprende una combinación de un anticuerpo anti-TcdA que comprende una región variable de cadena pesada con una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 49 y una región variable ligera con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 47 y dos anti-TcdB, el primero con una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 129 y una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 127, y el segundo con una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 159 y una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 157.

25 En una realización en la que la composición comprende 3 anticuerpos, tal como un anticuerpo anti-TcdA y dos anti-TcdB, los anticuerpos están a una relación de 50 %, 25 % y 25 %, respectivamente, del contenido de anticuerpo total de la misma.

En una realización, se proporciona una composición que comprende 2, 3, 4 o 5 anticuerpos específicos de TcdA y opcionalmente 1, 2, 3, 4 o 5 anticuerpos específicos de TcdB.

30 En una realización, las composiciones proporcionadas según la invención están bien definidas, por ejemplo son mezclas de anticuerpos monoclonales en lugar de simplemente composiciones policlonales derivadas de un hospedador inmunizado o inmunocompetente.

En una realización, la composición de anticuerpos tiene una CE<sub>50</sub> de 200 ng/ml o menos, por ejemplo de 150 ng/ml o menos, tal como de 100 ng/ml o menos, tal como de 0,1 a 10 ng/ml.

Ventajosamente, los anticuerpos descritos en la presente memoria tienen niveles muy altos de estabilidad biofísica y son así adecuados para inclusión en mezclas de anticuerpos.

35 En un aspecto, una formulación farmacéutica o composición según la invención comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales composiciones sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras del pH. Tales portadores posibilitan formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

- Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, p. ej. por inyección o infusión, por ejemplo por inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes.
- 5 Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.
- Una vez formulada, la composición de la invención puede administrarse directamente al sujeto. Los sujetos para tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones están adaptadas para administración a sujetos humanos.
- 10 Adecuadamente en formulaciones según la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo si el pH de la formulación es 7, entonces puede ser apropiado un pl de 8-9 o superior. Sin desear ligarse a teoría alguna, se cree que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo o fragmento permanece en solución.
- 15 En una realización, la composición o formulación de la presente divulgación comprende 1-200 mg/ml de anticuerpos, es decir, un contenido combinado de anticuerpo de 150 mg/mol o menos, tal como de 100 mg/ml o menos, en particular de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 mg/ml o menos.
- En una realización, una composición o formulación según la presente divulgación comprende 20 mg/ml de cada anticuerpo en la misma.
- 20 En una realización, se proporciona una formulación que comprende:
- 33 mg/ml o menos de un anticuerpo anti-TcdA que comprende una región variable de cadena pesada con una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 49 y una región variable ligera con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 47, y
- 25 28 mg/ml o menos de un primer anti-TcdB con una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 129 y una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 127, y
- 25 mg/ml de un segundo anti-TcdB con una región variable pesada mostrada en la SEQ ID NO: 159 y una región variable ligera mostrada en la SEQ ID NO: 157.
- En una realización, la formulación farmacéutica a un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 comprende: de 1 a 200 mg/ml de un anticuerpo según la presente divulgación, de 1 a 100 mM de un tampón, de 0,001 a 1 % de un tensioactivo,
- 30 a) de 10 a 500 mM de un estabilizante,
- b) de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad, o
- c) de 10 a 500 mM de un estabilizante y de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad.
- En una realización, la composición o formulación según la presente divulgación comprende el tampón solución salina tamponada con fosfato.
- 35 Por ejemplo, la formulación a aproximadamente pH 6 puede comprender de 1 a 50 mg/ml de anticuerpo, HCl de L-histidina 20 mM, trehalosa 240 mM y 0,02 % de polisorbato 20. Como alternativa, una formulación a aproximadamente pH 5,5 puede comprender de 1 a 50 mg/ml de anticuerpo, tampón citrato 20 mM, sacarosa 240 mM, arginina 20 mM y 0,02 % de polisorbato 20.
- 40 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante cualquier serie de vías incluyendo, pero sin limitación, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Pueden usarse también hidropulverizadores para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, en forma de soluciones o suspensiones líquidas.
- 45 Pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de inyección.
- El suministro directo de las composiciones se logrará generalmente mediante inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o suministrado al espacio intersticial de un tejido.
- 50 Las composiciones pueden administrarse también en una lesión o directamente en el tracto gastrointestinal mediante, por ejemplo, dosificación oral encapsulada para tragar, mediante un tubo nasogástrico al estómago o íleo, mediante un tubo rectal o soluciones de enema o mediante cápsula rectal. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición se va a administrar mediante una vía que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez se ha absorbido del tracto gastrointestinal.

5 Está disponible una discusión concienzuda de portadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

La presente invención proporciona también un anticuerpo o combinación de anticuerpos o una composición que comprende los mismos para tratamiento, por ejemplo para el tratamiento o la profilaxis de infección por *C. difficile* o complicaciones asociadas a la misma tales como diarrea, colitis, en particular colitis pseudomembranosa, distensión, dolor abdominal y megacolon tóxico.

La profilaxis puede conseguirse también mediante la administración de complejos preformados de antígeno de toxina inactivada (toxóide) y anticuerpo para crear una vacuna.

En una realización, los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que comprenden los mismos según la invención son adecuados para tratar la infección con las denominadas supercepas de *C. difficile*, concretamente cepas hipervirulentas tales como el ribotipo 027.

Los anticuerpos y composiciones según la presente invención son adecuados para uso en el tratamiento o la profilaxis de efectos agudos y/o crónicos de toxinas de *C. difficile* relevantes durante la infección primaria.

Los anticuerpos y composiciones según la presente invención son adecuados para uso en el tratamiento o la profilaxis de efectos agudos y/o crónicos de toxinas de *C. difficile* relevantes durante la infección secundaria o reinfección. Las directrices internacionales consagran intervalos temporales después de una infección primaria, lo que define por ello una infección secundaria (o recurrente) como distinta de una continuación de síntomas existentes a veces descrita como una recaída (29). La investigación ha mostrado que las infecciones secundarias pueden ser el resultado de la misma cepa o ribotipo que la infección primaria. En tales casos, la recurrencia en lugar de la recaída se basa en limitaciones temporales acordadas. Sin embargo, la investigación muestra claramente también que la infección secundaria puede ser también el resultado de infección por una cepa o ribotipo distinto de la infección primaria. En un estudio, un 48 % de las recurrencias de enfermedad eran el resultado de una segunda cepa distinta de la que ha causado la primera infección (30). En otro estudio, más de un 56 % de las recurrencias de enfermedad eran el resultado de una segunda cepa distinta de la que ha causado la primera infección (31).

En una realización, los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que comprenden los mismos según la invención son adecuados para uso en la prevención de daño, por ejemplo daño estructural a largo plazo, al epitelio del colon.

En una realización, los anticuerpos, combinaciones y composición son adecuados para prevenir infección por *C. difficile* incluyendo recurrencia de infección, en particular infección nosocomial.

En una realización, los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que comprenden los mismos según la invención son adecuados para reducir el riesgo de recurrencia de infección por *C. difficile*.

Ventajosamente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden administrarse profilácticamente para prevenir la infección o reinfección porque, en ausencia de la toxina de la que el anticuerpo es específico, el anticuerpo se va a eliminar simplemente del cuerpo sin causar interacciones adversas con los tejidos corporales del sujeto.

Ventajosamente, los anticuerpos de la presente divulgación parecen desencadenar una respuesta rápida tras la administración, por ejemplo al cabo de uno o dos días de la administración se provoca una eliminación rápida de la toxina diana, esto puede prevenir el daño en órganos vitales tales como pulmones, corazón y riñones. Esta es la primera vez que se ponen a disposición agentes que pueden emplearse para prevenir el daño o lesión en un paciente por las toxinas A y/o B en el estadio de infección agudo por *C. difficile*.

Por tanto, en una realización, los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que comprenden los mismos según la invención son adecuados para prevenir el daño en órganos vitales..

En una realización, el anticuerpo, combinaciones o formulaciones descritos en la presente memoria son adecuados para prevenir la muerte de un paciente infectado, si se administran en un marco temporal apropiado antes de realizar un daño irreparable las toxinas.

Los anticuerpos de la presente divulgación tienen tasas de asociación rápidas, que facilitan el efecto rápido *in vivo*.

50 En una realización, la población de pacientes es de más de 60, tal como más de 65 años de edad.

En una realización, la población de pacientes es de 5 años de edad o menos.

Los anticuerpos según la invención pueden emplearse en combinación con tratamiento antibiótico, por ejemplo metronidazol, vancomicina o fidaxomicina. Una serie de datos *in vitro* ejemplifican las propiedades de los Mab y mezclas de Mab. Se muestra que una mezcla de 3 MAb (cantidades molares del 50 % de componentes anti-TcdA y cantidades molares del 50 % de anti-TcdB) era capaz de proteger a hámsteres de una ICD letal.

- 5 En una realización, se proporciona un método de tratamiento de un paciente necesitado de ello por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se describe en la presente memoria o combinación de anticuerpos o composición que comprende los mismos, por ejemplo en el tratamiento o la profilaxis de infección por *C. difficile* o complicaciones asociadas con la misma tales como diarrea, colitis, en particular colitis pseudomembranosa, distensión, dolor abdominal y megacolon tóxico.
- 10 En una realización, el anticuerpo, combinación o formulación se administra por una vía parenteral, por ejemplo subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular. Los datos en los Ejemplos generados en hámsteres indicaban que las dosis administradas por esta vía alcanzan el intestino y son por tanto capaces de generar un efecto terapéutico.
- En una realización, el anticuerpo, combinación o formulación se administran por vía oral, por ejemplo como formulaciones recubiertas entéricas.
- 15 En una realización, se proporciona el uso de un anticuerpo, combinación o formulación como se describe en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de infección por *C. difficile*.
- En una realización, la dosis administrada está en el intervalo de 1 a 1000 mg/kg, por ejemplo de 10 a 75 mg/kg, tal como de 20 a 50 mg/kg.
- 20 En una realización, la vida media del anticuerpo o anticuerpos en ratones y hámsteres *in vivo* está en el intervalo de 6 a 8 días en animales sanos (no infectados), y por ello se espera que tengan vidas medias en seres humanos en el intervalo de 14-28 días.
- En una realización, el anticuerpo o anticuerpos se procuran en forma de solo una dosis.
- En una realización, el anticuerpo o anticuerpos se procuran en forma de una dosis semanal o bisemanal.
- 25 En una realización, el anticuerpo o anticuerpos se procuran en forma de dosis una vez al día.
- En una realización, se proporciona un complejo que comprende TcdA o un fragmento inmunogénico de la misma según la presente invención, complejo con uno o más anticuerpos anti-TcdA definidos en la presente memoria. El complejo puede emplearse como antígeno en una formulación de vacuna, por ejemplo adecuada para generar anticuerpos protectores de toxina A *in vivo* después de administración a un ser humano.
- 30 La presente divulgación proporciona también un complejo que comprende TcdB o un fragmento inmunogénico de la misma, complejo con uno o más anticuerpos anti-TcdB definidos en la presente memoria. El complejo puede emplearse como antígeno en una formulación de vacuna, por ejemplo adecuada para generar anticuerpos protectores de toxina B *in vivo* después de administración a un ser humano.
- 35 Los inmunoestimulantes de tipo Th1, que pueden formularse para producir coadyuvantes adecuados para uso en la presente invención, incluyen y no están limitados a los siguientes.
- En una realización, se proporciona un complejo que comprende TcdA o un fragmento inmunogénico de la misma según la presente invención y TcdB o un fragmento inmunogénico de la misma, en el que cada toxina o fragmento se compleja con uno o más anticuerpos específicos del mismo, en el que el complejo es adecuado para administración como formulación de vacuna.
- 40 Anticuerpo: Los complejos de antígeno son conocidos por captarse por el sistema inmunitario en un proceso mediado por el receptor de Fc (27, 28) y los complejos preformados de anticuerpo:antígeno se han usado exitosamente como vacunas en ensayos clínicos humanos (22).
- En una o más realizaciones, la formulación de vacuna comprende además un coadyuvante tal como un inmunoestimulante.
- 45 El monofosforil-lípido A, en particular monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) es un inmunoestimulante de tipo Th1 preferido para uso en la invención. El 3D-MPL es un coadyuvante bien conocido fabricado por Ribicell Immunochem, Montana. Químicamente, se suministra a menudo como una mezcla de monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Puede purificarse y prepararse mediante métodos enseñados en GB 2122204B, cuya referencia divulga también la preparación de difosforil-lípido A y variantes 3-des-O-aciladas del mismo. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (documentos US 6.005.099 y EP 0729473 B1; Hilgers et al., 1986, Int.Arch.Allergy.Immunol., 79(4): 392-6; Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1): 141-6; y EP 0 549 074 B1). Una forma preferida de 3D-MPL es la forma de una formulación de partículas que tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0,2  $\mu$ m de diámetro, y este método de fabricación se divulga en el documento EP 0689454.
- 50

Las saponinas son también inmunoestimulantes de Th1 preferidos de acuerdo con la invención. Las saponinas son coadyuvantes bien conocidos y se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pág 363-386). Por ejemplo, se describen Quil A (derivado de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y fracciones del mismo, en el documento US 5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2): 1-55; y EP 0362279 B1. Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como coadyuvantes sistémicos potentes, y se divulgan métodos para su producción en la patente de EE. UU. n° 5.057.540 y el documento EP 0362279 B1. Se describe también en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como potente coadyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe además en Kensil et al. (1991. *J. Immunology* vol 146, 431-437). Son también conocidas combinaciones de QS21 y poliisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Se describen sistemas coadyuvantes de partículas que comprenden fracciones de Quil A, tales como QS21 y QS7, en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711. Uno de tales sistemas es conocido como Iscom y puede contener una o más saponinas.

Otro inmunoestimulante preferido es un oligonucleótido inmunoestimulante que contiene dinucleótidos de CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviatura de motivos dinucleotídicos de citosina-guanosina presentes en ADN. El CpG es conocido en la materia por ser un coadyuvante cuando se administra por vías tanto sistémica como mucosa (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., *J.Immunol*, 1998, 160(2): 870-876; McCluskie y Davis, *J.Immunol.*, 1998, 161(9): 4463-6). Históricamente, se observó que la fracción de ADN de BCG podía ejercer un efecto antitumoral. En estudios adicionales, se mostró que los oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias génicas de BCG son capaces de inducir efectos inmunoestimulantes (tanto in vitro como in vivo). Los autores de estos estudios concluían que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo CG central, portaban esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación se dilucidó posteriormente en una publicación de Krieg, *Nature* 374, p546 1995. Un análisis detallado ha mostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencia, y que tales secuencias son comunes en ADN bacteriano pero raras en ADN de vertebrado. La secuencia inmunoestimulante es a menudo: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG no está metilado, pero son conocidas otras secuencias de CpG no metiladas que son inmunoestimulantes y pueden usarse en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos, está presente una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, como repeticiones de un motivo o combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de uno o más de estos oligonucleótidos que contienen secuencias inmunoestimulantes puede activar diversos subconjuntos inmunitarios, incluyendo linfocitos citotóxicos naturales (que producen interferón g y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige et al Vol 89 (N.º 8), 1977). Se ha mostrado ahora también que son inmunomoduladoras otras secuencias que contienen CpG no metilados que no tienen esta secuencia de consenso.

El CpG, cuando se formula en vacunas, se administra generalmente en solución libre junto con antígeno libre (documentos WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente con un antígeno (documento WO 98/16247), o formulado con un portador tal como un hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de hepatitis) Davis *et al. supra*; Brazolot-Millan et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.*, USA, 1998, 95(26), 15553-8).

Tales inmunoestimulantes como se describen anteriormente pueden formularse junto con portadores, tales como por ejemplo liposomas, emulsiones de aceite en agua y/o sales metálicas, incluyendo sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, puede formularse 3D-MPL con hidróxido de aluminio (documento EP 0689454) o emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210); puede formularse ventajosamente QS21 con liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739), emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210) o alúmina (documento WO 98/15287); puede formularse CpG con alúmina (Davis *et al. supra*; Brazolot-Millan *supra*) o con otros portadores catiónicos.

Se prefieren también combinaciones de inmunoestimulantes, en particular una combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de saponina (documentos WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241), más particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en el documento WO 94/00153. Como alternativa, una combinación de CpG más una saponina tal como QS21 forma también un potente coadyuvante para uso en la presente invención. Como alternativa, la saponina puede formularse en un liposoma o en un Iscom y combinarse con un oligonucleótido inmunoestimulante.

Por tanto, los sistemas coadyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil-lípido A, preferiblemente 3D-MPL, junto con una sal de aluminio.

Por tanto, en una realización el coadyuvante es una combinación de QS21 y 3D-MPL en una formulación de aceite en agua o liposómica.

Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde QS21 se inactiva en liposomas que contienen colesterol (DQ) como se divulga en el documento WO 96/33739. Esta combinación puede comprender adicionalmente un oligonucleótido inmunoestimulante.

Se describe una formulación coadyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua en el documento WO 95/17210 y es otra formulación preferida para uso en la invención.

Otra formulación preferida comprende un oligonucleótido CpG solo o junto con una sal de aluminio.

- 5 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de fabricación de una formulación de vacuna como se describe en la presente memoria, en el que el método comprende mezclar un polipéptido según la invención con un coadyuvante adecuado.

Son combinaciones coadyuvantes particularmente adecuadas para uso en las formulaciones según la invención como sigue:

- i) 3D-MPL + QS21 en un liposoma
- 10 ii) Alúmina + 3D-MPL
- iii) Alúmina + QS21 en un liposoma + 3D-MPL
- iv) Alúmina + CpG
- v) 3D-MPL + QS21 + emulsión de aceite en agua
- vi) CpG

- 15 Como se usa en la presente memoria, el término "comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva debería interpretarse como "incluye".

Las realizaciones y preferencias pueden combinarse como sea técnicamente apropiado.

La divulgación de la presente memoria describe realizaciones que comprenden ciertos enteros. La divulgación se extiende también a las mismas realizaciones consistentes o consistentes esencialmente en dichos enteros.

20 **Figuras**

- Las Fig 1-10** muestran diversas secuencias de anticuerpo y fragmento
- La Fig 11** muestra titulaciones séricas para TcdA y TcdB
- La Fig 12** muestra datos de neutralización in vitro anti TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos
- La Fig 13** muestra datos de neutralización in vitro anti TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos y pareados
- 25 **Las Fig 14-15** muestran datos de neutralización in vitro anti TcdA (ribotipo 003) para Mab pareados
- Las Fig 16-18** muestran datos de neutralización in vitro anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab
- Las Fig 19-20** muestran datos de neutralización in vitro anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de cuatro y cinco Mab
- 30 **Las Fig 21-22** muestran datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos y apareados a diferentes concentraciones de TcdA
- Las Fig -23-24** muestran datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos y mezclas de cinco a diferentes concentraciones de TcdA
- Las Fig 25-26** muestran datos de neutralización in vitro anti TcdB (ribotipo 003) para Mab únicos
- Las Fig 27-30** muestran datos de neutralización in vitro anti TcdB (ribotipo 003) para Mab pareados
- 35 **Las Fig -31-33** muestran datos de neutralización in vitro anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab
- Las Fig -34-40** muestran datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de dos Mab a diferentes concentraciones de toxina
- Las Fig 41-45** muestran datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de dos Mab a diferentes concentraciones de toxina
- 40 **Las Fig 46-59** muestran datos de neutralización de TcdB para anticuerpos únicos y pares de anticuerpos
- La Fig 60** muestra la secuencia de aminoácidos de TcdA

- La Fig 61 muestra la secuencia de aminoácidos de TcdB
- La Fig 62 muestra datos del ensayo de RETE para TcdA en formato de histograma
- La Fig 62A muestra datos del ensayo de RETE para TcdA en formato de gráfica lineal
- 5 La Fig 63 muestra una curva de Meier-Kaplan para la combinación de anticuerpos 997, 1125 y 1151, la alta concentración es 50 mg/kg y la baja concentración es 5 mg/kg. La dosis de 50 mg/kg procuró un 100 % de protección el día 11, ~82 % de protección el día 28. La dosis de 5 mg/kg daba como resultado una protección no duradera e incompleta.
- La Fig 64 muestra los cambios de peso corporal para hámsteres tratados con vancomicina y vehículo
- 10 La Fig 65 muestra el peso corporal para anticuerpos de baja dosis 5 mg/kg y anticuerpos de alta dosis 50 mg/kg
- La Fig 66 muestra fotografías de un colon donde el animal recibió tratamiento con anticuerpos según la presente divulgación frente a un control
- Las Fig -67-68 muestran los efectos de agitar con vórtex sobre la estabilidad de anticuerpos
- La Fig 69 muestra una comparación de la estabilidad de agregación para diversos anticuerpos
- 15 Las Fig 70-73 muestran la neutralización de TcdA para diversos ribotipos

## Ejemplos

### Generación de anticuerpos

20 Se adquirieron una serie de diferentes inmunógenos y reactivos de cribado o se produjeron mediante técnicas de expresión convencionales de *E. coli* para proporcionar una respuesta inmunitaria diversa y amplia y para facilitar la identificación y caracterización de anticuerpos monoclonales (listados en la Tabla 1). En casos en que se generaron proteínas o péptidos recombinantes, las secuencias estaban basadas en el ribotipo 027. La secuencia para TcdA del ribotipo 027 se da en la SEQ ID NO: 171 (número de acceso a Uniprot C9YJ37) y la secuencia para TcdB del ribotipo 027 se da en la SEQ ID NO: 172 (número de acceso a Uniprot C9YJ35).

25 Se inmunizaron ratas Sprague Dawley y conejos de una oreja caída con péptidos sintéticos cartografiados en regiones comunes tanto a toxina de longitud completa TcdA como TcdB, toxoide A inactivado con formaldehído, fragmentos de dominio de unión de toxina A (CROP1,2,3 o CROP 4,5,6) o fragmento de dominio de unión de toxina B (CROP 1,2,3,4) o, en algunos casos, una combinación de los anteriores. Después de 2 a 6 inmunizaciones, se sacrificaron los animales y se recolectaron PBMC, bazo y médula ósea. Se monitorizó en los sueros la unión a dominios de toxina A, dominios de toxina B, toxina o toxoide por ELISA. Se muestran títulos séricos de 2 de tales inmunizaciones en la Figura 30 11.

35 Se usó UCB SLAM como medio para generar anticuerpos monoclonales. Se cultivaron linfocitos B directamente de animales inmunizados (Zubler et al., 1985). Esta etapa posibilitaba muestrear un gran porcentaje del repertorio de linfocitos B. Al incorporar el método de anticuerpo linfocítico seleccionado (SLAM) (Babcook et al., 1996), era posible deconvolucionar pocillos de cultivo positivos e identificar células secretoras de anticuerpo específico de antígeno. Aquí se usó una versión modificada de SLAM (UCB SLAM (Tickle et al. 2009)) que utiliza un método basado en fluorescencia para identificar linfocitos B específicos de antígeno de pocillos de cultivo. Se configuraron los cultivos de linfocitos B y se cribó en primer lugar en los sobrenadantes su capacidad de unirse a un dominio de toxina purificado relevante (de unión, translocación o catalítico) en un ensayo basado en perlas que usa un sistema de detección celular Applied Biosystem 8200.

40 Este era un ensayo homogéneo que usa sobrenadante de cultivo de linfocitos B que contiene IgG, dominios de toxina biotinilada recubiertos sobre perlas de estreptavidina y un conjugado Fc-Cy5 de cabra anti-ratón/conejo. Se seleccionaron cultivos celulares positivos de unión a componentes de TcdA o TcdB de este ensayo para uso en ensayos funcionales basados en células para identificar neutralizadores de citotoxicidad inducida por toxina. Aproximadamente, se identificaron 12.000 positivos específicos de toxina en el cribado de unión primario de un total de 40 x experimentos placa de 50. Esto equivalía al cribado de aproximadamente 500 millones de linfocitos B. Se aislaron pares de genes de región variable pesada y ligera de células únicas recolectadas por micromanipulación de aproximadamente 100 pocillos neutralizantes de toxina después de PCR con transcripción inversa (TI). Se clonaron entonces estos genes de la región V como anticuerpos de longitud completa IgG1/kappa de ratón para regiones variables de rata y anticuerpos de longitud completa IgG/kappa de conejo para regiones variables de conejo. Se reexpresaron los anticuerpos en un sistema de expresión transitoria de HEK-293. Se volvió a probar entonces en estos anticuerpos recombinante su capacidad de neutralizar toxina en ensayos basados en células. Se cribaron también anticuerpos recombinantes por BIAcore para determinar la afinidad por un dominio de toxina dado y también para determinar la especificidad y aproximar el número de eventos de unión de anticuerpo a toxina. Basándose en la actividad in vitro en ensayos basados en células y medidas de afinidad, se seleccionaron los candidatos principales

para humanización. A menos que se afirme otra cosa, todos los datos de la presente memoria se generaron usando los anticuerpos humanizados.

Se generó un panel de fragmentos de toxina producida por *E. coli* recombinante (TcdA), toxina derivada de *C. difficile* o toxoide (A) y péptidos sintéticos (B) o se adquirieron en fuentes comerciales.

5 **Tabla 1. Reactivos relacionados con la secuencia de toxina A (TcdA) para cribado e inmunizaciones.**

Fragmento	Número de residuo	Fuente
TcdA catalítica	M1-E659	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
translocación de TcdA	K577-D1350	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>123</sub> de TcdA (TcdA123)	S1827-D2249	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>456</sub> de TcdA (TcdA456)	G2205-R2608	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>1</sub> de TcdA	S1827-N1978	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>2</sub> de TcdA	G1966-N2133	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>3</sub> de TcdA	G2100-D2249	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>4</sub> de TcdA	G2213-N2381	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>5</sub> de TcdA	G2328-N2494	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>6</sub> de TcdA	G2462-N2609	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>7</sub> de TcdA	R2554-D2701	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
TcdB catalítica	M1-A593	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
translocación de TcdB	R576-D1349	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
unión de TcdB (TcdB 1234)	S1833-E2366	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>1</sub> de TcdB	S1833-S1981	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>2</sub> de TcdB	G1968-D2113	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>3</sub> de TcdB	G2100-E2247	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
CROP <sub>4</sub> de TcdB	G2234-E2366	expresión de <i>E. coli</i> en UCB
Toxina A	Longitud completa	adquirida
Toxina B	Longitud completa	adquirida
Toxoide A	Longitud completa	adquirida

**Tabla 2. Reactivos relacionados con la secuencia de toxina B (TcdB) para cribado e inmunizaciones.**

Dominio de toxina	Secuencia de aminoácidos	
Catalítico	SPVEKNLHFVWIGGEVSD	SEQ ID NO: 173
Catalítico	NLAAASDIVRL	SEQ ID NO: 174
Catalítico	CGGVYLDVDMPLPGIH	SEQ ID NO: 175
Catalítico	CGGVYLDVDMPLPGIHSDFK	SEQ ID NO: 176
Catalítico	CWEMIKLEAIMKYK	SEQ ID NO: 177

Dominio de toxina	Secuencia de aminoácidos	
Catalítico	CTNLVIEQVKNR	SEQ ID NO: 178
Catalítico	PEARSTISLSGP	SEQ ID NO: 179
Catalítico	CSNLIVKQIENR	SEQ ID NO: 180
Catalítico	TEQEINSLWSFDQA	SEQ ID NO: 181
Catalítico	TEQEINSLWSFDPEARSTISLSGPC	SEQ ID NO: 182
Translocación	NVEETYPGKLLLC	SEQ ID NO: 183
Translocación	Acetil-CANQYEVRIINSEGR	SEQ ID NO: 184
Translocación	VNTLNAAFFIQSLIC	SEQ ID NO: 185
Translocación	YAQLFSTGLNTIC	SEQ ID NO: 186
Translocación	CAGISAGIPSLVNNEL	SEQ ID NO: 187
Translocación	DDLVISEIDFNNSIC	SEQ ID NO: 188
Translocación	MEGGSGHTVT	SEQ ID NO: 189
Translocación	AVNDTINVLPITITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL	SEQ ID NO: 190
Unión	CGFEYFAPANTDANNIEGQA	SEQ ID NO: 191
Unión	CGYKYFAPANTVNDNIYGQA	SEQ ID NO: 192
Unión	CKYYFNTNTAEA	SEQ ID NO: 193
Unión	CKYYFDEDTEAEA	SEQ ID NO: 194

### Expresión y purificación de Mab anti-toxina de *C. difficile*

5 Se combinaron plásmidos de expresión de mamífero de cadena ligera y cadena pesada separados en relaciones equimolares y se usaron para transfectar células HEK-293 o CHO-S. Para estudios de expresión a pequeña escala, se usaron lipofectamina y células HEK-293, mientras que para la producción de lotes mayores se prefirió electroporación en CHO-S.

Se cargaron los sobrenadantes de cultivo en una columna MabSelect SuRe (en PBS a pH 7,4). Se eluyó el anticuerpo con 100 % de citrato de sodio 0,1 M, tampón a pH 3,4. Se neutralizaron las muestras a pH 7,4 con Tris-Cl a pH 8,0. Se retiró el agregado por columna de filtración de gel Superdex 200 en PBS a pH 7,4.

### 10 Tabla 3.

Anticuerpo	Tipo celular	Volumen de SN (L)	Tipo de expresión	Cantidad purificada (mg)
CA164_00997.g1_P3	CHO	10	Transitoria	755,93
CA164_00922.g1_P3	CHO	0,5	Transitoria	129,36
CA164_01125.g2_P3	CHO	10	Transitoria	498,96
CA164_01151.g4_P3	CHO	5	Transitoria	262,43

### Ejemplo 1 Neutralización in vitro de la actividad de TcdA por Mab purificados

15 Todos los ensayos de cribado de neutralización se ejecutaron en placas de poliestireno de 96 pocillos. El ensayo usa células CACO-2 crecidas y cribadas en MEM + 20 % de FCS, Q 2 mM y NEAA. Cualquier combinación de anticuerpos está a relaciones molares iguales a menos que se afirme otra cosa. **Día 1:** Se sembraron las células a 3000 por pocillo

5 en 50  $\mu$ l de medio y se incubaron durante 24 horas; **Día 2:** Se añadieron muestras purificadas de Mab humanizados a placas estériles de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos; Se adiciona a las placas de PP toxina A a una concentración suficiente para generar la dosis letal apropiada, concretamente DL<sub>80</sub> o superior y se incuba durante 1 h a 37 °C; Se añaden 50  $\mu$ l de esta mezcla a placas celulares y se incuba durante 96 horas; **Día 5:** Se añade azul de metileno (0,5 % de azul de metileno, 50 % de etanol); Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente; Se lisan las células con N-laurilsarcosina al 1 % y se leen en el lector de placas BIOTEK Synergy2 a 405 nm. Se muestran los resultados en las Fig. 12 a 24. La CE<sub>50</sub> y el % máximo de neutralización de la actividad de TcdA mostrados confirman que los anticuerpos seleccionados tienen muy altas potencias como agentes únicos. Las combinaciones de 2 a 5 de estos no mejoraban los mejores CE<sub>50</sub> o % máximo de neutralización. La falta de sinergia cuando se combinan los Mab CA922, 923, 995, 997 y 1000 es una observación importante y puede ser debido al hecho de que cada anticuerpo solo tiene niveles excepcionalmente altos de afinidad y potencia. Los datos de apoyo del Ejemplo 5 muestran también que algunos de los Mab (p. ej. CA997) son capaces de unirse a subdominios de TcdA muchas veces. Por ello, parece probable que estos 5 Mab representen la máxima afinidad, potencia y valencia conseguibles cuando se orienta al dominio de unión celular C-terminal de TcdA. Los anticuerpos eran también eficaces en la neutralización de concentraciones muy altas de toxina que oscilan de DL<sub>80</sub> a más de DL<sub>95</sub> (DL<sub>máx</sub>) pero se observaron aumentos más modestos de CE<sub>50</sub> (concretamente disminuciones de potencia) con niveles muy altos de [TcdA]. Estos datos son también sorprendentes puesto que otros han mostrado reducciones sustanciales de potencia cuando se ensayan concentraciones elevadas de TcdA (20).

20 La alta potencia y afinidad de los Mab descritos aquí, p. ej. para CA997; no es debida solamente a su alta valencia de unión. Otros (20 y documento WO06/071877) describen Mab anti-TcdA capaces de unirse hasta 14 veces. Estos Mab tenían solo afinidades en el intervalo de 0,3 a 100 nM y mostraban una protección incompleta contra la destrucción celular mediada por TcdA, solos (26-63 % de protección) o en pares (31-73 % de protección). Por ello, se ha demostrado que la alta valencia de unión a TcdA no provoca necesariamente una alta afinidad de unión o neutralización de TcdA. No se describieron las afinidades ni valencias de unión a TcdA para el Mab CDA-1 (18 y documento US7625559). Por tanto, los Mab descritos en la presente memoria tienen unas sorprendentes afinidades, potencias y valencias.

**Tabla 4 Combinaciones de Mab anti-TcdA 1, 2 y 3 a una única conc. de TcdA (DL<sub>80</sub>)**

Anticuerpo	Conc. de Mab final (máxima) ng/ml	CE <sub>50</sub> (ng/ml)
922	500	1,21
923	500	160,42
995	500	37,64
997	500	6,25
1000	500	19,73
922+923	500	3,58
922+925	500	3,326
922+997	500	2,88
922+1000	500	2,64
923+995	500	60,23
923+997	500	7,54
923+1000	500	9,24
995+997	500	7,29
995+1000	500	19,63
997+1000	500	4,46
922+923+995	500	4,72
922+923+997	500	3,23
922+923+1000	500	3,21

ES 2 729 278 T3

Anticuerpo	Conc. de Mab final (máxima) ng/ml	CE <sub>50</sub> (ng/ml)
922+995+997	500	2,22
922+995+1000	500	2,85
922+997+1000	500	2,22
923+995+997	500	5,04
923+995+1000	500	9,49
995+997+1000	500	5,84
922+923+995+997	500	2,75
922+923+995+1000	500	3,75
922+995+997+1000	500	3,46
923+995+997+1000	500	4,81
922+923+997+1000	500	3,06
922+923+995+997+1000	500	4,72

**Tabla 5 Combinaciones de Mab anti-TcdA únicos, pareados y tripletes a diversas concentraciones de TcdA, donde TcdA está a su DL<sub>80</sub>, DL<sub>90</sub>, DL<sub>95</sub> y DL<sub>máx.</sub>**

Toxina TcdA	Muestra	Conc. de MAb final ng/ml	CE <sub>50</sub> (ng/ml)
a 3000 pg/ml (DL <sub>MÁX</sub> )	922	500	4,89
	997	500	10,99
	1000	500	50,17
	922+997	500	7,18
	922+1000	500	6,99
	997+1000	500	9,437
	922+997+1000	500	10,80
	922+997+1000+995	500	15,03
	922+997+1000+995+923	500	7,16
a 1000 pg/ml (DL <sub>95</sub> )	922	500	1,24
	997	500	3,42
	1000	500	9,60
	922+997	500	1,85
	922+1000	500	2,51
	997+1000	500	3,61
	922+997+1000	500	2,40
	922+997+1000+995	500	2,74
	922+997+1000+995+923	500	2,38

Toxina TcdA	Muestra	Conc. de MAb final ng/ml	CE <sub>50</sub> (ng/ml)
a 700 pg/ml (DL <sub>90</sub> )	922	500	0,84
	997	500	2,40
	1000	500	6,23
	922+997	500	1,19
	922+1000	500	1,33
	997+1000	500	2,68
	922+997+1000	500	1,84
	922+997+1000+995	500	2,17
	922+997+1000+995+923	500	2,06
a 350 pg/ml (DL <sub>80</sub> )	922	500	0,39
	997	500	1,18
	1000	500	2,76
	922+997	500	0,67
	922+1000	500	0,85
	997+1000	500	2,06
	922+997+1000	500	0,83
	922+997+1000+995	500	0,97
	922+997+1000+995+923	500	0,98

**Ejemplo 2 Neutralización *in-vitro* anti-TcdB por Mab purificados.**

**Descripción de los métodos de ensayo:**

Todos los ensayos de cribado de neutralización se ejecutaron en placas de poliestireno de 96 pocillos.

- 5 El ensayo usa células CACO-2 crecidas y cribadas en MEM + 20 % de FCS, Q 2 mM y NEAA. A menos que se afirme otra cosa, todas las combinaciones de Ab están a relaciones iguales.
- Día 1: Se siembran las células a 3000 por pocillo en 50 µl de medio y se incuban durante 24 horas;
  - Día 2: Se añadieron muestras purificadas de Mab humanizados a placas estériles de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos;
- 10
- Se adiciona a placas de PP el lote nº 031 de toxina B y se incuba durante 1 h a 37 °C
  - Se añaden 50 µl de esta mezcla a placas celulares
  - Se incuba durante 96 h
  - Día 5: Se añade azul de metileno (0,5 % de azul de metileno, 50 % de etanol)
  - Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente
- 15
- Se lisan las células con N-laurilsarcosina al 1 %
  - Se lee en el lector de placas BIOTEK Synergy2 a 405 nm

## ES 2 729 278 T3

Los datos en las Figuras 25 a 33 muestran que los Mab solos eran relativamente ineficaces para neutralizar TcdB, tanto en términos de % máximo de neutralización como de actividad (CE<sub>50</sub>). Sin embargo, cuando los anticuerpos se combinaron en dúos y tríos se observaron mejoras considerables del % máximo de neutralización y la actividad (CE<sub>50</sub>). 1125 y 1151 se seleccionaron como el mejor apareamiento, aunque se observaron otros buenos apareamientos: 1125+1153, 1125+1134

Los pares más eficaces de Mab se seleccionaron empíricamente y se encontró retrospectivamente que elaboraban combinaciones inesperadas y sorprendentes con respecto a las potencias individuales de cada Mab. Por ejemplo, en la Tabla 6 solo CA927 tenía un potencial de neutralización de TcdB que podía dar como resultado una CE<sub>50</sub> definida, mientras que el potencial de neutralización de TcdB de ambos CA1125 y CA1151 era insuficiente en estas condiciones de ensayo para dar como resultado una CE<sub>50</sub> definida. Sin embargo, se encontró que CA927 no era el Mab más eficaz para usar en una combinación. La mejor combinación que contiene CA927 tenía una CE<sub>50</sub> de 13,5 ng/ml, mientras que otras dos combinaciones de Mab tenían CE<sub>50</sub> tan bajas como 2,59 y 4,71 ng/ml. En otro ejemplo, en la Tabla 8 CA1099 tenía la CE<sub>50</sub> de neutralización de TcdB menor en las condiciones de ensayo usadas. Sin embargo, se encontró que CA1099 no era el Mab más eficaz para usar en una combinación. La mejor combinación que contiene CA1099 tenía una CE<sub>50</sub> de 6 ng/ml, mientras que otras dos combinaciones de Mab tenían CE<sub>50</sub> tan bajas como 2 y 1 ng/ml. Podría especularse que los apareamientos más eficaces de Mab se definen por sus modalidades de unión cooperativa, especialmente como se definen por tener epítomos no superpuestos.

**Tabla 6** Combinaciones de Mab anti-TcdB y relaciones de Mab relativas a concentración de toxina constante.

Muestra	Conc. de Mab final ng/ml	CE <sub>50</sub> (ng/ml)
1125.g2	1000	>1000
1134.g5	1000	>1000
927.g2	1000	12,89
1153.g8	1000	>1000
1102.g4	1000	>1000
927+1099	1000	>1000
927+1102	1000	>1000
927+1114	1000	>111,111
927+1125	1000	13,55
927+1134	1000	51,58
1099+1114	1000	>1000
1102+1114	1000	>333,333
1102+1125	1000	15,51
1114+1134	1000	19,70
1114+1151	1000	25,69
1114+1153	1000	27,48
1125+1134	1000	2,59
1125+1151	1000	4,71
1125+1153	1000	21,23
1125+1134+1114	1000	3,77
1125+1134+927	1000	2,63
1125+1151+1114	1000	4,90

Muestra	Conc. de Mab final ng/ml	CE <sub>50</sub> (ng/ml)
1125+1151+927	1000	5,69
1125.g2+1134.g5+927.g2	1000	5,83
1125.g2+1134.g5+1153.g2	1000	9,89
1125.g2+1134.g5+1102.g2	1000	2,72

### Ejemplo 3 Neutralización de TcdB por combinaciones de Mab purificados.

Todos los ensayos de cribado de neutralización se ejecutaron en placas de poliestireno de 96 pocillos.

El ensayo usa células CACO-2 crecidas y cribadas en MEM + 20 % de FCS, Q 2 mM y NEAA.

- 5
- Día 1: Se siembran las células a 3000 por pocillo en 50 µl de medio y se incuban durante 24 horas;
  - Día 2: Se añadieron muestras purificadas de Mab humanizados a placas estériles de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos;
  - Se adiciona a placas de PP toxina B (VPI 10463) y se incuba durante 1 h a 37 °C
  - Se añaden 50 µl de esta mezcla a placas celulares
- 10
- Se incuba durante 72 h
  - Día 5: Se añade azul de metileno (0,5 % de azul de metileno, 50 % de EtOH)
  - Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente
  - Se lisan las células con N-laurilsarcosina al 1 %
  - Se lee en el lector de placas BIOTEK Synergy2 a 405 nm
- 15
- Se muestran los resultados en las Figuras 34 a 45.

Estos datos muestran que el mejor par de Mab para neutralización de TcdB en un intervalo de concentraciones de toxina era CA1125 y CA1151. Además, la combinación 1125+1151 no estaba afectada en gran medida por los cambios en las relaciones molares relativas en contraposición con 1125+1153.

**Tabla 7** Combinaciones de Mab anti-TcdB y relaciones de Mab relativas a 3 conc. de toxina diferentes.

Combinación de anticuerpos	Valores de CE50 (ng/ml)		
	DL60 de TcdB	DL77 de TcdB	DL85 de TcdB
1125.g2 + 927.g2 (50:50)	2,8	6	11,3
1125.g2 + 1102.g4 (50:50)	4	13	44
1125.g2 + 1114.g8 (50:50)	3,5	7,1	25,4
1125.g2 + 1134.g5 (50:50)	0,48	1,4	4
1125.g2 + 1151.g4 (50:50)	0,85	0,85	1,5
1125.g2 + 1153.g8 (50:50)	2,7	5,2	25,2
1125.g2 + 1134.g5 (25:75)	<0,15	0,84	7,2
1125.g2 + 1151.g4 (25:75)	0,73	1	2,1
1125.g2 + 1153.g8 (25:75)	7	10	27
1125.g2 + 1134.g5 (75:25)	0,66	1,2	2,5

Combinación de anticuerpos	Valores de CE50 (ng/ml)		
	DL60 de TcdB	DL77 de TcdB	DL85 de TcdB
1125.g2 + 1151.g4 (75:25)	1,4	1,2	8,3
1125.g2 + 1153.g8 (75:25)	2,9	7,5	30

- Los datos muestran que incluso las combinaciones pareadas específicas más activas tienen propiedades sorprendentemente diferentes y no previsible respecto a cada uno. La CE<sub>50</sub> de la combinación preferida de CA1125 y CA1151 a relaciones equimolares no está afectada en gran medida por una [TcdB] creciente. Las tres relaciones molares relativas de los Mab probados (concretamente 25:75 frente a 50:50 frente a 75:25) tienen CE<sub>50</sub> muy similares entre sí, sugiriendo que CA1125 y CA1151 tienen modos de acción especialmente complementarios. Esto está en contraposición con la combinación de CA1125 con CA1134, donde el aumento de CE<sub>50</sub> (concretamente la reducción de potencia) a mayor [TcdB] es más sustancial y donde las tres relaciones molares de Mab no son igualmente eficaces: La relación de CA1125:CA1134 de 25:75 es notablemente menos potente que 50:50 y 75:25.
- 5 Esto sugiere que la potencia combinada de CA1125+CA1134 es más dependiente del componente CA1125. La CE50 de las tres combinaciones molares de CA1125 y CA1153 está afectada sustancialmente por la [TcdB] creciente, sugiriendo que CA1153 es un asociado menos adecuado para combinación con CA1125. *En conjunto*, estos datos muestran que CA1125 y CA1151 son una combinación particularmente favorable, puesto que se mantiene la máxima potencia en un intervalo de relaciones molares de Mab y TcdB.
- 10
- 15 **Tabla 8 Neutralización de TcdB - 1 o 2 Mab anti-TcdB a una dosis de toxina constante (DL<sub>80</sub>).**

Anticuerpo	CI50 (ng/ml)
1099	2
1102	N/A
1114	103
1125	N/A
1134	8
1151	182
1153	260
926	N/A
927	N/A
1099 + 1125	6
1114 + 1125	7
1151 + 1125	2
1134 + 1125	1
1102 + 1125	6
1125 + 1153	12
926 + 1125	42
927 + 1125	4

Tabla 9 Neutralización de TcdB - 1 o 2 Mab anti-TcdB a diversas dosis de TcdB.

Combinación de anticuerpos	Valores de CE50 (ng/ml)			Neutralización máxima		
	DL75 TcdB	DL86 TcdB	DL90 TcdB	DL75 TcdB	DL86 TcdB	DL90 TcdB
1125.g2	N/A	N/A	N/A	40 %	25 %	15 %
1114.g8	N/A	N/A	N/A	45 %	25 %	15 %
1134.g5	N/A	N/A	N/A	45 %	25 %	15 %
1151.g4	N/A	N/A	N/A	45 %	25 %	20 %
1153.g8	28,3	N/A	N/A	65 %	35 %	28 %
1125.g2 + 1114.g8 (50:50)	10,1	243,8	N/A	85 %	65 %	40 %
1125.g2 + 1134.g5 (50:50)	1,7	22,6	N/A	87 %	60 %	40 %
1125.g2 + 1153.g8 (50:50)	6,1	32,2	N/A	95 %	75 %	48 %
1125.g2 + 1151.g4 (50:50)	0,8	2,8	19,1	85 %	80 %	55 %
1125.g2 + 1151.g4 (25:75)	1,2	2,8	47,2	85 %	75 %	60 %
1125.g2 + 1151.g4 (75:25)	2,9	3,8	2,6	75 %	70 %	60 %

Estos datos muestran que la combinación de Mab, especialmente CA1125 y CA1151, mejora tanto la potencia medida por CE<sub>50</sub>, como también medida por % de protección máxima. El % de protección máxima es de particular relevancia en este método de ensayo puesto que la mezcla de Mab:TcdB se incubó en células durante largo tiempo (72 h). Puesto que TcdB es tóxica para células Caco-2 en el intervalo de pg/ml en 2-4 h, esta medida puede considerarse que es una prueba muy difícil de la capacidad de neutralización de Mab, y puede reflejar la capacidad de la mezcla de Mab con respecto a su cinética o modalidades de unión. A su vez, esto puede reflejar la capacidad de mezclas de Mab de proteger frente a los efectos de TcdB durante una infección establecida cuando puede haber cantidades sustanciales de TcdB en tejidos durante muchas horas.

Se ilustran adicionalmente datos seleccionados de las Tablas 6-9 en las Figuras 46-59.

#### Ejemplo 4 Valencia de unión de Mab a subdominios de TcdB.

Se determinó el número de moles de eventos de unión de anticuerpos anti-TcdB de *C. difficile* a TcdB<sub>1234</sub> por resonancia de plasmón de superficie (SPR) en un Biacore 3000 (GE Healthcare). Se inmovilizó estreptavidina sobre un chip sensor CM5 (GE Healthcare) a un nivel de ~4000 UR mediante acoplamiento amina y se unió TcdB<sub>1234</sub> biotinilado a 500-600 UR. Se inyectaron dos inyecciones de 20 µl de las mismas mezclas de anticuerpos anti-TcdB (la concentración final de cada anticuerpo era 500 nM) sobre esta superficie a 10 µl/min y se registró la respuesta de unión saturante. Se regeneró la superficie después de cada ciclo usando HCl. Se corrigieron todos los datos con la unión de fondo usando la respuesta a la celda de flujo de referencia de solo estreptavidina.

Tabla 10. Análisis de resonancia de plasmón de superficie del número de sitios de unión a IgG en TcdB<sub>1234</sub>

Combinación de anticuerpos	N.º de repeticiones del ciclo de unión	Respuesta de unión (UR)	Unión respecto a la respuesta media de CA927
CA1125.g2	10	750	0,9
CA1151.g4	10	1232	1,6
CA1125_CA1151	4	1941	2,5
CA1125_CA927	3	1570	2,0
CA1151_CA927	3	1959	2,5
CA927	8	791	1,0

Todas las respuestas se han expresado respecto a una respuesta media de CA927 múltiple (columna final de la tabla 10), puesto que CA927 parece ser representativo de un Mab que se une a TcdB<sub>1234</sub> solo una vez.

5 El CA1125 inmovilizado, cuando se une a TcdB<sub>1234</sub>, no permite a CA1125 unirse adicionalmente, apoyando la idea de que CA1125 tiene un sitio de unión en TcdB<sub>1234</sub> y que, después de que este se satura, no puede encontrarse ningún otro sitio de unión para CA1125. Sin embargo, cuando TcdB<sub>1234</sub> se ha saturado con CA1125, puede seguir uniéndose CA1151. Esto demuestra que CA1151 se une a sitios alternativos al ocupado por CA1125. En conjunto, estos datos muestran que CA1125 es un agente de unión único a TcdB<sub>1234</sub>, mientras que 1151 IgG se une a TcdB<sub>1234</sub> más de una vez, lo más probablemente dos veces. Por ello, una mezcla de CA1125 y CA1151 puede unirse a TcdB<sub>1234</sub> aproximadamente 3 veces.

Todas las combinaciones de anticuerpos tienen una respuesta de unión aditiva que muestra que hay 2 o más sitios no competitivos en TcdB<sub>1234</sub> unidos por estas combinaciones.

**Ejemplo 5 Valencia de unión de Mab a subdominios de TcdA.**

15 Se determinó el número de moles de eventos de unión de anticuerpos anti-TcdA de *C. difficile* a TcdA<sub>1234</sub> y A<sub>456</sub> por resonancia de plasmón de superficie (SPR) en un Biacore 3000 (GE Healthcare). Se inmovilizó estreptavidina en un chip sensor CM5 (GE Healthcare) mediante acoplamiento de amina a un nivel de ~4000 UR, se unió TcdA<sub>123</sub> biotinilado a una celda de flujo y se unió TcdA<sub>456</sub> a una celda de flujo diferente a una respuesta de ~500 UR. Se inyectaron dos inyecciones de 30 µl del mismo anticuerpo anti-TcdA a 1 µM en ambas celdas de flujo a 10 µl/min y se registró la respuesta de unión saturante.

20 Se regeneró la superficie después de cada ciclo usando HCl. Se corrigieron todos los datos con la unión de fondo usando la respuesta a la celda de flujo de referencia de solo estreptavidina.

**Tabla 11. Análisis SPR de las respuestas de unión de IgG a TcdA<sub>123</sub> y TcdA<sub>456</sub> inmovilizados**

	CA997	CA1000	relación de CA997/CA1000
TcdA <sub>123</sub>	1069	166	6
TcdA <sub>456</sub>	1285	407	3

25 Los anticuerpos CA997 y CA1000 se unen a TcdA<sub>123</sub> a una relación de seis CA997 a un CA1000, mientras que se unen a TcdA<sub>456</sub> a una relación de tres CA997 a un CA1000 (Tabla 2).

La respuesta máxima de anticuerpo para CA997, corregida para el peso molecular y el nivel de toxina inmovilizada, es similar para TcdA<sub>123</sub> y TcdA<sub>456</sub>. Esto sugiere que CA997 se une a TcdA<sub>456</sub> seis veces y CA1000 se une a TcdA<sub>456</sub> dos veces. Por ello, el anticuerpo CA997 se une probablemente a la toxina entera TcdA (TcdA) aproximadamente 12 veces.

30 Globalmente, CA997 se une seis veces o más a A<sub>123</sub> y seis veces o más a A<sub>456</sub>, mientras que CA1000 se une al menos una vez a A<sub>123</sub> y dos veces a A<sub>456</sub>.

35 La valencia de unión a TcdA y TcdB aumentada puede tener dos efectos importantes *in vivo*. El primero es que cualquier Mab o mezcla de Mab que sea capaz de unirse a TcdB más de una vez tendrá un potencial aumentado de formar eventos de unión intertoxina y por ello inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación puede contribuir a la potencia al reducir la solubilidad de la toxina y formar complejos macromoleculares muy grandes que pueden reducir por ello la concentración de trabajo eficaz de toxina. Tales complejos grandes de proteína pueden captarse por macrófagos y monocitos residentes en el tejido y pueden contribuir a una respuesta inmunitaria del hospedador aumentada. Se ha mostrado específicamente que los complejos de antígeno-anticuerpo que portan fragmentos Fc son capaces de cebar una respuesta inmunitaria del hospedador frente a un patógeno intestinal (21). También se han usado complejos de antígeno-anticuerpo solubles exitosamente como vacuna dirigida contra el antígeno en ensayos clínicos humanos (22). Además, la decoración inmunitaria de la toxina con IgG portador de Fc puede contribuir a la inmunoeliminación usando mecanismos normales a través de hígado y bazo. En general, los niveles mayores de decoración de Fc del antígeno conducen a niveles más rápidos y más completos de eliminación (23). De forma crítica, puede ser que la presencia de 2 o más dominios Fc de Mab por toxina, especialmente 3 dominios Fc por toxina, puedan representar un número crítico de Fc requeridos para una eliminación muy rápida y sustancial de toxina (24).  
 45 El Mab anti-TcdA CA997 es probablemente capaz de unirse a TcdA hasta 12 veces y la combinación de CA1125 y CA1151 es probablemente capaz de unirse a TcdB 3 veces. Por ello, la mezcla de 3 Mab es muy probable que sea capaz de proporcionar estas clases de mecanismos de potencia adicionales *in vivo*.

**Ejemplo 6 Neutralización por Mab de la pérdida de RETE causada por TcdA.**

Se realiza el ensayo de integridad de monocapa de *C. difficile* usando el sistema de placa Becton-Dickinson (BD) Caco-2 BioCoat HTS.

5 **Día 1** - Se siembran células Caco-2 a  $2 \times 10^5$ /ml por pocillo del inserto de placa en 500  $\mu$ l de medio de siembra basal (proporcionado por BD). Se añaden 35 ml de medio de siembra basal a la bandeja de alimentación. Se incuban las células durante 24 horas a 37 °C. **Día 2** - Se retira el medio de siembra basal de los insertos y la bandeja de alimentación y se reemplaza por medio de diferenciación Entero-STIM (suministrado por BD). Se añaden 500  $\mu$ l por inserto de pocillo y 35 ml a la bandeja de alimentación. Se incuban las células durante 72 h adicionales a 37 °C. **Día 5**  
 10 - Se preparan anticuerpos a una concentración 2x respecto a la usada en el pocillo de ensayo en una placa de polipropileno y toxina A. Se añade toxina A a los anticuerpos a una concentración de 125 ng/ml y se incuba la placa durante 1 h a 37 °C. Se añade 1 ml de medio de crecimiento de Caco-2 (MEM + 20 % de FCS, Q 2 mM, NEAA) a cada pocillo de una placa de TC de 24 pocillos estándar. Se transfiere la placa de inserto BioCoat a la placa de TC de 24 pocillos. Se retira medio Entero-STIM de los insertos y se reemplaza por 400  $\mu$ l de mezcla de toxina:Ab.

15 La pérdida de uniones estrechas entre células intestinales es el efecto temprano clave de TcdA sobre monocapas celulares y secciones de tejido intestinal y es la causa primaria de diarrea. La albúmina y otras seroproteínas se pierden en el lumen intestinal junto con el fluido sérico acompañante. La pérdida de resistencia eléctrica transepitelial en células cultivadas diferencialmente que han formado una monocapa es un sustituto útil para la protección frente a los efectos agudos de TcdA. Tres anticuerpos mostrados tienen buenos niveles de protección frente a la pérdida de RETE, Figura 62. Es destacable y sorprendente que las capacidades de estos Mab en ensayos de RETE no reflejan las observadas  
 20 en neutralización de toxina medida en un ensayo de proliferación celular. CA922 tiene el mejor desempeño en un ensayo de proliferación celular ( $CE_{50} = 1,21$  ng/ml) y sin embargo está considerablemente superado en el ensayo de RETE por un anticuerpo (CA1000) que tiene > 10x menos potencia en un ensayo de proliferación celular ( $CE_{50} = 19,73$  ng/ml). CA997 tenía el mejor desempeño en el ensayo de RETE, puesto que tenía tanto altos niveles de protección como mantenía estos a las menores conc. de Mab. CA997 tenía un potencial sustancial de neutralizar la pérdida de  
 25 RETE con una inhibición máxima cercana al 80 % y una  $CE_{50}$  de aproximadamente 80 ng/ml a las 4 h. Estas observaciones son inesperadas, puesto que los Mab en cuestión tenían todas altas afinidades por dominios de TcdA (CA922 ~4 pM, CA997 ~132 pM, CA1000 ~73 pM). Estos datos sugieren que CA997 y CA1000 reconocen epítomos importantes en la pérdida de RETE o neutralizan TcdA por mecanismos diferentes a otros Mab. Además, puesto que se estima que CA1000 se une a holotoxina dos veces (una vez en TcdA<sub>123</sub> y una vez en TcdA<sub>456</sub>), CA1000 puede definir epítomos "críticos de RETE" en las regiones de unión celular a TcdA que podrían tener un valor particular para definir inmunógenos de vacuna. Los resultados se muestran en las Figuras 62.

**Ejemplo 7 Afinidad de anticuerpos anti-toxina de *C. difficile* para subdominios de TcdA y TcdB: TcdA<sub>123</sub>, TcdA<sub>456</sub> y TcdB<sub>1234</sub>.**

35 Se determinaron las constantes cinéticas para las interacciones de anticuerpos anti-TcdA y TcdB de *C. difficile* por resonancia de plasmón de superficie realizados en un BIAcore 3000 usando chips sensores CM5.

Se realizaron todos los experimentos a 25 °C. Se inmovilizó un fragmento Affinipure F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra anti-humano, específico de fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch) en un chip sensor CM5 (GE) mediante química de acoplamiento amina a un nivel de captura de  $\approx 7000$  unidades de respuestas (UR). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005 % de tensioactivo P20, Biacore AB) como tampón de migración con  
 40 un caudal de 10  $\mu$ l/min. Se usó una inyección de 10  $\mu$ l de cada anticuerpo a 1  $\mu$ g/ml o menor para captura por el Fc de IgG inmovilizado anti-humano. Se titularon TcdA<sub>123</sub>, TcdA<sub>456</sub> o TcdB<sub>1234</sub> frente a anticuerpos purificados capturados a diluciones de duplicación desde 12,5 nM a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Para anticuerpos presentes en sobrenadantes de cultivo, se pasó una única concentración de 12,5 nM de TcdA<sub>123</sub> o TcdA<sub>456</sub> y 50 nM de TcdB<sub>1234</sub> por los anticuerpos a 30  $\mu$ l/min. Se calcularon las cinéticas en n= 2. Se regeneró la superficie a un caudal de 10  $\mu$ l/min  
 45 por dos inyecciones de 10  $\mu$ l de HCl 40 mM y una inyección de 5  $\mu$ l de NaOH 5 mM..

Se analizaron las curvas de unión con fondo restado referenciadas dobles usando el software BIAevaluation (versión 3.2) siguiendo procedimientos estándares. Se determinaron los parámetros cinéticos a partir del algoritmo de ajuste.

**Tabla 12 Afinidades y cinéticas de unión de Mab anti-TcdA**

	ID de anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)	Material/Ensayo
TcdA123	CA164_00922.g1	1,09E+06	4,43E-06	4,06E-12	4,06	Titulación de 5 puntos de Mab purificado
	CA164_00923.g1	5,36E+05	3,47E-05	6,47E-11	64,7	
	CA164_00995.g1	Sin unión			Sin unión	
	CA164_00997.g1	7,84E+05	1,03E-04	1,32E-10	132	

	ID de anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)	Material/Ensayo
	CA164_01000.g1	1,33E+05	9,78E-06	7,33E-11	73,3	
	CA164_00993.g1	9,00E+05	5,00E-06	5,56E-12	5,56	Titulación de 1 punto de sobrenadante 2x
TcdA456	CA164_00922.g1	1,29E+06	3,33E-06	2,59E-12	2,59	Titulación de 5 puntos de Mab purificado
	CA164_00923.g1	6,16E+05	1,92E-04	3,12E-10	312	
	CA164_00995.g1	2,87E+05	3,42E-05	1,19E-10	119	
	CA164_00997.g1	9,21E+05	6,15E-05	6,68E-11	66,8	
	CA164_01000.g1	3,55E+05	2,98E-05	8,41E-11	84,1	
	CA164_00993.g1	1,25E+06	5,00E-06	4,00E-12	4,00	Titulación de 1 punto de sobrenadante 2x

**Tabla 13 Afinidades de Mab anti-TcdB y cinética de unión**

	ID de anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)	Material/ensayo
TcdB1234	CA164_1125.g2	2,64E+05	3,23E-05	1,22E-10	122	Titulación de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1151.g4	7,49E+05	4,13E-04	5,51E-10	551	Titulación de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_926.g1	1,38E+05	7,12E-05	5,16E-10	516	Titulación de 1 punto de sobrenadante 2x
	CA164_927.g2	3,97E+05	3,61E-05	9,11E-11	91	Titulación de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1099.g2	5,24E+05	1,63E-05	3,10E-11	31	Titulación de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1102.g4	1,17E+05	3,78E-04	3,25E-09	3250	Titulación de 1 punto de sobrenadante 2x
	CA164_1114.g2	2,87E+05	1,97E-05	6,87E-09	6870	Titulación de 1 punto de sobrenadante 2x
	CA164_1114.g8	2,55E+05	1,85E-03	7,25E-09	7250	Titulación de 1 punto de sobrenadante 2x
	CA164_1129.g1	1,89E+05	2,30E-04	1,22E-09	1220	Titulación de 1 punto de sobrenadante 2x
	CA164_1134.g5	5,09E+05	2,45E-05	4,81E-11	48	Titulación de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1153.g8	1,43E+05	4,48E-05	3,14E-10	314	Titulación de 3 puntos de Mab purificado

- Las afinidades anti-TcdA son particularmente altas en comparación con las afinidades publicadas de otros Mab. Se demuestra que son conseguibles afinidades tan bajas como 4 pM. El CA997 preferido tiene una afinidad de 132 pM, CA1125 de 122 pM y CA115 de 551 pM. CA995 muestra claramente que no se une a CROP A<sub>123</sub> y por ello demuestra que los Mab mostrados aquí tienen propiedades que son diferentes entre sí de formas sorprendentes e inesperadas.
- 5 CA922, 923, 997 y 1000 se unen al menos una vez a CROP A123 y A456. Por ello, estos 4 Mab confirman que cada uno debe unirse a holotoxina al menos dos veces. No se han podido derivar afinidades para la unión de estos Mab a holotoxina debido a limitaciones técnicas. Sin embargo, dado las altas afinidades y valencias demostradas para los Mab anti-TcdA, es posible especular que las afinidades funcionales contra holotoxina pueden ser incluso más fuertes que las ilustradas para unión a subdominios de toxina.
- 10 Los Mab anti-TcdB demostraban también fuertes afinidades que alcanzaban tan bajo como 31 pM. En particular, CA1125, 1151, 927, 1099, 1134 y 1153 muestran afinidades que sobrepasan las demostradas por otros.

#### **Ejemplo 8 Caracterización biofísica de moléculas de IgG1 humanizadas anti-toxina de *C. difficile*. Moléculas analizadas**

##### **IgG1 anti-TcdA:**

- 15 CA164\_00922.g1  
CA164\_0923.g1  
CA164\_0995.g1  
CA164\_0997.g1  
CA164\_01000.g1

##### **IgG1 anti-TcdB**

- 20 CA164\_01125.g1  
CA164\_01125.g1  
CA164\_01134.g4  
CA164\_01134.g5  
25 CA164\_01134.g6  
CA164\_01102.g1  
CA164\_01102.g4  
CA164\_01151.g4

- 30 Las combinaciones de anticuerpos tienen que estar compuestas por Mab que tienen altos niveles de estabilidad para mitigar los riesgos potenciales de agregación durante el almacenamiento a largo plazo. Se usa la estabilidad térmica (T<sub>m</sub>) como una medida. Es de especial valor para las mezclas de Mab medir su tendencia a agregar debido a estrés físico tal como agitación o sacudidas. Los agregados son componentes indeseables de composiciones farmacológicas, puesto que pueden reducir el tiempo de vida de almacenamiento y pueden plantear un riesgo de seguridad a pacientes a ciertos niveles. Los datos de T<sub>m</sub> mostraban que los 5 Mab anti-TcdA tienen alta estabilidad de T<sub>m</sub>, mientras que tres (CA922, 923 y 997) tienen T<sub>m</sub> muy altas en el intervalo de 79-81 °C. De los Mab anti-TcdB probados, todos menos dos tienen T<sub>m</sub> muy altas. Ha de señalarse que CA997, CA1125 y CA1151, que se ensayaron en el estudio de infección de hámster (Ejemplo 9), tenían T<sub>m</sub> muy altas (79,2 °C, 79,3 °C y 80,8 °C respectivamente), lo que los hace adecuados para uso en una mezcla de Mab.
- 35

- 40 En el ensayo de agregación por sacudidas, CA997 y 922 tenían la tendencia menor a agregar de los 5 Mab anti-TcdA. De forma similar, CA115 y 1151 tenían las tendencias a agregación menores de los Mab anti-TcdB. Por ello, el uso de CA997, 1125 y 1151 como mezcla de Mab puede tener un valor especial, puesto que es más probable que sobrevivan a coformulación y almacenamiento a altas concentraciones de proteínas.

##### **Estimación del punto isoeléctrico (pI) por IEF capilar**

- 45 Se prepararon las muestras mezclando lo siguiente: 30 ul de muestra de proteína a 2 mg/ml, 0,35 % de metilcelulosa, 4 % de anfólitos pH 3-10 (Pharmalyte), marcadores de pI sintéticos (4,65 y 9,77), 1 ul de cada solución madre y agua de pureza HPLC para completar el volumen final de 200 ul. Se analizó entonces la mezcla usando un analizador iCE280 IEF (preenfoco a 1500V durante 1 min seguido de enfoque a 3000 V durante 6 min). Se integraron entonces los electroferogramas calibrados usando el software Empower (de Waters)

**Estabilidad térmica (Tm) medida mediante el ensayo Thermofluor.**

Este método usa tinte fluorescente naranja Sypro para monitorizar el proceso de desplegamiento de dominios proteicos. El tinte se une a regiones hidrófobas expuestas que se vuelven expuestas como consecuencia del desplegamiento, lo que da como resultado un cambio en el espectro de emisión.

- 5 Se mezcla la muestra (5 ul a 1 mg/ml) con 5 ul de una solución madre de naranja Sypro (30x) y se completa el volumen a 50 ul con PBS, pH 7,40.

Se aplican alícuotas de 10 ul de esta solución a pocillos en una placa de 384 pocillos (n= 4).

- 10 Se coloca la placa en un sistema de PCR instantáneo rápido 7900HT que contiene un dispositivo de calentamiento para control preciso de la temperatura. Se aumenta la temperatura de 20 a 99 °C (tasa de pendiente de 1,1 °C/min). Un dispositivo CCD monotoriza simultáneamente los cambios de fluorescencia en los pocillos. Se usa un algoritmo para procesar los datos de intensidad y tener en cuenta múltiples transiciones.

**Estresamiento de muestras por agitación.**

- 15 Durante la fabricación, se someten las muestras de anticuerpo a estrés mecánico generado por procesos tales como bombeo y filtración. Esto puede causar desnaturalización y en consecuencia agregación debido a la exposición de la proteína a interfases de aire-líquido y fuerzas de cizalladura resultantes en la pérdida última de bioactividad. El estrés por vórtex es un método para cribar la robustez de las muestras de anticuerpo para la predicción de la estabilidad de agregación.

- 20 Se sometieron ambas moléculas de IgG1 anti-TcdA y anti-TcdB a estrés por agitación, mediante agitación con vórtex usando un Eppendorf Thermomixer Comfort a 25 °C, 1400 rpm. El tamaño de muestra era de 250 ul, (x3 por muestra) en un tubo tapado de estilo Eppendorf cónico de 1,5 ml (plástico) en PBS a pH 7,4. Se llevó cada muestra a una concentración de 1 mg/ml (usando un coeficiente de extinción calculado a partir de la secuencia) y se monitorizó la agregación por absorbancia a 340 nm y/o 595 nm, mediante el uso de un espectrofotómetro Varian Cary 50-Bio, medido a intervalos de hasta 24 horas.

- 25 **Resultados** La Tabla 14 proporciona un compendio de los datos de pl y Tm medidos tanto para moléculas de IgG1 anti-TcdA como anti-TcdB.

**Tabla 14: Compilación de datos de pl y Tm**

	pl medido	Tm(Fab) en PBS	Tm(CH2)
<b>IgG1 anti-TcdA:</b>			
CA164_00922.g1	8,8	81	69,2
CA164_0923.g1	9,2	79	69,3
CA164_0995.g1	8,5	71	sin datos*
CA164_0997.g1	8,3	79,2	68,4
CA164_01000.g1	7,74	70,5	sin datos*
<b>IgG1 anti-TcdB</b>			
CA164_01125.g1	9,2	79,3	69,4
CA164_01125.g1	9,2	79,5	69,3
CA164_01134.g4	9,3	78,4	69,4
CA164_01134.g5	9,2	76,4	69,2
CA164_01134.g6	9,2	76,6	69,6
CA164_01102.g1	9,1	69	sin datos*
CA164_01102.g4	9,1	69,1	sin datos*
CA164_01151.g4	9,2	80,8	69,8
*designa que no fue posible discernir los dominios Fab y CH2.			

**pl medido**

El pl medido de las moléculas era alto (excepto para CA164\_01000.g1\_P3) y alejado del pH de tampones de formulación tales como PBS, pH 7,4, y acetato de sodio 50 m/cloruro de sodio 125 mM, pH 5. Esto puede significar que pueden seleccionarse los tampones con pH adecuados para coformulación de dos o más Mab.

**5 Estabilidad térmica (Tm) medida mediante ensayo Thermofluor.**

Puesto que todas las moléculas son de IgG1, las Tm del dominio Fc ((Tm(CH2)) son iguales. La diferencia en estabilidad térmica entre las moléculas puede determinarse por la Tm del dominio Fab' (Tm(Fab)).

Para las moléculas anti-TcdA, el orden de rangos (el más estable primero) era de CA922≥997>923>995>1000 y para las moléculas anti-TcdB (el más estable primero) era de CA1151.g4>1125.g1,g4>1134.g4>1134.g5≥1134.g6>1102.g1=1102.g4.

**Estresamiento de muestras por agitación.**

Era posible determinar una diferente estabilidad de agregación entre los diferentes anticuerpos. La Figura 67 muestra el efecto de la agitación *a través de* agitación con vórtex sobre diferentes moléculas de IgG1 anti-TcdA en PBS, pH 7,4.

15 Era posible determinar un orden de rangos (primero el más estable a agregación):

CA922≥997>923≥995>1000

La Figura 68 muestra el efecto de la agitación *mediante* vórtex sobre diferentes moléculas anti-TcdB.

Era posible clasificar el orden de estabilidad de agregación, de tal modo que los injertos de CA1125 parecían más estables que las moléculas de CA1134, que eran más estables que las moléculas de CA1102.

20 Se realizó un estudio adicional para comparar directamente la estabilidad de agregación de la molécula anti-TcdB (CA1151.g4) con la molécula más estable CA1125.g2 (véase la Figura 2) y las moléculas anti-TcdA más estables a la agregación (CA922.g1 y CA997.g1). Los resultados pueden verse en la Figura 69.

Se muestran también resultados adicionales para estos 4 Mab en las Figuras 67 y 68.

25 Para las moléculas anti-TcdA, CA922.g1 y CA977.g1, CA922 eran preferibles basándose en los análisis anteriores, aunque aparte de CA1000 todas las moléculas podían considerarse candidatos adecuados para uso como IgG1 terapéutico.

30 Para las moléculas anti-TcdB, podían agruparse las características biofísicas en la familia de injertos basándose en la estabilidad de agregación y la Tm, de tal modo que los injertos de CA1125 probaron ser potencialmente más estables. Los injertos de CA1102 mostraban los datos de Tm peores y mostraban también la mayor tendencia a agregar *mediante* estrés por agitación.

Un estudio que usa CA1151.g4 mostraba que esta molécula exhibía una estabilidad de agregación ligeramente aumentada respecto a CA11125.g2 y parecía equivalente a las moléculas de TcdA (CA922.g1 y CA997.g1). Todas las cuatro moléculas mostraban valores de Tm equivalentes. CA997, CA1125 y CA1151 muestran niveles muy altos de termoestabilidad y niveles muy bajos de formación de agregado después de agitación.

**35 Ejemplo 9 Estudio de infección en hámster por Mab anti-toxina de C. difficile.**

Se realizó el estudio de infección en hámster por Ricerca Biosciences LLC, Cleveland, Ohio, EE. UU.

El protocolo de estudio se aprobó por el comité IACUC de Ricerca. Los componentes activos y de control se anonimizaron (composición y dosis) para el personal de Ricerca hasta después de la terminación del periodo de estudio de 28 días planeado.

40 Se albergaron individualmente hámsteres macho sirios dorados (de 82-103 g de peso, 54 días de edad) en jaulas desechables filtradas con HEPA y se alimentaron con Teklad Global Diet 2016 y agua *a voluntad*. Después de la aclimatación, se predosificaron a los hámsteres (i.p.) mezclas de Mab o PBS (control de vehículo) una vez al día durante cada uno de 4 días: días -3, -2, -1 y 0. Se investigaron dos dosis de Mab: dosis alta= 50 mg/kg de cada uno de los componentes anti-TcdA y anti-TcdB y dosis baja de 5 mg/kg de cada uno de los componentes anti-TcdA y anti-TcdB.

45 La combinación farmacológica probada estaba compuesta por un anticuerpo anti-TcdA (CA997.g1) que constituía el 50 % de la proteína inyectada y dos anticuerpos anti-TcdB (CA1125.g2 y CA1151.g4) que constituían en conjunto un 50 % de la proteína inyectada, pero que solos constituían el 25 % de la proteína inyectada. Se sensibilizaron los hámsteres (día -1) con fosfato de clindamicina 50 mg/kg en PBS (s.c.) antes de exponerse 1 día después (día 0) a 3,4

x 106 u.f.c. de células vegetativas de la cepa ATCC43596. Se dosificó vancomicina 5 mg/kg dos veces al día durante 5 días (p.o.) los días 1, 2, 3, 4, 5.

Se realizaron comprobaciones de viabilidad en animales dos veces al día, los animales que se encontró que estaban *en situación extrema* se sacrificaron y se contaron como muertos. Se determinaron los pesos corporales en cada día de dosificación y entonces dos veces por semana y antes de sacrificar los supervivientes. Se realizó una autopsia macroscópica en todos los animales. Se crearon curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan y Meier. Se analizaron las curvas de supervivencia usando el valor de P de la prueba del logaritmo de los rangos en comparación con el umbral corregido de Bonferroni de P= 0,005. El grupo tratado con vancomicina no se incluyó en los análisis. Se realizaron todas las pruebas estadísticas con Prism v5.04. Todos los grupos contenían 11 animales, excepto el grupo de control de vancomicina que contenía 5 animales.

Las curvas de supervivencia pueden verse en la Figura 63. Los hámsteres que recibieron PBS (control) murieron todos los días +2 y +3, mientras que aquellos que recibieron el tratamiento de vancomicina durante 5 días murieron todos los días +10 y +11. Los hámsteres que recibieron la dosis alta de mezcla de Mab de UCB sobrevivieron todos hasta el día +11, después de ello solo dos animales murieron hasta el final del estudio de 28 días. Los hámsteres que recibieron la dosis baja de mezcla de Mab de UCB sobrevivieron todos hasta el día +3, después de ello se perdieron animales bastante continuamente hasta el día +16 cuando todos habían muerto. Los datos muestran unos niveles y duración excepcionales de la protección cuando se comparan con los datos publicados para uso de Mab anti-toxina en hámsteres (18). Estos datos in vivo apoyan las observaciones in vitro de un desempeño de muy alto nivel para neutralización y estabilidad.

No hay un nexo evidente entre la muerte y el peso corporal durante la fase aguda (días 1-5) de la infección, Figuras 64-65. Por ello, puede suponerse que los hámsteres mueren por los abrumadores efectos directos e indirectos de TcdA y TcdB. Los hámsteres que sobreviven al periodo agudo debido a protección parcial (dosis baja de UCB) de Mab neutralizantes pierden peso, presuntamente debido al daño intestinal y al estado nutricional alterado. Era notable que muchos de los hámsteres que seguían sobreviviendo al periodo de 28 días debido a los efectos protectores de los Mab de alta dosis de UCB se recuperaban de la pérdida de peso y de hecho incluso ganaban peso. Esto puede tomarse como prueba de los efectos protectores superiores de los Mab de UCB, que posibilitan que el intestino funcione normalmente.

**Tabla 15. Puntuaciones de patología macroscópica**

Grupo	Ciego negro	Ciego rojo oscuro	Ciego rojo	Ciego rosa	Ciego normal	Tinción anogenital "cola húmeda"	Intestino delgado rojo
Control de PBS	1	9	1	0	0	1	1
UCB baja	0	4	5	2	0	4	1
UCB alta	0	0	1	1	9	3	0

Resulta evidente que los Mab de UCB eran capaces de proteger el intestino grueso y delgado de los derrames hemorrágicos causados por TcdA y TcdB.

Se muestran los resultados en las Figuras 63 a 66.

Las fotografías de la Figura 66 muestran patologías macroscópicas típicas para el hinchamiento y derrames hemorrágicos de ciegos causados por TcdA y TcdB (imagen izquierda, control de PBS, muerte animal el día 2) y ciegos llenos de heces normales después de protección por Mab de UCB de dosis alta (imagen derecha, UCB de dosis alta, supervivencia animal hasta el día 28). Estos datos muestran que, después de la protección con una dosis alta de Mab de UCB, el intestino grueso puede volver a la morfología y función normales.

**Ejemplo 10 Neutralización de TcdA de cepas diferentemente ribotipadas por Mab purificado.**

Las infecciones clínicas están causadas por una variedad de cepas diferentes. Se caracterizan las diferencias de cepas usando una serie de diferentes métodos de los que el ribotipado es uno clave. Se observa que las diferentes cepas de ribotipo tienen diferentes propiedades de patogenicidad, infección y esporulación. Toda la neutralización de TcdA mostrada anteriormente usaba TcdA purificada de la cepa conocida como VP110463. Sin embargo, la cepa agresivamente patogénica predominante asociada con brotes se llama ribotipo 027. Otros ribotipos clave incluyen 078, 001, 106. Se ha observado diferencia en la secuencia de aminoácidos entre toxinas producidas por diferentes ribotipos, y por ello es importante que los Mab sean capaces de neutralizar toxinas de un diverso conjunto de aislamientos clínicos. Se probó en CA922, 997 y 1000 su capacidad de neutralizar TcdA de las cepas 027 y 078 y se comparó con

sus capacidades contra TcdA de VPI10463. Se probaron los Mab a 4 [TcdA] y se encontró que eran capaces de neutralizar todas las toxinas sin diferencia significativa a DL<sub>80</sub>, DL<sub>90</sub> y DL<sub>95</sub>

**Tabla 16.**

Anticuerpo	Valores de CE50 (ng/ml) - cepa VPI 10463 de TcdA			
	DL80	DL90	DL95	DLmáx
CA164_922	0,27	0,9	1,2	>500
CA164_997	1	2,5	3,5	25,4
CA164_1000	3,6	13,5	19,3	>500

5 **Tabla 17.**

Anticuerpo	Valores de CE50 (ng/ml) - ribotipo 027 de TcdA			
	DL80	DL90	DL95	DLmáx
CA164_922	0,19	0,25	0,41	1,46
CA164_997	0,92	1,27	1,75	7,19
CA164_1000	2,25	2,49	3,52	16,32

**Tabla 18**

Anticuerpo	Valores de CE50 (ng/ml) - ribotipo 078 de TcdA			
	DL80	DL90	DL95	DLmáx
CA164_922	0,11	0,12	0,25	0,68
CA164_997	0,33	0,64	1,11	2,57
CA164_1000	2,04	2,41	5,03	14,16

**Ejemplo 11 Datos PK**

10 Un estudio PK de una IgG1 humana (20 mg/kg) en hámsteres sanos. Se encontró en la PK de hámster una vida media similar a los Mab en ratones o ratas. (t<sub>1/2</sub> 6-8 días). Las dosificaciones i.p. y s.c. fueron esencialmente las mismas.

Se estudio la farmacocinética y distribución en el intestino de un Mab hIgG1 en hámsteres dorado sirios "normales" (no infectados). Se administró Mab purificado a hámsteres macho (120-135 g) por CARE Research LLC, Fort Collins, Colorado, EE. UU. y se ensayaron muestras por UCB Pharma.

15 El estudio se aprobó por el comité IACUC de CARE. Cada uno de ocho animales recibió una dosis única de 20 mg/kg de IgG1, cuatro se dosificaron por vía *i.p.*, y cuatro se dosificaron por vía *s.c.* Se recogió sangre a las 1, 3, 8, 24, 48, 72, 103 y 168 horas después de la dosis y se separó el suero antes del almacenamiento a -80 °C. Se tomó también sangre de dos hámsteres no tratados para proporcionar controles de ensayo. Después del sacrificio, se cortó una longitud de 2 cm de colon desde la unión de los ciegos en adelante de cada hámster. Se aclaró la sección de colon con tampón de lavado (PBS al 50 % (v/v)) que contenía cóctel inhibidor de proteasa Sigma (P2714) antes de abrir y separar y retirar la mucosa del músculo subyacente. Se colocaron muestras de mucosa en 0,5 ml de tampón de lavado homogeneizado hasta uniformidad visual y se almacenaron a 4 °C antes de envío inmediato en hielo húmedo. Para ELISA de IgG anti-humana, se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc maxisorp durante una noche en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M a pH 8,3 con fragmento F(ab')<sub>2</sub> de IgG-Fc $\gamma$  de cabra anti-humano (Jackson 109-006-098), se lavaron las placas con PBS-Tween (PBS/0,1 % (v/v) de Tween 20) y se bloquearon entonces con 1,0 % (p/v) de BSA y 0,1 % (v/v) de Tween

20 en PBS.

25

## ES 2 729 278 T3

Se diluyeron muestras de suero en tampón de muestra-conjugado (1 % (p/v) de BSA, 0,2 % de Tween en PBS) y, después de lavar, se revelaron con kappa-HRP de cabra anti-humano (Cambridge Bioscience 2060-05) en tampón de muestra-conjugado y TMB con una solución de terminación de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M.

### Niveles en intestino, mucosa y suero:

- 5 Se recogieron muestras de suero de sangre tomada en el punto temporal de 168 h y se retiraron muestras de colon después de esto.

20 m/kg IP a las 168 horas

Muestra	ng/ml por cm de mucosa	µg/ml en suero
1001	23,2	75,0
1002	13,7	90,8
1003	21,8	70,5
1004	53,8	119,4

20 mg/kg SC a las 168 horas

Muestra	ng/ml por cm de mucosa	ng/ml en suero
2001	41,4	108,7
2002	62,1	76,6
2003	35,6	163,7
2004	37,3	153,3

10

Datos de suero

		Hámster <i>i.p.</i>		Hámster <i>s.c.</i>	
		Media	EE de la media	Media	EE de la media
<b>C<sub>máx</sub>:</b>	µg/ml	202	12	186	21
<b>T<sub>máx</sub>:</b>	h	36	7	76	16
<b>AUC<sub>(último)</sub>:</b>	h·µg/ml	22626	1378	22371	2258
<b>AUC<sub>(inf)</sub>:</b>	h·µg/ml	43287	7169	61290	17637
<b>% de extrapolación:</b>		43,7	9,2	54	11,7
<b>CL/F</b>	ml/h/kg	0,50	0,07	0,43	0,13
<b>MRT<sub>inf</sub></b>	h	223	53	310	88
<b>t<sub>½,z</sub>:</b>	h	149,2	36,9	188,5	61,9

Los datos se muestran también en las Figuras 70 y 71

ID de hámster	Media	EE
<b>Cinética sérica IP</b>		
<b>C<sub>máx</sub>:</b>	µg/ml	202
		12

ID de hámster		Media	EE
<b>Cinética sérica IP</b>			
T <sub>máx</sub> :	h	36	7
AUC <sub>(último)</sub> :	h·µg/ml	22626	1378
AUC <sub>(inf)</sub> :	h·ng/ml	43287	7169
% de extrapolación:		43,7	9,2
CL/F	ml/h/kg	0,50	0,07
MRT <sub>inf</sub>	h	223	53
t <sub>½,z</sub> :	h	149,2	36,9
<b>Cinética sérica SC</b>			
ID de hámster		Media	EE
C <sub>máx</sub> :	µg/ml	186	21
T <sub>máx</sub> :	h	76	16
AUC <sub>(último)</sub> :	h·µg/ml	22371	2258
AUC <sub>(inf)</sub> :	h·µg/ml	61290	17637
% de extrapolación:		54	11,7
CL/F	ml/h/kg	0,43	0,13
MRT <sub>inf</sub>	h	310	88
t <sub>½</sub> :	h	188,5	61,9

Se mostró también que la hIgG1 podía encontrarse en "raspaduras" del intestino, concretamente que la hIgG1 entra en la vasculatura del intestino sano, y así podría ser protectora a "dosificación profiláctica". Este efecto sería incluso más profundo en seres humanos, puesto que tienen un hFcRn afín.

#### 5 Ejemplo 12 Niveles séricos en hámsteres con infección por *C. difficile*

Este estudio era determinar la concentración sérica de CA725.0, CA726.0, CA997.g1 CA1125.g2 y CA01151.g4 después de administración i.p. (diversas dosis detalladas a continuación) en hámster dorado sirio.

10 Se cuantificaron los Mab humanizados usando análisis de cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS) después de digestión triptica. Se consiguió la cuantificación por comparación con material estándar auténtico adicionado a concentraciones conocidas en matriz de blanco, con mioglobina equina adicionada usada como patrón interno.

15 Se seleccionó un único péptido ("proteotípico") común a todos los Mab humanizados investigados (DTLMISR, un péptido de la región CH2) y se digirieron tripticamente tanto muestras como muestras de calibración como se esquematiza. Se realizó la digestión triptica de muestras séricas de 5 µl durante una noche usando tripsina modificada de pureza de secuenciación (Promega, Southampton, RU) después de desnaturalización/reducción con acetonitrilo/Tris (2-carboxietil)fosfina y carbamidometilación con yodoacetamida (Sigma-Aldrich, Poole, RU).

20 El sistema de LC-MS/MS consistía en un automuestreador CTC HTS-x (CTC Analytics, Zwingen, Suiza), un sistema Agilent 1290 LC (Agilent Technologies, Stockport, RU) y un sistema Sciex 5500 QTrap MS (AB Sciex, Warrington, RU), equipado con una fuente de iones Turbo V que funciona en modo de electropulverización. Se separaron los analitos usando una columna Onyx Monolithic C18 (100x4,6 mm, Phenomenex, Macclesfield, RU) con un gradiente de 2 a 95 % (v/v) de agua/acetonitrilo (0,1 % de ácido fórmico) suministrado a 1,5 ml/min durante 6 minutos. El volumen de inyección era de 10 µl; se introdujo todo el eluyente en la fuente de espectrómetro de masas. Se mantuvo la temperatura de fuente del espectrómetro de masas a 600 °C y se optimizaron otros parámetros de fuente (p. ej., energía de colisión, potencial de desagrupamiento, presión de cortina de gas, etc.) para conseguir la máxima

sensibilidad para el péptido de interés. Se monitorizaron las transiciones selectivas para cada péptido de interés proteotípico.

Se seleccionaron péptidos únicos ("proteotípicos") para todos los analitos de interés; se analizaron las muestras después de digestión triptica.

- 5 Se calcularon las concentraciones plasmáticas basándose en los péptidos monitorizados como se esquematiza a continuación.

Para CA164\_00997 y CA16401151, se observaron picos interferentes en las trazas de MRM. Por esta razón, estos dos analitos no pudieron cuantificarse en las muestras.

- 10 Se cuantificó la h-IgG total en todas las muestras usando un péptido común a todos los analitos de interés. Esto se realizó usando una curva patrón combinada de los cinco analitos. Se demuestra la validez de este enfoque por el hecho de que la suma de las concentraciones observadas para CA164\_00725 y CA164\_00726 está bien de acuerdo (dentro del error experimental) con la concentración observada para h-IgG total.

Usando este enfoque, se determinó la concentración total de h-IgG en las muestras de animales dosificados con CA164\_00997, CA164\_01125 y CA164\_01151.

- 15 Globalmente, los datos obtenidos indican que la exposición de los cinco analitos de interés era similar para una dosis dada.

Grupos de estudio

Grp	Marcajes anonimizados	Tratamientos reales	Días dosis	Componentes de tratamiento		
				de	Anti-toxina A	Anti-toxina B
4	Tratamiento 3	Vehículo PBS 5 ml/kg i.p.	3, -2, -1, 0			
2	Vancomicina	Vancomicina 5 mg/kg b.i.d.p.o.	1, 2, 3, 4, 5			
1	Tratamiento 1	LD* de UCB 5 mg/kgA5mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA997.g1_P3	CA1125.g2_P3	CA1151.g4_P3
5	Tratamiento 4	HD* de UCB 50 mg/kgA50 mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA997.g1_P3	CA1125.g2_P3	CA1151.g4_P3
6	Tratamiento 5	LD* de competidor 5 mg/kgA5 mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA726_P3	CA725_P3	
3	Tratamiento 2	HD* de competidor 50 mg/kgA50 mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA726_P3	CA725_P3	

Tabla 19

Grupo/tiempo	Día	N.º de animales	Dosis	Conc. sérica en µg/ml de h-IgG total
1	1	44	5 mg/kg de 997, 2,5 mg/kg de 1125, 2,5 mg/kg de 1151	280
	1	45		302
	1	46		182
	6	45		61
	6	47		71

ES 2 729 278 T3

Grupo/tiempo	Día	N.º de animales	Dosis	Conc. sérica en µg/ml de h-IgG total
	6	49		45
3	1	60	50 mg/kg de 725, 50 mg/kg de 726	3040
	1	61		3330
	1	62		2990
	6	62		583
	6	63		913
	6	64		1240
	28	64		199
	28	65		36
4	1	71	Vehículo	nd
	1	72		nd
	1	73		nd
5	1	82	50 mg/kg de 997, 25 mg/kg de 1125, 25 mg/kg de 1151	3050
	1	83		2790
	1	84		2370
	6	82		838
	6	83		645
	6	84		855
	28	82		116
	28	83		65
	28	84		66
	28	85		44
	28	86		101
	28	87		89
	28	88		27
	28	89		31
28	90	66		
	1	93	5 mg/kg de 725, 5 mg/kg de 726	335
	1	94		322
	1	95		260
		200		103
	6	202		62

Grupo/tiempo	Día	N.º de animales	Dosis	Conc. sérica en µg/ml de h-IgG total
		203		79
	28	203		nd

nd - no detectado (LDC= 2,5 µg/ml para todos los analitos)  
na - no analizado: se observó interferencia en la muestra para 997 y 1151

**Tabla 20** El anticuerpo CA725 es el anticuerpo de la técnica anterior MDX1388. El anticuerpo CA726 es el anticuerpo de la técnica anterior CDA1 como se describe (15). Se presenta un compendio de estos datos en la Figura 72.

Grupo	Patología cecal					Patología del intestino delgado	
	Negro	Rojo oscuro	Rojo	Rosa	Normal	Rojo oscuro	Rojo
Control de PBS	1	9	1	0	0	0	1
MDX alta de 50mg/kg x4	0	1	4	4	2	1	0
UCB alta de 50mg/kg x4	0	0	1	1	9	0	0

## 5 Referencias

1. Kuehne, S et al., "The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile Infection" Nature (2010) 467: 711-713
2. Davies AH et al., "Super toxins from a super bug: structure and function of Clostridium difficile toxins" Biochem. J (2011) 436: 517-526
3. Rothman, S et al., "Differential Cytotoxic Effects of Toxins A and B Isolated from Clostridium difficile" Infect. Imm. (1984) 46: 324-331.
4. Du, T y Alfa, MJ "Translocation of Clostridium difficile toxin B across polarized Caco-2 cell monolayers is enhanced by toxin A" Can J Infect Dis. (2004) 15: 83-88.
5. Kim, Iaconis y Rolfe. "Immunization of Adult Hamsters against Clostridium difficile-Associated Ileocectitis and Transfer of Protection to Infant Hamsters" Infect. Imm. (1987) 55:2984-2992
6. Rupnik JCM (2003) 41: 1118-1125
7. Chaves-Olarte JBC (1999) 274: 11046-11052.
8. Lylerly, DM et al., "Passive Immunization of Hamsters against Disease Caused by Clostridium difficile by Use of Bovine Immunoglobulin G Concentrate" Infection and Immunity (1991) 59: 2215-2218.
9. Lylerly, DM et al., "Vaccination against Lethal Clostridium difficile Enterocolitis with a Nontoxic Recombinant Peptide of Toxin A" Current Microbiology (1990) 21: 29-32.
10. Lylerly, DM et al., "Characterization of Toxins A and B of Clostridium difficile with Monoclonal Antibodies" Infect. Imm. (1986) 54: 70-76.
11. Corthier et al., "Protection against Experimental Pseudomembranous Colitis in Gnotobiotic Mice by Use of Monoclonal Antibodies against Clostridium difficile Toxin A" Infect. Imm. (1991) 59: 1192-1195
12. Kink JA y Williams JA, "Antibodies to Recombinant Clostridium difficile Toxins A and B Are an Effective Treatment and Prevent Relapse of C. difficile-Associated Disease in a Hamster Model of Infection" Infect. Imm. (1998) 66: 2018-2025.
13. Ma D, et al., Progenics inc. Póster de ASM, 27 de mayo de 2010
14. Hansen, G y Demarest, SJ. WO 2006/0718877 A2
15. Babcock GJ, et al., "Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent Clostridium difficile-induced mortality in hamster" Infect. Imm.(2006) 74: 6339-6347.

16. Lowy I et al., "Treatment with Monoclonal Antibodies against Clostridium difficile Toxins" NEJM (2010) 362: 197-205.
17. Zubler, R. H., Erard, F., Lees, R. K., Van, L. M., Mingari, C., Moretta, L. y MacDonald, H. R. (1985). Mutant EL-4 thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction. J. Immunol. 134, 3662-3668
- 5 18. Babcook, J. S., Leslie, K. B., Olsen, O. A., Salmon, R. A. y Schrader, J. W. (1996). A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93, 7843-7848
19. Tickle, S., Adams, R., Brown, D., Griffiths, M., Lightwood, D. y Lawson, A. (2010). High-Throughput Screening for High Affinity Antibodies, pág. 303-307.
- 10 20. Demarest et al., mAbs (2010) 2: 190-198
21. Yoshida et al., J. Clin. Invest. (2006) 116: 2142-2151
22. Xu et al., Vaccine (2005) 23: 2658-2664.
23. Yousaf et al., Clin. Exp. Immunol. (1986) 66: 654-660
24. Mannik et al., J. Exp. Med. (1971) 133: 713-739
- 15 25. Nusrat et al., Infection and Immunity (2001) 69: 1329-1336
26. Lima et al., Infect Immun (1988) 56: 582-588
27. Ravichandran et al J of Pharmacology and Experimental Therapeutics. (2006) 318: 1343-1351
28. Takahashi et al., (2009) Vaccine 27: 2616-2619
29. Cohen et al., Infect. Cont. and Hosp. Epidem. (2010) 31: 431-455
- 20 30. Barbut et al., J. Clin. Microbiol. (2000) 38: 2386-2388
31. Wilcox et al., J. Hospital Infection (1998) 38: 93-100.

**Listado de secuencias**

- <110> UCB Pharma S.A.
- 25 <120> Anticuerpos capaces de neutralizar las exotoxinas principales tcdA y tcdB de Clostridium difficile
- <130> G0159-WO
- <150> US 61/535,532
- <151> 16-09-2011
- <150> US 61/638,731
- 30 <151> 26-04-2012
- <160> 194
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 11
- 35 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo CDR
- <400> 1
- Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ala Leu Ala
- 40 1 5 10
- <210> 2
- <211> 7

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
 5 <400> 2  
   Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser  
   1                  5  
  
 <210> 3  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 3  
 Gln Tyr Thr His Tyr Ser His Thr Ser Lys Asn Pro  
   1                  5                  10  
  
 15 <210> 4  
   <211> 10  
   <212> PRT  
   <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 4  
 Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr Tyr Met Ser  
   1                  5                  10  
  
 <210> 5  
 <211> 17  
 25 <212> PRT  
   <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 5  
 Ile Ile Ser Ser Gly Gly His Phe Thr Trp Tyr Ala Asn Trp Ala Lys  
   1                  5                  10                  15  
  
 30 Gly  
  
 <210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 35 <220>  
   <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 6  
 Ala Tyr Val Ser Gly Ser Ser Phe Asn Gly Tyr Ala Leu  
   1                  5                  10  
  
 40 <210> 7  
   <211> 110  
   <212> PRT  
   <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Región variable del anticuerpo

ES 2 729 278 T3

<400> 7

Asp Pro Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ala  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Tyr Thr His Tyr Ser His Thr  
85 90 95

Ser Lys Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

- 5 <210> 8
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo anti-TcdA 922.g1

<400> 8  
gaccctgtga tgaccagag tccgagcact cttctgcct ccgtgggaga ccgcgtgacc 60  
attacatgtc aggcttcaca aagtatctcc aatgctctgg cctgggtatca gcagaaaccc 120  
ggcaaagccc ctaagctgct catctactct gcatcaagcc tggctagcgg cgtgccaaagc 180  
cgattcaagg ggagcggttc tggcactgag tttacgctga ccatcagtag cttgcagcct 240  
gacgattttg caacctatta ctgccagtac acacactact cccatacatc taaaaaccca 300  
ttcggagggg gtactaaggt cgaaataaag 330

- 15 <210> 9
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>  
<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 922

<400> 9  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

- 20 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

ES 2 729 278 T3

Gly Ile Ile Ser Ser Gly Gly His Phe Thr Trp Tyr Ala Asn Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln  
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
85 90 95

Ala Tyr Val Ser Gly Ser Ser Phe Asn Gly Tyr Ala Leu Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115

- 5 <210> 10
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Polinucleótido que codifica la región variable de anti-TcdA Anticuerpo 922 (región variable de cadena pesada)
- <400> 10
- gaagtgcaat tgggtgaaag tggcggagga ctggtgcaac ccggggtag tctgcgactg 60
- agctgtgctg cctccggctt taccattagc tcctactata tgagctgggt tcgacaggcc 120
- cctggaaaag gactcgaatg gatcggcatc atatcttcg gtgggcattt cacctggtac 180
- gcaaactggg ctaaggggag attcacgatt agcagcgact ccacaaccgt gtacctgcaa 240
- atgaacagcc tgagggatga ggacactgcc acatatttct gcgcacgcgc ttacgtgagc 300
- 10 ggaagctcat ttaatggcta tgcactgtgg gggcaaggaa cactcgtgac tgtctcg 357
- <210> 11
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 15 <220>
- <223> Anticuerpo CDR
- <400> 11
- Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
- 1 5 10
- 20 <210> 12
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo CDR
- 25 <400> 12
- Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
- 1 5
- <210> 13
- <211> 12
- <212> PRT
- 30 <213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 13  
 Gln Tyr Ser His Tyr Gly Thr Gly Val Phe Gly Ala  
 1                    5                    10

5    <210> 14  
      <211> 10  
      <212> PRT  
      <213> Artificial

<220>  
 10   <223> Anticuerpo CDR

<400> 14  
 Ala Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Ser  
 1                    5                    10

<210> 15  
 <211> 18  
 15   <212> PRT  
      <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 15  
 Ile Ile Ser Ser Gly Ser Asn Ala Leu Lys Trp Tyr Ala Ser Trp Pro  
 1                    5                    10                    15

20   Lys Gly

<210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25   <220>  
      <223> Anticuerpo CDR

<400> 16  
 Asn Tyr Val Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Leu  
 1                    5                    10

30   <210> 17  
      <211> 110  
      <212> PRT  
      <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo del anticuerpo anti-TcdA 923

ES 2 729 278 T3

<400> 17

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Tyr Ser His Tyr Gly Thr Gly  
85 90 95

Val Phe Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 18

<211> 330

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 923.g1

<400> 18

gacgtcgtga tgactcagag cccatctagt ctgagcgtca gcgtcggaga ccgagtcaca 60

attacctgtc aagcctccca gagcatctcc aactacctgg cctggtacca acagaaacct 120

ggcaaggtgc ccaagctgct gatctatagt gcttccacac tcgcaagcgg cgttccgtca 180

cgctttaagg gatctggctc tggcactcag ttcacctga cgatctcaag cctgcagcca 240

10 gaagatgtgg ccacctatta ctgccagtat tcccactacg ggactgggggt gttcgggtgcc 300

tttggaggtg ggaccaaagt ggagataaag 330

<210> 19

<211> 120

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 923

ES 2 729 278 T3

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Ser Leu Ser Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ile Ile Ser Ser Gly Ser Asn Ala Leu Lys Trp Tyr Ala Ser Trp  
50 55 60

Pro Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
85 90 95

Arg Asn Tyr Val Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Leu Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115 120

<210> 20

<211> 360

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 923.g1

<400> 20

gaagttcaac ttgtggaatc tggaggcggg ctctgtgcagc ctgggtggaag ccttagactg 60

agctgcgctg catccgcatt ttccctgtcc aactactaca tgagctgggt gcgacaagca 120

ccaggcaagg gactggaatg gattggcatc ataagctccg gttccaatgc cctgaaatgg 180

10 tacgcatcat ggccgaaagg ccgctttacc ataagcaagg actccaccac cgtctatctg 240

cagatgaact cattgcgtgc cgaggacact gcaacgtact tctgtgctcg caactacgtg 300

ggaagcggat cttattatgg catggatctg tggggacaag gtacactcgt gaccgtctcg 360

<210> 21

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo CDR

<400> 21

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Phe Ser

20 1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 22  
 Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
 1 5

5 <210> 23  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 23  
 Gln Cys Thr Asp Tyr Ser Gly Ile Tyr Phe Gly Gly  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 24  
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Ser  
 20 1 5 10

<210> 25  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 25  
 Ile Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Thr Phe Thr Trp Tyr Ala Ser Trp  
 1 5 10 15

Ala Lys Gly

30 <210> 26  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 26  
 Ala Tyr Val Gly Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Asp Pro  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 993

ES 2 729 278 T3

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Leu Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Asp Tyr Ser Gly Ile  
85 90 95

Tyr Phe Gly Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

- 5 <210> 28
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 933.g1

<400> 28

gatgtcgtga tgactcagtc cccctctaca ttgagtgcct ctgtcgggtga tcgagttacc	60
atcacctgtc aagcaagcca gagcatcagc tcctacttct cttggtacca gcaaaagccg	120
ggaaaagccc ctcaactgct gatttatggg gcctcaacac tggcttctgg cgtgccatca	180
agattcaagg gatctggctc cggcactgag cttacactga ccattagctc cctgcaacct	240
gacgattttg ctacctacta ctgccagtgc accgactata gtgggatata tttcggcgga	300
tttgggggag ggacgaaagt ggaaatcaag	330

<210> 29

<211> 121

- 15 <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 993 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ile Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Thr Phe Thr Trp Tyr Ala Ser  
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Tyr Val Gly Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Asp Pro Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115 120

- 5 <210> 30
- <211> 363
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 993.g1

<400> 30

gaagttcagc tggtcgagag cggaggcggg ctggtgcaac ctggtggtag cctgaaactc 60  
tcttgtactg cctccggggt ttccctgagc tcttactata tgtcatgggt gagacaggct 120  
cccgggaaag gattggaatg gatcgggatt atctcctcg gctcttccac cactttcaca 180  
tggtacgcct catgggcaaa ggggaggttt accataagca agacaagcac gaccgtgtat 240  
cttcagatga actccctgaa gacggaggat actgccacct acttttgcg tgggcctat 300  
gtgggctcaa gctcttacta tggcttcgac ccatggggac agggcacact tgtgaccgtc 360  
tcg 363

<210> 31

<211> 11

- 15 <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo CDR

<400> 31

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr Phe Ser  
1 5 10

<210> 32

<211> 7

- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 32  
 Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser  
 1 5

5 <210> 33  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 33  
 Gln Asn Asn Tyr Gly Val His Ile Tyr Gly Ala Ala  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 34  
 Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Asp Met Ile  
 20 1 5 10

<210> 35  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 35  
 Phe Ile Asn Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 36  
 30 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 36  
 Val Asp Asp Tyr Ile Gly Ala Trp Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 995

ES 2 729 278 T3

<400> 37

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr  
20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Val His Ile  
85 90 95

Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 38

<211> 330

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 995.g1

<400> 38

gacgctcgtga tgacacagag cccttcaaca ctgtctgcaa gcgtgggcca tagggtcacc 60

ataacgtgcc aggcctctca atccatcaac aactatthta gctggtacca gcagaagcca 120

ggcaaggctc cgaacttct gatctacgga gctgccaacc tggcaagtgg cgtgccatca 180

cggttcaagg gatccgggag cggactgag tatacctga ccatttcac tctccaacc 240

gacgatttgc ccactactc ctgccagaat aattacggcg tgcacatcta tggagctgcc 300

10 tttggcggtg ggacaaaagt ggaaattaag 330

<210> 39

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 995 (cadena pesada)

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly



ES 2 729 278 T3

<400> 42  
 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 43  
 <211> 13  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 43  
 Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Asn Asp Asp Gly Ile Ala  
 10 1 5 10

<210> 44  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 44  
 Gly Ile Asp Leu Ser Ser His His Met Cys  
 1 5 10

20 <210> 45  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

25 <400> 45  
 Val Ile Tyr His Phe Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

<210> 46  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 46  
 Ala Ser Ile Ala Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Pro  
 1 5 10

35 <210> 47  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 40 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 997

ES 2 729 278 T3

<400> 47

Ala Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Asn  
85 90 95

Asp Asp Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 48

<211> 333

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 997.g1

<400> 48

gcactcgtga tgacacagag cccgagtagc ttagtgctt caaccggtga tagggtcact 60

10 attacttgcc aagcctctca gagtatatct agctatctga gctggtacca gcaaaagccc 120

gggaaggctc ctaaactgct gatctaccgg gcttccacat tggcctccgg cgttccctca 180

cgctttagcg gctccggatc cggaaccgag tacaccctga ctatctcttg cctgcaatct 240

gaggacttgc caacctacta ttgtctgggc gtctacggat atagcaacga tgacgggatc 300

gccttcggcg gcggtaccaa agtggaatt aag 333

<210> 49

<211> 116

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 997 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 49  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser His  
 20 25 30

His Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr His Phe Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Thr  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met  
 65 70 75 80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ala  
 85 90 95

Ser Ile Ala Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser  
 115

<210> 50  
 <211> 348  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 997.g1 (cadena pesada)

10 <400> 50  
 gaggtgcaac ttgtggaaag cgggggagga ctggtgcagc ctgggggctc attgagactg 60  
 agctgcaccg tttctggtat tgacctgagc tcccatcata tgtgctgggt gcgccaggca 120  
 cccgaaaag gactggaata catcggcgtc atataccact ttggctctac atactatgcc 180  
 aactgggcaa ctgggcgatt cacaattagc aaggactcaa ctaccgttta cctgcaaatg 240  
 aatagcctga gggctgagga tactgccacc tatttctgtg cccgggcttc aatcgccggc 300  
 tattctgcct ttgatccatg ggggcaagga aactcgtga ccgtctcg 348

15 <210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

20 <400> 51  
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 52  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 25 <213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 52  
 Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
 1 5

5 <210> 53  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 53  
 Gln Gly Asn Ala Tyr Thr Ser Asn Ser His Asp Asn Ala  
 1 5 10

<210> 54  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 54  
 Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asp Ala Val Gly  
 20 1 5 10

<210> 55  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 55  
 Ile Ile Ala Thr Phe Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 56  
 30 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 56  
 Thr Gly Ser Trp Tyr Tyr Ile Ser Gly Trp Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
 1 5 10 15

Met Asp Leu

<210> 57  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 1000

ES 2 729 278 T3

<400> 57

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Ala Tyr Thr Ser Asn  
85 90 95

Ser His Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

- 5 <210> 58
- <211> 333
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 1000.gi

<400> 58

gaaatcgtga tgacgcagtc accaagcaca ctgagcgctt ctgtgggaga tcgggtcaca 60  
ataacctgtc aggcctccca gagcatctac tcttatctgg catggtacca gcagaagcca 120  
gggaaagctc ccaagctgct gatttatgac gccagcactt tggcttccgg tgttcctagt 180  
aggttcaaag gctccggaag cggtagcgag tttaccctga ccatctcatc tctgcaaccc 240  
gatgactttg ccacatacta ttgccagggg aatgcctaca cttccaactc acacgacaac 300  
gcattcgggg gaggcaccaa agtcgaaatt aag 333

- <210> 59
- <211> 125
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 1000 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 59  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asp  
 20 25 30

Ala Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile  
 35 40 45

Gly Ile Ile Ala Thr Phe Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln  
 65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 85 90 95

Thr Gly Ser Trp Tyr Tyr Ile Ser Gly Trp Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
 100 105 110

Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120 125

- 5 <210> 60
- <211> 375
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdA 1000.gl (cadena pesada)

<400> 60  
 gaagttcagc tggtcgagag cggagggggt ttgattcagc ccggtggctc acttagattg 60  
 agctgcaccg tgtccggaat cgatctgtca tctgatgccg tgggctgggt gcgacaggca 120  
 cctgggaaag gactggagta tatagggatc atcgccacct tcgactccac atactacgct 180  
 agctgggcaa aagggcgctt tacgattagc aaggcctcct ctactaccgt gtacctcaa 240  
 atgaactcac tgagggccga ggacactgcc acttatttct gtgctcggac cggtagctgg 300  
 tactacatct ctggctgggg ctctactat tatggcatgg acctgtgggg acaggggaca 360  
 ctcgtgaccg tctcg 375

- 15 <210> 61
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

- 20 <400> 61
- Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Leu Met His
- 1 5 10

<210> 62  
 <211> 7

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
  
 5 <400> 62  
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5  
  
 <210> 63  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 63  
 Gln Gln Thr Trp Asn Asp Pro Trp Thr  
 1 5  
  
 15 <210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 64  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 65  
 <211> 17  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 65  
 Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 30 Gly  
  
 <210> 66  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
  
 <400> 66  
 Val Ile Arg Gly Tyr Val Met Asp Ala  
 1 5  
  
 40 <210> 67  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 926

ES 2 729 278 T3

<400> 67

Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Leu  
20 25 30

Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Asn Asp Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 68

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 926.g1

<400> 68

gataccgtgc tgaccagag ccttgctaca ttgtcactga gccccgggga gagggccaca 60

ttgagctgcc gggcttcaaa atccgtgtcc accctcatgc actggtttca gcaaaagccc 120

gggcaggccc caaaactgct gatctacctc gcatctaacc ttgaatctgg cgtgccggcc 180

cgctttagtg gctccggaag cggaaccgac ttcacactga cgattagctc cctggagcct 240

gaggatttgc ccgtgtacta ttgccagcaa acttggaaatg acccttgac tttcgggggc 300

10 ggtactaagg tcgaaataaa g 321

<210> 69

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 926 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 69

Glu Val Glu Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Thr Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Thr Val Ile Arg Gly Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser  
115

<210> 70

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdBA 926.g1 (cadena pesada)

10 <400> 70

gaggtggaac tgctcgaatc tgggtggtggg ctggtgcagc ccggtggatc tctgagattg 60

tcatgcgagg catccggctt taccttttcc aactacggaa tggcctgggt gagacaggcc 120

ccaacgaagg ggctcgaatg ggttacaagc atcagctctt ctgggggatc tacttactat 180

cgcgatagcg tcaaaggccg gtttaccatt agccgagata atgccaatc aagcctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag ggctgaggac accgccacat actattgtac aaccgtgata 300

aggggctacg tgatggacgc atggggacag gggacattgg ttaccgtctc g 351

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo CDR

<400> 71

Arg Ala Ser Gly Ser Val Ser Thr Leu Met His

1 5 10

20 <210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 72  
 Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

5 <210> 73  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 73  
 His Gln Ser Trp Asn Ser Asp Thr  
 1 5

<210> 74  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 74  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala  
 20 1 5 10

<210> 75  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 75  
 Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Arg Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 76  
 30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 76  
 Ile Ser Arg Ser His Tyr Phe Asp Cys  
 1 5

<210> 77  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 927

ES 2 729 278 T3

<400> 77

Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Ser Val Ser Thr Leu  
20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Trp Asn Ser Asp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 78

<211> 318

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 927.g2

<400> 78

gacacacaga tgaccagag cccatccact ttgtctgcat ccgtgggcga ccgagtgaca 60

atcacctgta gagcaagcgg ttccgtgagc aactgatgc attggtacca gcagaagcct 120

gggaaggctc ccaagctgct gatctacaaa gccagcaacc ttgcctccgg cgttccaagc 180

cggtttagcg gttccggatc tggaaccgag ttcaccctga ccatatcaag cctgcaaccc 240

gacgacttgc ccacctacta ttgccaccag agctggaata gcgacacgtt cgggcaaggc 300

10 acaaggctgg aaatcaaa 318

<210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 927 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 79

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Arg Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ser Ile Ser Arg Ser His Tyr Phe Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser  
115

- 5 <210> 80
- <211> 351
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 927.g2 (cadena pesada)

<400> 80  
gagggtgcaac ttgtggaaag cggagggggc gtggtccaac ccggaagaag tctccgtctt 60  
tcttgcgccg caagtggctt caccttttcc aactacggaa tggcctgggt tcgacaagct 120  
cctgggaaag gattggagtg ggtggccact atcaactatg acggacgcac gacacactac 180  
cgagactctg ttaaggggag ctttacgatt tcccgcgaca atagcaagag caccctctac 240  
ctgcaaatga atagcctccg ggccgaggat actgctgtgt actattgtac ctccatctca 300  
cggagccact acttcgattg ctggggacaa ggcacactcg tgactgtctc g 351

- 15 <210> 81
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>  
<223> Anticuerpo CDR

- 20 <400> 81
- Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn His Leu Ala  
1 5 10

- <210> 82
- <211> 7
- <212> PRT
- 25 <213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 82  
 Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser  
 1 5

5 <210> 83  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 83  
 Gln Gln Tyr Asp Glu Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 84  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 84  
 Gly Phe Ser Leu Gln Ser Tyr Thr Ile Ser  
 20 1 5 10

<210> 85  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 85  
 Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Pro Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 86  
 30 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 86  
 Pro Arg Trp Tyr Pro Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 87  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1099

<400> 87  
 Asp Val Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn His

ES 2 729 278 T3

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

His Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Thr Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Glu Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
100 105

<210> 88

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1099.g2

<400> 88

gacgtccagc tcaactcaatc tccctccttt ctgtctgctt ctgtgggcga tcgcgtagaca 60

ataacctgca aggcctccaa atcaattagc aaccatctgg catggtatca ggagaagcct 120

ggcaaagcca ataagctgct gatccactcc ggctcaactc tgcaatccgg taccccaagc 180

cgatttagcg gatctgggag cggaaccgag ttcacactta ccattagctc cctgcaaccg 240

gaggacttgc ccacctatta ctgccagcaa tacgacgaat acccctatac gttcggccaa 300

10 gggacaagat tggaaatcaa gcgtacg 327

<210> 89

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1099 (cadena pesada)

<400> 89

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Gln Ser Tyr  
20 25 30

ES 2 729 278 T3

Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Pro Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
 85 90 95

Arg Pro Arg Trp Tyr Pro Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115

5 <210> 90  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1099.g2 (cadena pesada)

10 <400> 90  
 gaagttcagc tgcaggaatc tggacctggc ttggtgaaac caagcgagac acttagtctc 60  
 acttgaccgc tttccggcct ctcccttcaa tcctacacga tctcttgggt gcggcaacca 120  
 cccgggaaag gactggaatg gatcgagcc attagcgggg gagggagcac ctattacaac 180  
 ttgcctctca agagccgctg gaccatatcc cgtgacacaa gcaagagcca ggtttccctg 240  
 aagctgagct ccgtgactgc tgccgatacg gctgtttact attgcaccgc acctcgctgg 300  
 tatccccggt cctatttcga ctactgggga agaggcacac tggttaccgt ctcg 354

15 <210> 91  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 91  
 Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Thr Ser Ile His  
 1 5 10

20 <210> 92  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 92  
 Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 1 5

ES 2 729 278 T3

<210> 93  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
 <400> 93  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Leu Tyr Thr  
 1 5  
 10 <210> 94  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDRs  
 15 <400> 94  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Tyr Met Ala  
 1 5 10  
 <210> 95  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
 <400> 95  
 Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Thr Ile Ile Gln Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 25 <210> 96  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> Anticuerpo CDR  
 <400> 96  
 Arg Gln Gly Thr Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Phe  
 1 5 10  
 <210> 97  
 <211> 107  
 35 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1102

ES 2 729 278 T3

<400> 97

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Thr Ser  
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Leu Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 98

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1102.g4

<400> 98

aacatcgtgc tgacacagtc tcctgcaacc ctttactgt ctccaggtga acgagcaacc 60

10 ctgagttgta gagccagtca gaggatctcc acgagcattc actggtatca gcaaaagcct 120

gggcaagctc ccagactctt gatcaagtac gcctctcaga gcataagtgg cattccagct 180

aggttttagcg gctcaggctc aggaacagac ttcactctga ccatcagctc cctggaaccg 240

gaggactttg cagtctatta ctgccagcaa tcctactcca gtctgtacac cttcgggcag 300

ggtactaaac tggagataaa g 321

<210> 99

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1102 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser  
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Thr Ile Ile Gln Tyr Gly Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Gln Gly Thr Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Phe Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115

<210> 100

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1002.g4 (cadena pesada)

10 <400> 100

gaagtgcagc tggatgaatc cgggggaggt ttggtgcaac caggtggctc actgagactg 60

agctgtgccg tttccggctt tacgtttctca gacagttata tggcctgggt gcgtcaagca 120

cctggaaaag ggctggagt gattgccagt atcagctatg gtgggacat aatccagtac 180

ggcgatagcg tcaagggcag gtttactatc tccagggaca acgccaagtc aagcctttac 240

ctgcagatga attctctccg cgcagaggat accgctgtgt attactgcgc tagacggcag 300

ggaacctacg ctcgatacct ggacttctgg ggtcagggaa cactcgttac agtctcg 357

<210> 101

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo CDR

20 <400> 101

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Leu His  
1 5 10

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 102  
 Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

5 <210> 103  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 103  
 His Gln Ser Trp Asn Ser Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 104  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 104  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala  
 20 1 5 10

<210> 105  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 105  
 Ile Ile Asn Tyr Asp Ala Ser Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 106  
 30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 106  
 Tyr Gly Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 107  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114

ES 2 729 278 T3

<400> 107

Ala Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Trp Asn Ser Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

- 5 <210> 108
- <211> 321
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114.g2

```
<400> 108
gcgacgcaaa tgactcagtc gccctcatcg cttagcgcgt ccgtcggaga tagagtgacg      60
atcacctgcc gcgcatcaga gtccggtgtcc aactcctcc actggtatca gcagaaaccg      120
gggaaggcac caaaactctt gatctacaaa gccagcaacc ttgcgtccgg tgtcccgta      180
aggttctccg ggagcggttc ggggacagac tttactttga ccatttcgtc gcttcagccg      240
gaggacttcg ccacctatta ctgtcatcag tcatggaact cacctcccac atttgccag      300
ggaacgaaac tcgaaatcaa g                                          321
```

- 15 <210> 109
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>  
<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 109  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ile Ile Asn Tyr Asp Ala Ser Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Tyr Gly Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser  
 115

- 5 <210> 110
- <211> 351
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114.g2 (cadena pesada)

<400> 110  
 gaagtacaac tcgtagagtc agggggtggg ctggtccaac ctggcggctc ccttcggctt 60  
 tcgtgtgccg cctcgggatt cacgtttagc aattacggta tggcctgggt gaggcaggca 120  
 ccaggaagg gtcttgagtg ggtagcgatc atcaactatg atgcaagcac cacccactac 180  
 agggatagcg tcaagggacg ctttactatc agccgggata atgcaaatc ctcgctctat 240  
 ctgcagatga actccctcag agccgaggac accgcagtgt actattgcac acgatacggg 300  
 cgctcgcaact atttcgacta ttggggacag gggacgctcg taactgtctc g 351

- 15 <210> 111
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

- 20 <400> 111  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Leu His  
 1 5 10

- <210> 112
- <211> 7
- <212> PRT
- 25 <213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 112  
 Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

5 <210> 113  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 113  
 His Gln Ser Trp Asn Ser Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 114  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 114  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala  
 20 1 5 10

<210> 115  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 115  
 Ile Ile Asn Tyr Asp Ala Ser Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

<210> 116  
 30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 116  
 Tyr Gly Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 117  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114 injerto 8

ES 2 729 278 T3

<400> 117

Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Trp Asn Ser Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 118

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114.g8

<400> 118

gacacggtcc tgactcagtc gccctcatcg cttagcgcgt ccgtcggaga tagagtgacg 60

atcacctgcc gcgcatcaga gtcggtgtcc acactcctcc actggtatca gcagaaaccg 120

gggaaggcac caaaactcct gatctacaaa gccagcaacc ttgcgtccgg tgtcccgtca 180

aggttctccg ggagcggttc ggggacagac tttactttga ccatttcgtc gcttcagccg 240

gaggacttgc ccacctatta ctgtcatcag tcatggaact cacctccac atttgccag 300

10 ggaacgaaac tcgaaatcaa g 321

<210> 119

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114 injerto 8 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ile Ile Asn Tyr Asp Ala Ser Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Tyr Gly Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser  
115

<210> 120

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1114.g8

<400> 120

gaagtacaac tcgtagagtc agggggtggg ctggtccaac ctggcggctc ccttcggctt 60

tcgtgtgccg cctcgggatt cacgttttagc aattacggta tggcctgggt gaggcaggca 120

ccaggaagg gtcttgagtg ggtagcgatc atcaactatg atgcaagcac caccactac 180

agggatagcg tcaagggacg ctttactatc agccgggata atgcgaaatc ctcgctctat 240

ctgcagatga actccctcag agccgaggac accgcagtgt actattgcac acgatacggg 300

10 cgctcgcact atttcgacta ttggggacag gggacgctcg taactgtctc g 351

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Anticuerpo CDR

<400> 121

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Met Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 122

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 122  
 Asn Thr Asn Lys Leu His Thr  
 1 5

5 <210> 123  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 123  
 Leu Gln His Lys Ser Phe Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 124  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 124  
 Gly Phe Thr Phe Arg Asp Ser Phe Met Ala  
 20 1 5 10

<210> 125  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 125  
 Ser Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

30 Gly

<210> 126  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 126  
 Leu Thr Ile Thr Thr Ser Gly Asp Ser  
 1 5

<210> 127  
 40 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1125

ES 2 729 278 T3

<400> 127

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Met Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Thr Asn Lys Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Phe Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 128

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1125.g2

10

<400> 128

gatatacaaa tgactcagag ccctagctca ctgagcgctt ctgtgggcga tcgtgtgaca 60

atcacttgca aagcaagcca gaacatctat atgtacctga attggtacca gcaaaaaccg 120

ggaaaagctc ccaagcgctt gatttacaac accaataagc tgcataccgg cgtgccaagc 180

cgttttagcg gatctggctc tggaaccgaa tatacactga ccataagctc cctgcaaccg 240

gaagactttg caacttacta ttgcctccag cacaaatcct tcccctatac gttcggacaa 300

gggaccaaac tggaaatcaa a 321

<210> 129

<211> 118

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1125 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 129

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Ser  
20 25 30

Phe Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Thr Ile Thr Thr Ser Gly Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 130

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1125.g2 (cadena pesada)

10 <400> 130

gaagtgcagc tggtcgaaag cggcggagga ttggtgcaac ctggtggctc tcttcgcctg 60

tcttcgcctg caagcggctt tacgttccgc gatagcttta tggcttgggt gcgacaagct 120

cctgggaaag ggctggaatg ggctgctagc ataagctacg aaggcgacaa gacttactat 180

ggggactctg tgaaggccg attcaccatt agccgagaca acgcaaagaa ctccctgtac 240

ctgcagatga actccctgcg tgccgaagat accgccgtgt actattgcbc taggctgacg 300

atcactacaa gcggagatag ctggggacaa gggacaatgg tgaccgtctc gagc 354

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo CDR

<400> 131

Lys Ala Ser Gln His Val Gly Thr Asn Val Asp  
1 5 10

20 <210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 132  
 Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Thr  
 1 5

5 <210> 133  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Anticuerpo CDR

<400> 133  
 Leu Gln Tyr Asn Tyr Asn Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 134  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 134  
 Gly Phe Ile Phe Ser Asn Phe Gly Met Ser  
 20 1 5 10

<210> 135  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 135  
 Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 136  
 30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 136  
 Arg Ala Tyr Ser Ser Pro Phe Ala Phe  
 1 5

<210> 137  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1129

ES 2 729 278 T3

<400> 137

Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln His Val Gly Thr Asn  
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Tyr Asn Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

- 5 <210> 138
- <211> 321
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1129.g1

<400> 138

gacaccaga tgactcagtc tccgtcaagc ctttctgcct ctggtggaga tcgagtcaca 60  
 attacgtgca aggcaagcca acacgtgggt accaacgtgg actggtatca acagaagcca 120  
 gggaaaggtcc ccaaactgct gatctacggt gccagtattc gctataccgg cgtgcctgat 180  
 cgcttcaccg gaagcgggtc agggaccgat ttcacactga caatcagctc cctgcaacct 240  
 gaagacgtgg ctacttacta ctgcctgcag tacaactata atccctacac ctttgccag 300  
 ggcaccaaac tggagataaa g 321

- 15 <210> 139
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1129 (cadena pesada)

20 <400> 139

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Phe  
20 25 30

ES 2 729 278 T3

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Arg Ala Tyr Ser Ser Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 140  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1129.g1(cadena pesada)

10 <400> 140  
 gaggtgcaac ttgtggaatc aggaggtggc gtggttcagc ccggtagatc acttcgtctg 60  
 agttgtgcaa caagcggcctt tatcttctcc aacttcggga tgtcttgggt tagacaggct 120  
 cctggttaagg gcctcgaatg ggtggctagt attagcccaa gcgggggaaa cgcctactat 180  
 agggacagcg tgaaggacg cttcactatc agccgagata actccaagac cacgctgtat 240  
 ctgcagatga atagtctgag ggccgaggat accgcagtgt actactgcac tcgacgggcc 300  
 tattcttccc cttttgcctt ttggggacag gggactctgg tgacagtctc gage 354

15 <210> 141  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 141  
 Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn His Leu Ala  
 1 5 10

20 <210> 142  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 142  
 Ser Gly Ser Thr Leu Gln Pro  
 1 5

ES 2 729 278 T3

<210> 143  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
 <400> 143  
 Gln Gln Tyr Asp Glu Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
 10 <210> 144  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
 15 <400> 144  
 Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Thr  
 1 5 10  
 <210> 145  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR  
 <400> 145  
 Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 25 <210> 146  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> Anticuerpo CDR  
 <400> 146  
 Pro Arg Trp Tyr Pro Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 35 <210> 147  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1134

ES 2 729 278 T3

<400> 147

Asp Val Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn His  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

His Ser Gly Ser Thr Leu Gln Pro Gly Thr Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Glu Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 148

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1134.g5

<400> 148

gacgtccagc tcaactcaatc tccctccttt ctgtctgctt ctgtgggcga tcgcgtgaca 60

ataacctgca aggcctccaa atcaattagc aaccatctgg catggtatca ggagaagcct 120

ggcaaagcca ataagctgct gatccactcc ggctcaactc tgcaaccggt tacccaagc 180

cgatttagcg gatctgggag cggaaccgag ttcacactta ccattagctc cctgcaaccg 240

10 gaggacttgc ccacctatta ctgccagcaa tacgacgaat acccctatac gttcggccaa 300

gggacaagat tggaaatcaa g 321

<210> 149

<211> 118

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1134 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 149

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr  
20 25 30

Thr Ile Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
85 90 95

Arg Pro Arg Trp Tyr Pro Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser  
115

<210> 150

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1134.g5 (cadena pesada)

10 <400> 150

gaagttcagc tgcaggaatc tggacctggc ttggtgaaac caagcgagac acttagtctc 60

acttgaccg tttccggctt ctcccttaat tcctacacga tcaactgggt gcggcaacca 120

cccgggaaag gactggaatg gatcgagcc attagcggg gagggagcac ctatttcaac 180

tcggctctca agagccgct gaccatatcc cgtgacacaa gcaagagcca ggtttccctg 240

aagctgagct ccgtgactgc tgccgatacg gctgtttact attgcaccg acctcgctgg 300

tatccccgtt cctatttcga ctactgggga agaggcacac tggttaccgt ctcg 354

<210> 151

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo CDR

20 <400> 151

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn Val Ala  
1 5 10

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 152  
 Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr  
 1 5

5 <210> 153  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 153  
 Gln Arg Val Tyr Gln Ser Thr Trp Thr  
 1 5

15 <210> 154  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 154  
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Val His  
 1 5 10

20 <210> 155  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo CDR

<400> 155  
 Cys Ile Arg Thr Gly Gly Asn Thr Glu Tyr Gln Ser Glu Phe Lys Ser  
 1 5 10 15

30 <210> 156  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo CDR

35 <400> 156  
 Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr  
 1 5

<210> 157  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1151

ES 2 729 278 T3

<400> 157

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Val Tyr Gln Ser Thr Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

- 5 <210> 158
- <211> 321
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> Polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1151.g1

<400> 158

gcgattcaaa tgactcagtc gccctcatcg cttagcgcgt ccgtcggaga tagagtgacg 60  
atcacgtgca aagcatcaca aaatgtcggg aacaatgtgg catggtatca gcataaaccg 120  
gggaaggcac caaaactctt gatctactac gccagcaaca ggtttactgg tgtcccgtca 180  
aggttcacgg gaggggggta cgggacagac tttactttga ccatttcgtc gtttcagccg 240  
gaggacttgc ccacctatta ctgtcagagg gtctaccagt caacgtggac atttgccag 300  
ggaacgaaag tggaaatcaa g 321

<210> 159

<211> 114

- 15 <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1151 (cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 159

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Cys Ile Arg Thr Gly Gly Asn Thr Glu Tyr Gln Ser Glu Phe Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser

- 5 <210> 160
- <211> 342
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1151.g4 (cadena pesada)

<400> 160

gaagtacaac tccaagagtc ggggcctggt ctggtcaagc cgtccgaaac actttcgctg	60
acgtgtacgg tatcaggatt ctcaactaca tcatactacg tccactgggt gaggcagcca	120
cccgggaagg gtcttgagtg gatgggctgc attagaaccg gagggaatac cgagtaccag	180
agcgaattta agagccgcgt cactatcagc cgggatacgt ccaaaaacca ggtgtcgctc	240
aaattgtcct ccgtgacggc cgctgacacc gcagtgtact attgcgcgcg aggaaactat	300
ggctttgcgt attggggaca ggggacgctc gtaactgtct cg	342

- 15 <210> 161
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo CDR

- 20 <400> 161

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Tyr Leu Asp  
1 5 10

- <210> 162
- <211> 7
- <212> PRT
- 25 <213> Artificial

```

<220>
<223> Anticuerpo CDR

<400> 162
Asn Ile Gln Ser Leu His Thr
1           5

5  <210> 163
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
10  <223> Anticuerpo CDR

    <400> 163
    Phe Gln His Asn Ser Gly Trp
    1           5

    <210> 164
    <211> 10
15  <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
    <223> Anticuerpo CDR

    <400> 164
    Gly Phe Thr Phe Thr Gln Ala Ala Met Phe
20  1           5           10

    <210> 165
    <211> 19
    <212> PRT
    <213> Artificial

25  <220>
    <223> Anticuerpo CDR

    <400> 165
    Arg Ile Ser Thr Lys Ser Asn Asn Phe Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
    1           5           10           15

    Val Lys Gly

    <210> 166
30  <211> 13
    <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
    <223> Anticuerpo CDR

35  <400> 166
    Pro Ala Tyr Tyr Tyr Asp Gly Thr Val Pro Phe Ala Tyr
    1           5           10

    <210> 167
    <211> 106
    <212> PRT
40  <213> Artificial

    <220>
    <223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1153.g8

```

ES 2 729 278 T3

<400> 167

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ile Gln Ser Leu His Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln His Asn Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 168

<211> 318

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1153.g8

10

<400> 168

gatatacaga tgactcagtc cccttctagc ctttcagctt ccgtgggcga tagagtgact 60

atcacgtgta aggctagtca gaacattaac aagtatctgg actggtacca gcagaaaccc 120

gggaagggtc ccaagctgct gatctacaac atccagtccc tgcatacagg cattcctagc 180

cggtttagcg gatctggttc agggaccgac ttcaccctga caatcagctc tctgcaacca 240

gaagacgtgg ccacctatta ctgcttcag cacaatagtg gctggacttt tggacaaggt 300

accaggctgg agatcaaa 318

<210> 169

<211> 123

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1153 (injerto 8 cadena pesada)

ES 2 729 278 T3

<400> 169

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gln Ala  
20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Gly Ile  
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Thr Lys Ser Asn Asn Phe Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Pro Ala Tyr Tyr Tyr Asp Gly Thr Val Pro Phe Ala  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115 120

<210> 170

<211> 369

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica la región variable del anticuerpo para el anticuerpo anti-TcdB 1153.g8 (cadena pesada)

10 <400> 170

gaggttcagc tgggtggaatc aggaggggggt ctggtgcaac caggaggctc cctgaaactg 60

tcttgccgca caagcggcctt tacgtttacc caggccgcta tgttctgggt taggcaggcc 120

agtgggaagg gtcttgaagg catcgcaaga atcagcacca agagcaacaa tttcgctacg 180

tactatccgg actccgtgaa aggccggttt accatctctc gcgatgacag caagaacacc 240

gtgtacctgc agatgaacag tctcaagacc gaggacacag cctgtacta ttgtactgct 300

cccgcctatt attacgatgg cacagtgcct ttcgcatact ggggacaggg tactttgggt 360

actgtctcg 369

<210> 171

<211> 2710

<212> PRT

15 <213> Clostridia

ES 2 729 278 T3

<400> 171

Met Ser Leu Ile Ser Lys Glu Glu Leu Ile Lys Leu Ala Tyr Ser Ile  
 1 5 10 15

Arg Pro Arg Glu Asn Glu Tyr Lys Thr Ile Leu Thr Asn Leu Asp Glu  
 20 25 30

Tyr Asn Lys Leu Thr Thr Asn Asn Asn Glu Asn Lys Tyr Leu Gln Leu  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asp Val Phe Met Asn Lys Tyr Lys Thr  
 50 55 60

Ser Ser Arg Asn Arg Ala Leu Ser Asn Leu Lys Lys Asp Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

Glu Val Ile Leu Ile Lys Asn Ser Asn Thr Ser Pro Val Glu Lys Asn  
 85 90 95

Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Glu Val Ser Asp Ile Ala Leu Glu  
 100 105 110

Tyr Ile Lys Gln Trp Ala Asp Ile Asn Ala Glu Tyr Asn Ile Lys Leu  
 115 120 125

Trp Tyr Asp Ser Glu Ala Phe Leu Val Asn Thr Leu Lys Lys Ala Ile  
 130 135 140

Val Glu Ser Ser Thr Thr Glu Ala Leu Gln Leu Leu Glu Glu Glu Ile  
 145 150 155 160

Gln Asn Pro Gln Phe Asp Asn Met Lys Phe Tyr Lys Lys Arg Met Glu  
 165 170 175

Phe Ile Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Phe Ile Asn Tyr Tyr Lys Ser Gln  
 180 185 190

Ile Asn Lys Pro Thr Val Pro Thr Ile Asp Asp Ile Ile Lys Ser His  
 195 200 205

Leu Val Ser Glu Tyr Asn Arg Asp Glu Thr Val Leu Glu Ser Tyr Arg  
 210 215 220

Thr Asn Ser Leu Arg Lys Ile Asn Ser Asn His Gly Ile Asp Ile Arg  
 225 230 235 240

Ala Asn Ser Leu Phe Thr Glu Gln Glu Leu Leu Asn Ile Tyr Ser Gln  
 245 250 255

ES 2 729 278 T3

Glu Leu Leu Asn Arg Gly Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Val Arg  
 260 265 270  
 Leu Leu Ala Leu Lys Asn Phe Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met  
 275 280 285  
 Leu Pro Gly Ile His Ser Asp Leu Phe Lys Thr Ile Ser Arg Pro Ser  
 290 295 300  
 Ser Ile Gly Leu Asp Arg Trp Glu Met Ile Lys Leu Glu Ala Ile Met  
 305 310 315 320  
 Lys Tyr Lys Lys Tyr Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Glu Asn Phe Asp Lys  
 325 330 335  
 Leu Asp Gln Gln Leu Lys Asp Asn Phe Lys Leu Ile Ile Glu Ser Lys  
 340 345 350  
 Ser Glu Lys Ser Glu Ile Phe Ser Lys Leu Glu Asn Leu Asn Val Ser  
 355 360 365  
 Asp Leu Glu Ile Lys Ile Ala Phe Ala Leu Gly Ser Val Ile Asn Gln  
 370 375 380  
 Ala Leu Ile Ser Lys Gln Gly Ser Tyr Leu Thr Asn Leu Val Ile Glu  
 385 390 395 400  
 Gln Val Lys Asn Arg Tyr Gln Phe Leu Asn Gln His Leu Asn Pro Ala  
 405 410 415  
 Ile Glu Ser Asp Asn Asn Phe Thr Asp Thr Thr Lys Ile Phe His Asp  
 420 425 430  
 Ser Leu Phe Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asn Ser Met Phe Leu Thr Lys  
 435 440 445  
 Ile Ala Pro Tyr Leu Gln Val Gly Phe Met Pro Glu Ala Arg Ser Thr  
 450 455 460  
 Ile Ser Leu Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Ala Ser Ala Tyr Tyr Asp Phe  
 465 470 475 480  
 Ile Asn Leu Gln Glu Asn Thr Ile Glu Lys Thr Leu Lys Ala Ser Asp  
 485 490 495  
 Leu Ile Glu Phe Lys Phe Pro Glu Asn Asn Leu Ser Gln Leu Thr Glu



ES 2 729 278 T3

Arg Lys Glu Leu Leu Ala His Ser Gly Lys Trp Ile Asn Lys Glu Glu  
755 760 765

Ala Ile Met Ser Asp Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ile Phe Phe Asp Ser  
770 775 780

Ile Asp Asn Lys Leu Lys Ala Lys Ser Lys Asn Ile Pro Gly Leu Ala  
785 790 795 800

Ser Ile Ser Glu Asp Ile Lys Thr Leu Leu Leu Asp Ala Ser Val Ser  
805 810 815

Pro Asp Thr Lys Phe Ile Leu Asn Asn Leu Lys Leu Asn Ile Glu Ser  
820 825 830

Ser Ile Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Glu Lys Leu Glu Pro Val Lys Asn  
835 840 845

Ile Ile His Asn Ser Ile Asp Asp Leu Ile Asp Glu Phe Asn Leu Leu  
850 855 860

Glu Asn Val Ser Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Lys Lys Leu Asn Asn Leu  
865 870 875 880

Asp Glu Lys Tyr Leu Ile Ser Phe Glu Asp Ile Ser Lys Asn Asn Ser  
885 890 895

Thr Tyr Ser Val Arg Phe Ile Asn Lys Ser Asn Gly Glu Ser Val Tyr  
900 905 910

Val Glu Thr Glu Lys Glu Ile Phe Ser Lys Tyr Ser Glu His Ile Thr  
915 920 925

Lys Glu Ile Ser Thr Ile Lys Asn Ser Ile Ile Thr Asp Val Asn Gly  
930 935 940

Asn Leu Leu Asp Asn Ile Gln Leu Asp His Thr Ser Gln Val Asn Thr  
945 950 955 960

Leu Asn Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Asp Tyr Ser Ser Asn  
965 970 975

Lys Asp Val Leu Asn Asp Leu Ser Thr Ser Val Lys Val Gln Leu Tyr  
980 985 990

Ala Gln Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Tyr Asp Ser Ile Gln  
995 1000 1005

ES 2 729 278 T3

Leu Val Asn Leu Ile Ser Asn Ala Val Asn Asp Thr Ile Asn Val  
 1010 1015 1020  
 Leu Pro Thr Ile Thr Glu Gly Ile Pro Ile Val Ser Thr Ile Leu  
 1025 1030 1035  
 Asp Gly Ile Asn Leu Gly Ala Ala Ile Lys Glu Leu Leu Asp Glu  
 1040 1045 1050  
 His Asp Pro Leu Leu Lys Lys Glu Leu Glu Ala Lys Val Gly Val  
 1055 1060 1065  
 Leu Ala Ile Asn Met Ser Leu Ser Ile Ala Ala Thr Val Ala Ser  
 1070 1075 1080  
 Ile Val Gly Ile Gly Ala Glu Val Thr Ile Phe Leu Leu Pro Ile  
 1085 1090 1095  
 Ala Gly Ile Ser Ala Gly Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu  
 1100 1105 1110  
 Ile Leu His Asp Lys Ala Thr Ser Val Val Asn Tyr Phe Asn His  
 1115 1120 1125  
 Leu Ser Glu Ser Lys Lys Tyr Gly Pro Leu Lys Thr Glu Asp Asp  
 1130 1135 1140  
 Lys Ile Leu Val Pro Ile Asp Asp Leu Val Ile Ser Glu Ile Asp  
 1145 1150 1155  
 Phe Asn Asn Asn Ser Ile Lys Leu Gly Thr Cys Asn Ile Leu Ala  
 1160 1165 1170  
 Met Glu Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr Gly Asn Ile Asp His  
 1175 1180 1185  
 Phe Phe Ser Ser Pro Ser Ile Ser Ser His Ile Pro Ser Leu Ser  
 1190 1195 1200  
 Ile Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Glu Thr Glu Asn Leu Asp Phe Ser  
 1205 1210 1215  
 Lys Lys Ile Met Met Leu Pro Asn Ala Pro Ser Arg Val Phe Trp  
 1220 1225 1230  
 Trp Glu Thr Gly Ala Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Glu Asn Asp  
 1235 1240 1245

ES 2 729 278 T3

Gly Thr Arg Leu Leu Asp Ser Ile Arg Asp Leu Tyr Pro Gly Lys  
 1250 1255 1260

Phe Tyr Trp Arg Phe Tyr Ala Phe Phe Asp Tyr Ala Ile Thr Thr  
 1265 1270 1275

Leu Lys Pro Val Tyr Glu Asp Thr Asn Ile Lys Ile Lys Leu Asp  
 1280 1285 1290

Lys Asp Thr Arg Asn Phe Ile Met Pro Thr Ile Thr Thr Asn Glu  
 1295 1300 1305

Ile Arg Asn Lys Leu Ser Tyr Ser Phe Asp Gly Ala Gly Gly Thr  
 1310 1315 1320

Tyr Ser Leu Leu Leu Ser Ser Tyr Pro Ile Ser Thr Asn Ile Asn  
 1325 1330 1335

Leu Ser Lys Asp Asp Leu Trp Ile Phe Asn Ile Asp Asn Glu Val  
 1340 1345 1350

Arg Glu Ile Ser Ile Glu Asn Gly Thr Ile Lys Lys Gly Lys Leu  
 1355 1360 1365

Ile Lys Asp Val Leu Ser Lys Ile Asp Ile Asn Lys Asn Lys Leu  
 1370 1375 1380

Ile Ile Gly Asn Gln Thr Ile Asp Phe Ser Gly Asp Ile Asp Asn  
 1385 1390 1395

Lys Asp Arg Tyr Ile Phe Leu Thr Cys Glu Leu Asp Asp Lys Ile  
 1400 1405 1410

Ser Leu Ile Ile Glu Ile Asn Leu Val Ala Lys Ser Tyr Ser Leu  
 1415 1420 1425

Leu Leu Ser Gly Asp Lys Asn Tyr Leu Ile Ser Asn Leu Ser Asn  
 1430 1435 1440

Thr Ile Glu Lys Ile Asn Thr Leu Gly Leu Asp Ser Lys Asn Ile  
 1445 1450 1455

Ala Tyr Asn Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Asn Lys Tyr Phe Gly Ala  
 1460 1465 1470

Ile Ser Lys Thr Ser Gln Lys Ser Ile Ile His Tyr Lys Lys Asp

ES 2 729 278 T3

1475		1480		1485
Ser Lys Asn Ile Leu Glu Phe Tyr Asn Asp Ser Thr Leu Glu Phe 1490		1495		1500
Asn Ser Lys Asp Phe Ile Ala Glu Asp Ile Asn Val Phe Met Lys 1505		1510		1515
Asp Asp Ile Asn Thr Ile Thr Gly Lys Tyr Tyr Val Asp Asn Asn 1520		1525		1530
Thr Asp Lys Ser Ile Asp Phe Ser Ile Ser Leu Val Ser Lys Asn 1535		1540		1545
Gln Val Lys Val Asn Gly Leu Tyr Leu Asn Glu Ser Val Tyr Ser 1550		1555		1560
Ser Tyr Leu Asp Phe Val Lys Asn Ser Asp Gly His His Asn Thr 1565		1570		1575
Ser Asn Phe Met Asn Leu Phe Leu Asp Asn Ile Ser Phe Trp Lys 1580		1585		1590
Leu Phe Gly Phe Glu Asn Ile Asn Phe Val Ile Asp Lys Tyr Phe 1595		1600		1605
Thr Leu Val Gly Lys Thr Asn Leu Gly Tyr Val Glu Phe Ile Cys 1610		1615		1620
Asp Asn Asn Lys Asn Ile Asp Ile Tyr Phe Gly Glu Trp Lys Thr 1625		1630		1635
Ser Ser Ser Lys Ser Thr Ile Phe Ser Gly Asn Gly Arg Asn Val 1640		1645		1650
Val Val Glu Pro Ile Tyr Asn Pro Asp Thr Gly Glu Asp Ile Ser 1655		1660		1665
Thr Ser Leu Asp Phe Ser Tyr Glu Pro Leu Tyr Gly Ile Asp Arg 1670		1675		1680
Tyr Ile Asn Lys Val Leu Ile Ala Pro Asp Leu Tyr Thr Ser Leu 1685		1690		1695
Ile Asn Ile Asn Thr Asn Tyr Tyr Ser Asn Glu Tyr Tyr Pro Glu 1700		1705		1710

ES 2 729 278 T3

Ile Ile Val Leu Asn Pro Asn Thr Phe His Lys Lys Val Asn Ile  
 1715 1720 1725

Asn Leu Asp Ser Ser Ser Phe Glu Tyr Lys Trp Ser Thr Glu Gly  
 1730 1735 1740

Ser Asp Phe Ile Leu Val Arg Tyr Leu Glu Glu Ser Asn Lys Lys  
 1745 1750 1755

Ile Leu Gln Lys Ile Arg Ile Lys Gly Ile Leu Ser Asn Thr Gln  
 1760 1765 1770

Ser Phe Asn Lys Met Ser Ile Asp Phe Lys Asp Ile Lys Lys Leu  
 1775 1780 1785

Ser Leu Gly Tyr Ile Met Ser Asn Phe Lys Ser Phe Asn Ser Glu  
 1790 1795 1800

Asn Glu Leu Asp Arg Asp His Leu Gly Phe Lys Ile Ile Asp Asn  
 1805 1810 1815

Lys Thr Tyr Tyr Tyr Asp Glu Asp Ser Lys Leu Val Lys Gly Leu  
 1820 1825 1830

Ile Asn Ile Asn Asn Ser Leu Phe Tyr Phe Asp Pro Ile Glu Phe  
 1835 1840 1845

Asn Leu Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr  
 1850 1855 1860

Phe Asp Ile Asn Thr Gly Ala Ala Leu Thr Ser Tyr Lys Ile Ile  
 1865 1870 1875

Asn Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn Asn Asp Gly Val Met Gln Leu  
 1880 1885 1890

Gly Val Phe Lys Gly Pro Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala  
 1895 1900 1905

Asn Thr Gln Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln  
 1910 1915 1920

Ser Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn  
 1925 1930 1935

Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Arg Ile Ile Asn Asn Glu Lys  
 1940 1945 1950

ES 2 729 278 T3

Tyr Tyr Phe Asn Pro Asn Asn Ala Ile Ala Ala Val Gly Leu Gln  
 1955 1960 1965  
  
 Val Ile Asp Asn Asn Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Asp Thr Ala Ile  
 1970 1975 1980  
  
 Ile Ser Lys Gly Trp Gln Thr Val Asn Gly Ser Arg Tyr Tyr Phe  
 1985 1990 1995  
  
 Asp Thr Asp Thr Ala Ile Ala Phe Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp  
 2000 2005 2010  
  
 Gly Lys His Phe Tyr Phe Asp Ser Asp Cys Val Val Lys Ile Gly  
 2015 2020 2025  
  
 Val Phe Ser Thr Ser Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn  
 2030 2035 2040  
  
 Thr Tyr Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln Ser  
 2045 2050 2055  
  
 Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn  
 2060 2065 2070  
  
 Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu Gln Thr Ile Asp Ser Lys Lys Tyr  
 2075 2080 2085  
  
 Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr  
 2090 2095 2100  
  
 Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Glu Ala  
 2105 2110 2115  
  
 Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn  
 2120 2125 2130  
  
 Thr Asn Thr Ala Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Asn Gly  
 2135 2140 2145  
  
 Lys His Phe Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val  
 2150 2155 2160  
  
 Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr  
 2165 2170 2175  
  
 Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Glu  
 2180 2185 2190

ES 2 729 278 T3

Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser  
 2195 2200 2205  
  
 Lys Ala Val Thr Gly Trp Arg Ile Ile Asn Asn Lys Lys Tyr Tyr  
 2210 2215 2220  
  
 Phe Asn Pro Asn Asn Ala Ile Ala Ala Ile His Leu Cys Thr Ile  
 2225 2230 2235  
  
 Asn Asn Asp Lys Tyr Tyr Phe Ser Tyr Asp Gly Ile Leu Gln Asn  
 2240 2245 2250  
  
 Gly Tyr Ile Thr Ile Glu Arg Asn Asn Phe Tyr Phe Asp Ala Asn  
 2255 2260 2265  
  
 Asn Glu Ser Lys Met Val Thr Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly  
 2270 2275 2280  
  
 Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu  
 2285 2290 2295  
  
 Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly  
 2300 2305 2310  
  
 Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp  
 2315 2320 2325  
  
 Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala  
 2330 2335 2340  
  
 Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr  
 2345 2350 2355  
  
 Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile  
 2360 2365 2370  
  
 Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Phe Ile Ala Ser  
 2375 2380 2385  
  
 Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn Thr  
 2390 2395 2400  
  
 Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe  
 2405 2410 2415  
  
 Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly

ES 2 729 278 T3

2420		2425		2430
Gln Ala	Ile Leu Tyr	Gln Asn	Lys Phe Leu Thr	Leu Asn Gly Lys
2435		2440		2445
Lys Tyr	Tyr Phe Gly Ser	Asp	Ser Lys Ala Val	Thr Gly Leu Arg
2450		2455		2460
Thr Ile	Asp Gly Lys Lys	Tyr	Tyr Phe Asn Thr	Asn Thr Ala Val
2465		2470		2475
Ala Val	Thr Gly Trp Gln	Thr	Ile Asn Gly Lys	Lys Tyr Tyr Phe
2480		2485		2490
Asn Thr	Asn Thr Ser Ile	Ala	Ser Thr Gly Tyr	Thr Ile Ile Ser
2495		2500		2505
Gly Lys	His Phe Tyr Phe	Asn	Thr Asp Gly Ile	Met Gln Ile Gly
2510		2515		2520
Val Phe	Lys Gly Pro Asp	Gly	Phe Glu Tyr Phe	Ala Pro Ala Asn
2525		2530		2535
Thr Asp	Ala Asn Asn Ile	Glu	Gly Gln Ala Ile	Arg Tyr Gln Asn
2540		2545		2550
Arg Phe	Leu Tyr Leu His	Asp	Asn Ile Tyr Tyr	Phe Gly Asn Asn
2555		2560		2565
Ser Lys	Ala Ala Thr Gly	Trp	Val Thr Ile Asp	Gly Asn Arg Tyr
2570		2575		2580
Tyr Phe	Glu Pro Asn Thr	Ala	Met Gly Ala Asn	Gly Tyr Lys Thr
2585		2590		2595
Ile Asp	Asn Lys Asn Phe	Tyr	Phe Arg Asn Gly	Leu Pro Gln Ile
2600		2605		2610
Gly Val	Phe Lys Gly Ser	Asn	Gly Phe Glu Tyr	Phe Ala Pro Ala
2615		2620		2625
Asn Thr	Asp Ala Asn Asn	Ile	Glu Gly Gln Ala	Ile Arg Tyr Gln
2630		2635		2640
Asn Arg	Phe Leu His Leu	Leu	Gly Lys Ile Tyr	Tyr Phe Gly Asn
2645		2650		2655

ES 2 729 278 T3

Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Val  
 2660 2665 2670

Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu  
 2675 2680 2685

Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val  
 2690 2695 2700

Lys Ala Pro Gly Ile Tyr Gly  
 2705 2710

<210> 172  
 <211> 2366  
 <212> PRT  
 <213> Clostridia

<400> 172

Met Ser Leu Val Asn Arg Lys Gln Leu Glu Lys Met Ala Asn Val Arg  
 1 5 10 15

Phe Arg Thr Gln Glu Asp Glu Tyr Val Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu  
 20 25 30

Glu Tyr His Asn Met Ser Glu Asn Thr Val Val Glu Lys Tyr Leu Lys  
 35 40 45

Leu Lys Asp Ile Asn Ser Leu Thr Asp Ile Tyr Ile Asp Thr Tyr Lys  
 50 55 60

Lys Ser Gly Arg Asn Lys Ala Leu Lys Lys Phe Lys Glu Tyr Leu Val  
 65 70 75 80

Thr Glu Val Leu Glu Leu Lys Asn Asn Asn Leu Thr Pro Val Glu Lys  
 85 90 95

Asn Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Gln Ile Asn Asp Thr Ala Ile  
 100 105 110

Asn Tyr Ile Asn Gln Trp Lys Asp Val Asn Ser Asp Tyr Asn Val Asn  
 115 120 125

Val Phe Tyr Asp Ser Asn Ala Phe Leu Ile Asn Thr Leu Lys Lys Thr  
 130 135 140

Val Val Glu Ser Ala Ile Asn Asp Thr Leu Glu Ser Phe Arg Glu Asn  
 145 150 155 160

ES 2 729 278 T3

Leu Asn Asp Pro Arg Phe Asp Tyr Asn Lys Phe Phe Arg Lys Arg Met  
 165 170 175  
 Glu Ile Ile Tyr Asp Lys Gln Lys Asn Phe Ile Asn Tyr Tyr Lys Ala  
 180 185 190  
 Gln Arg Glu Glu Asn Pro Glu Leu Ile Ile Asp Asp Ile Val Lys Thr  
 195 200 205  
 Tyr Leu Ser Asn Glu Tyr Ser Lys Glu Ile Asp Glu Leu Asn Thr Tyr  
 210 215 220  
 Ile Glu Glu Ser Leu Asn Lys Ile Thr Gln Asn Ser Gly Asn Asp Val  
 225 230 235 240  
 Arg Asn Phe Glu Glu Phe Lys Asn Gly Glu Ser Phe Asn Leu Tyr Glu  
 245 250 255  
 Gln Glu Leu Val Glu Arg Trp Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Leu  
 260 265 270  
 Arg Ile Ser Ala Leu Lys Glu Ile Gly Gly Met Tyr Leu Asp Val Asp  
 275 280 285  
 Met Leu Pro Gly Ile Gln Pro Asp Leu Phe Glu Ser Ile Glu Lys Pro  
 290 295 300  
 Ser Ser Val Thr Val Asp Phe Trp Glu Met Thr Lys Leu Glu Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Met Lys Tyr Lys Glu Tyr Ile Pro Glu Tyr Thr Ser Glu His Phe Asp  
 325 330 335  
 Met Leu Asp Glu Glu Val Gln Ser Ser Phe Glu Ser Val Leu Ala Ser  
 340 345 350  
 Lys Ser Asp Lys Ser Glu Ile Phe Ser Ser Leu Gly Asp Met Glu Ala  
 355 360 365  
 Ser Pro Leu Glu Val Lys Ile Ala Phe Asn Ser Lys Gly Ile Ile Asn  
 370 375 380  
 Gln Gly Leu Ile Ser Val Lys Asp Ser Tyr Cys Ser Asn Leu Ile Val  
 385 390 395 400  
 Lys Gln Ile Glu Asn Arg Tyr Lys Ile Leu Asn Asn Ser Leu Asn Pro  
 405 410 415

ES 2 729 278 T3

Ala Ile Ser Glu Asp Asn Asp Phe Asn Thr Thr Thr Asn Thr Phe Ile  
420 425 430

Asp Ser Ile Met Ala Glu Ala Asn Ala Asp Asn Gly Arg Phe Met Met  
435 440 445

Glu Leu Gly Lys Tyr Leu Arg Val Gly Phe Phe Pro Asp Val Lys Thr  
450 455 460

Thr Ile Asn Leu Ser Gly Pro Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Tyr Gln Asp  
465 470 475 480

Leu Leu Met Phe Lys Glu Gly Ser Met Asn Ile His Leu Ile Glu Ala  
485 490 495

Asp Leu Arg Asn Phe Glu Ile Ser Lys Thr Asn Ile Ser Gln Ser Thr  
500 505 510

Glu Gln Glu Met Ala Ser Leu Trp Ser Phe Asp Asp Ala Arg Ala Lys  
515 520 525

Ala Gln Phe Glu Glu Tyr Lys Arg Asn Tyr Phe Glu Gly Ser Leu Gly  
530 535 540

Glu Asp Asp Asn Leu Asp Phe Ser Gln Asn Ile Val Val Asp Lys Glu  
545 550 555 560

Tyr Leu Leu Glu Lys Ile Ser Ser Leu Ala Arg Ser Ser Glu Arg Gly  
565 570 575

Tyr Ile His Tyr Ile Val Gln Leu Gln Gly Asp Lys Ile Ser Tyr Glu  
580 585 590

Ala Ala Cys Asn Leu Phe Ala Lys Thr Pro Tyr Asp Ser Val Leu Phe  
595 600 605

Gln Lys Asn Ile Glu Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Tyr Tyr Asn Pro Gly  
610 615 620

Asp Gly Glu Ile Gln Glu Ile Asp Lys Tyr Lys Ile Pro Ser Ile Ile  
625 630 635 640

Ser Asp Arg Pro Lys Ile Lys Leu Thr Phe Ile Gly His Gly Lys Asp  
645 650 655

Glu Phe Asn Thr Asp Ile Phe Ala Gly Phe Asp Val Asp Ser Leu Ser  
660 665 670

ES 2 729 278 T3

Thr Glu Ile Glu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Lys Glu Asp Ile Ser Pro  
 675 680 685  
 Lys Ser Ile Glu Ile Asn Leu Leu Gly Cys Asn Met Phe Ser Tyr Ser  
 690 695 700  
 Ile Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Leu Lys Val Lys  
 705 710 715 720  
 Asp Lys Ile Ser Glu Leu Met Pro Ser Ile Ser Gln Asp Ser Ile Ile  
 725 730 735  
 Val Ser Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly Arg Arg  
 740 745 750  
 Glu Leu Leu Asp His Ser Gly Glu Trp Ile Asn Lys Glu Glu Ser Ile  
 755 760 765  
 Ile Lys Asp Ile Ser Ser Lys Glu Tyr Ile Ser Phe Asn Pro Lys Glu  
 770 775 780  
 Asn Lys Ile Thr Val Lys Ser Lys Asn Leu Pro Glu Leu Ser Thr Leu  
 785 790 795 800  
 Leu Gln Glu Ile Arg Asn Asn Ser Asn Ser Ser Asp Ile Glu Leu Glu  
 805 810 815  
 Glu Lys Val Met Leu Thr Glu Cys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile  
 820 825 830  
 Asp Thr Gln Ile Val Glu Glu Arg Ile Glu Glu Ala Lys Asn Leu Thr  
 835 840 845  
 Ser Asp Ser Ile Asn Tyr Ile Lys Asp Glu Phe Lys Leu Ile Glu Ser  
 850 855 860  
 Ile Ser Asp Ala Leu Cys Asp Leu Lys Gln Gln Asn Glu Leu Glu Asp  
 865 870 875 880  
 Ser His Phe Ile Ser Phe Glu Asp Ile Ser Glu Thr Asp Glu Gly Phe  
 885 890 895  
 Ser Ile Arg Phe Ile Asn Lys Glu Thr Gly Glu Ser Ile Phe Val Glu  
 900 905 910  
 Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ser Glu Tyr Ala Asn His Ile Thr Glu Glu

ES 2 729 278 T3

915	920	925										
Ile Ser Lys	Ile Lys Gly	Thr Ile Phe Asp	Thr Val Asn Gly	Lys Leu								
930		935		940								
Val Lys Lys	Val Asn Leu Asp	Thr Thr His	Glu Val Asn Thr	Leu Asn								
945		950		955		960						
Ala Ala Phe	Phe Ile Gln Ser	Leu Ile Glu Tyr	Asn Ser Ser	Lys Glu								
	965		970		975							
Ser Leu Ser	Asn Leu Ser	Val Ala Met	Lys Val Gln	Val Tyr Ala	Gln							
	980		985		990							
Leu Phe Ser	Thr Gly Leu	Asn Thr Ile	Thr Asp Ala	Ala Lys	Val Val							
	995		1000		1005							
Glu Leu Val	Ser Thr Ala	Leu Asp Glu	Thr Ile Asp	Leu Leu Pro								
1010		1015		1020								
Thr Leu Ser	Glu Gly Leu	Pro Ile Ile	Ala Thr Ile	Ile Asp Gly								
1025		1030		1035								
Val Ser Leu	Gly Ala Ala	Ile Lys Glu	Leu Ser Glu	Thr Ser Asp								
1040		1045		1050								
Pro Leu Leu	Arg Gln Glu	Ile Glu Ala	Lys Ile Gly	Ile Met Ala								
1055		1060		1065								
Val Asn Leu	Thr Thr Ala	Thr Thr Ala	Ile Ile Thr	Ser Ser Leu								
1070		1075		1080								
Gly Ile Ala	Ser Gly Phe	Ser Ile Leu	Leu Val Pro	Leu Ala Gly								
1085		1090		1095								
Ile Ser Ala	Gly Ile Pro	Ser Leu Val	Asn Asn Glu	Leu Val Leu								
1100		1105		1110								
Arg Asp Lys	Ala Thr Lys	Val Val Asp	Tyr Phe Lys	His Val Ser								
1115		1120		1125								
Leu Val Glu	Thr Glu Gly	Val Phe Thr	Leu Leu Asp	Asp Lys Ile								
1130		1135		1140								
Met Met Pro	Gln Asp Asp	Leu Val Ile	Ser Glu Ile	Asp Phe Asn								
1145		1150		1155								

ES 2 729 278 T3

Asn Asn Ser Ile Val Leu Gly Lys Cys Glu Ile Trp Arg Met Glu  
 1160 1165 1170

Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr Asp Asp Ile Asp His Phe Phe  
 1175 1180 1185

Ser Ala Pro Ser Ile Thr Tyr Arg Glu Pro His Leu Ser Ile Tyr  
 1190 1195 1200

Asp Val Leu Glu Val Gln Lys Glu Glu Leu Asp Leu Ser Lys Asp  
 1205 1210 1215

Leu Met Val Leu Pro Asn Ala Pro Asn Arg Val Phe Ala Trp Glu  
 1220 1225 1230

Thr Gly Trp Thr Pro Gly Leu Arg Ser Leu Glu Asn Asp Gly Thr  
 1235 1240 1245

Lys Leu Leu Asp Arg Ile Arg Asp Asn Tyr Glu Gly Glu Phe Tyr  
 1250 1255 1260

Trp Arg Tyr Phe Ala Phe Ile Ala Asp Ala Leu Ile Thr Thr Leu  
 1265 1270 1275

Lys Pro Arg Tyr Glu Asp Thr Asn Ile Arg Ile Asn Leu Asp Ser  
 1280 1285 1290

Asn Thr Arg Ser Phe Ile Val Pro Ile Ile Thr Thr Glu Tyr Ile  
 1295 1300 1305

Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Ser Phe Tyr Gly Ser Gly Gly Thr Tyr  
 1310 1315 1320

Ala Leu Ser Leu Ser Gln Tyr Asn Met Gly Ile Asn Ile Glu Leu  
 1325 1330 1335

Ser Glu Ser Asp Val Trp Ile Ile Asp Val Asp Asn Val Val Arg  
 1340 1345 1350

Asp Val Thr Ile Glu Ser Asp Lys Ile Lys Lys Gly Asp Leu Ile  
 1355 1360 1365

Glu Gly Ile Leu Ser Thr Leu Ser Ile Glu Glu Asn Lys Ile Ile  
 1370 1375 1380

Leu Asn Ser His Glu Ile Asn Phe Ser Gly Glu Val Asn Gly Ser  
 1385 1390 1395

ES 2 729 278 T3

Asn Gly Phe Val Ser Leu Thr Phe Ser Ile Leu Glu Gly Ile Asn  
 1400 1405 1410

Ala Ile Ile Glu Val Asp Leu Leu Ser Lys Ser Tyr Lys Leu Leu  
 1415 1420 1425

Ile Ser Gly Glu Leu Lys Ile Leu Met Leu Asn Ser Asn His Ile  
 1430 1435 1440

Gln Gln Lys Ile Asp Tyr Ile Gly Phe Asn Ser Glu Leu Gln Lys  
 1445 1450 1455

Asn Ile Pro Tyr Ser Phe Val Asp Ser Glu Gly Lys Glu Asn Gly  
 1460 1465 1470

Phe Ile Asn Gly Ser Thr Lys Glu Gly Leu Phe Val Ser Glu Leu  
 1475 1480 1485

Pro Asp Val Val Leu Ile Ser Lys Val Tyr Met Asp Asp Ser Lys  
 1490 1495 1500

Pro Ser Phe Gly Tyr Tyr Ser Asn Asn Leu Lys Asp Val Lys Val  
 1505 1510 1515

Ile Thr Lys Asp Asn Val Asn Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Leu Lys  
 1520 1525 1530

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Leu Ser Leu Thr Leu Gln Asp Glu Lys  
 1535 1540 1545

Thr Ile Lys Leu Asn Ser Val His Leu Asp Glu Ser Gly Val Ala  
 1550 1555 1560

Glu Ile Leu Lys Phe Met Asn Arg Lys Gly Asn Thr Asn Thr Ser  
 1565 1570 1575

Asp Ser Leu Met Ser Phe Leu Glu Ser Met Asn Ile Lys Ser Ile  
 1580 1585 1590

Phe Val Asn Phe Leu Gln Ser Asn Ile Lys Phe Ile Leu Asp Ala  
 1595 1600 1605

Asn Phe Ile Ile Ser Gly Thr Thr Ser Ile Gly Gln Phe Glu Phe  
 1610 1615 1620

Ile Cys Asp Glu Asn Asp Asn Ile Gln Pro Tyr Phe Ile Lys Phe  
 1625 1630 1635

ES 2 729 278 T3

Asn Thr Leu Glu Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Val Gly Asn Arg Gln  
 1640 1645 1650  
  
 Asn Met Ile Val Glu Pro Asn Tyr Asp Leu Asp Asp Ser Gly Asp  
 1655 1660 1665  
  
 Ile Ser Ser Thr Val Ile Asn Phe Ser Gln Lys Tyr Leu Tyr Gly  
 1670 1675 1680  
  
 Ile Asp Ser Cys Val Asn Lys Val Val Ile Ser Pro Asn Ile Tyr  
 1685 1690 1695  
  
 Thr Asp Glu Ile Asn Ile Thr Pro Val Tyr Glu Thr Asn Asn Thr  
 1700 1705 1710  
  
 Tyr Pro Glu Val Ile Val Leu Asp Ala Asn Tyr Ile Asn Glu Lys  
 1715 1720 1725  
  
 Ile Asn Val Asn Ile Asn Asp Leu Ser Ile Arg Tyr Val Trp Ser  
 1730 1735 1740  
  
 Asn Asp Gly Asn Asp Phe Ile Leu Met Ser Thr Ser Glu Glu Asn  
 1745 1750 1755  
  
 Lys Val Ser Gln Val Lys Ile Arg Phe Val Asn Val Phe Lys Asp  
 1760 1765 1770  
  
 Lys Thr Leu Ala Asn Lys Leu Ser Phe Asn Phe Ser Asp Lys Gln  
 1775 1780 1785  
  
 Asp Val Pro Val Ser Glu Ile Ile Leu Ser Phe Thr Pro Ser Tyr  
 1790 1795 1800  
  
 Tyr Glu Asp Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Gly Leu Val Ser Leu  
 1805 1810 1815  
  
 Tyr Asn Glu Lys Phe Tyr Ile Asn Asn Phe Gly Met Met Val Ser  
 1820 1825 1830  
  
 Gly Leu Ile Tyr Ile Asn Asp Ser Leu Tyr Tyr Phe Lys Pro Pro  
 1835 1840 1845  
  
 Val Asn Asn Leu Ile Thr Gly Phe Val Thr Val Gly Asp Asp Lys  
 1850 1855 1860  
  
 Tyr Tyr Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly Ala Ala Ser Ile Gly Glu

ES 2 729 278 T3

1865		1870		1875
Thr Ile 1880	Ile Asp Asp Lys	Asn Tyr Tyr Phe Asn 1885	Gln Ser Gly Val	
Leu Gln 1895	Thr Gly Val Phe	Ser Thr Glu Asp Gly Phe 1900	Lys Tyr Phe	
Ala Pro 1910	Ala Asn Thr Leu	Asp Glu Asn Leu Glu 1915	Gly Glu Ala Ile 1920	
Asp Phe 1925	Thr Gly Lys Leu	Ile Ile Asp Glu Asn 1930	Ile Tyr Tyr Phe 1935	
Asp Asp 1940	Asn Tyr Arg Gly	Ala Val Glu Trp Lys 1945	Glu Leu Asp Gly 1950	
Glu Met 1955	His Tyr Phe Ser	Pro Glu Thr Gly Lys 1960	Ala Phe Lys Gly 1965	
Leu Asn 1970	Gln Ile Gly Asp	Tyr Lys Tyr Tyr Phe 1975	Asn Ser Asp Gly 1980	
Val Met 1985	Gln Lys Gly Phe	Val Ser Ile Asn Asp 1990	Asn Lys His Tyr 1995	
Phe Asp 2000	Asp Ser Gly Val	Met Lys Val Gly Tyr 2005	Thr Glu Ile Asp 2010	
Gly Lys 2015	His Phe Tyr Phe	Ala Glu Asn Gly Glu 2020	Met Gln Ile Gly 2025	
Val Phe 2030	Asn Thr Glu Asp	Gly Phe Lys Tyr Phe 2035	Ala His His Asn 2040	
Glu Asp 2045	Leu Gly Asn Glu	Glu Gly Glu Glu Ile 2050	Ser Tyr Ser Gly 2055	
Ile Leu 2060	Asn Phe Asn Asn	Lys Ile Tyr Tyr Phe 2065	Asp Asp Ser Phe 2070	
Thr Ala 2075	Val Val Gly Trp	Lys Asp Leu Glu Asp 2080	Gly Ser Lys Tyr 2085	
Tyr Phe 2090	Asp Glu Asp Thr	Ala Glu Ala Tyr Ile 2095	Gly Leu Ser Leu 2100	

ES 2 729 278 T3

Ile Asn Asp Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn Asp Asp Gly Ile Met Gln  
 2105 2110 2115

Val Gly Phe Val Thr Ile Asn Asp Lys Val Phe Tyr Phe Ser Asp  
 2120 2125 2130

Ser Gly Ile Ile Glu Ser Gly Val Gln Asn Ile Asp Asp Asn Tyr  
 2135 2140 2145

Phe Tyr Ile Asp Asp Asn Gly Ile Val Gln Ile Gly Val Phe Asp  
 2150 2155 2160

Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn  
 2165 2170 2175

Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val Glu Tyr Ser Gly Leu Val Arg  
 2180 2185 2190

Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly Glu Thr Tyr Thr Ile Glu  
 2195 2200 2205

Thr Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu Ser Asp Lys Tyr Tyr  
 2210 2215 2220

Phe Asn Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly Ile Asn Leu Ile  
 2225 2230 2235

Asp Asp Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr  
 2240 2245 2250

Gly Leu Ile Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn  
 2255 2260 2265

Gly Glu Met Gln Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe  
 2270 2275 2280

Tyr Phe Gly Glu Asp Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr  
 2285 2290 2295

Pro Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu  
 2300 2305 2310

Asn Phe Glu Gly Glu Ser Ile Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu  
 2315 2320 2325

Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr  
 2330 2335 2340

Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp  
 2345 2350 2355

Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu  
 2360 2365

<210> 173  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 729 278 T3

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 173  
 Ser Pro Val Glu Lys Asn Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Glu Val  
 1 5 10 15

Ser Asp

5 <210> 174  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 174  
 Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Val Arg Leu  
 1 5 10

<210> 175  
 <211> 15  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 175  
 Cys Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met Leu Pro Gly Ile His  
 20 1 5 10 15

<210> 176  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 176  
 Cys Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met Leu Pro Gly Ile His Ser  
 1 5 10 15

Asp Leu Phe Lys  
 20

30 <210> 177  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

35 <400> 177  
 Cys Trp Glu Met Ile Lys Leu Glu Ala Ile Met Lys Tyr Lys  
 1 5 10

<210> 178  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 178  
 Cys Thr Asn Leu Val Ile Glu Gln Val Lys Asn Arg  
 1 5 10

<210> 179  
 <211> 12  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 179  
 Pro Glu Ala Arg Ser Thr Ile Ser Leu Ser Gly Pro  
 10 1 5 10

<210> 180  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 180  
 Cys Ser Asn Leu Ile Val Lys Gln Ile Glu Asn Arg  
 20 1 5 10

<210> 181  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 181  
 Thr Glu Gln Glu Ile Asn Ser Leu Trp Ser Phe Asp Gln Ala  
 1 5 10

30 <210> 182  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

35 <400> 182  
 Thr Glu Gln Glu Ile Asn Ser Leu Trp Ser Phe Asp Pro Glu Ala Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ile Ser Leu Ser Gly Pro Cys  
 20 25

<210> 183  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 183  
 Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Leu Cys  
 1 5 10

ES 2 729 278 T3

<210> 184  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 184  
 Cys Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly Arg  
 1 5 10

10 <210> 185  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

15 <400> 185  
 Val Asn Thr Leu Asn Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Cys  
 1 5 10 15

<210> 186  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 186  
 Tyr Ala Gln Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Cys  
 1 5 10

25 <210> 187  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

30 <400> 187  
 Cys Ala Gly Ile Ser Ala Gly Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu  
 1 5 10 15

<210> 188  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 188  
 Asp Asp Leu Val Ile Ser Glu Ile Asp Phe Asn Asn Asn Ser Ile Cys  
 1 5 10 15

40 <210> 189  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

ES 2 729 278 T3

<400> 189  
 Met Glu Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr  
 1 5 10

5 <210> 190  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 190  
 Ala Val Asn Asp Thr Ile Asn Val Leu Pro Thr Ile Thr Glu Gly Ile  
 1 5 10 15

Pro Ile Val Ser Thr Ile Leu Asp Gly Ile Asn Leu Gly Ala Ala Ile  
 20 25 30

10 Lys Glu Leu  
 35

<210> 191  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 191  
 Cys Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile  
 1 5 10 15

Glu Gly Gln Ala  
 20

20 <210> 192  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

25 <400> 192  
 Cys Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn Asp Asn Ile  
 1 5 10 15

Tyr Gly Gln Ala  
 20

<210> 193  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

<400> 193  
 Cys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Glu Ala  
 1 5 10

35 <210> 194  
 <211> 12

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Fragmento de toxina C. difficile TcdB

5 <400> 194  
Cys Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Asp Thr Ala Glu Ala  
1                   5                           10

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal neutralizante o fragmento de unión específico de TcdA, que comprende:
  - una cadena pesada que comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 49, y
  - una cadena ligera que comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 47.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión según la reivindicación 1.
3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 que comprende un anticuerpo monoclonal adicional o fragmento de unión del mismo específico de TcdA seleccionado independientemente de:
  - 10 i) una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-L3;
  - 15 ii) una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 34 para CDR-H1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 35 para CDR-H2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 36 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 31 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 32 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 33 para CDR-L3; y
  - 20 iii) una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 54 para CDR-H1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 55 para CDR-H2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 56 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia dada en la SEQ ID NO: 51 para CDR-L1, una secuencia dada en la SEQ ID NO: 52 para CDR-L2 y una secuencia dada en la SEQ ID NO: 53 para CDR-L3.
- 25 4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo que se une específicamente a TcdB, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 124 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 125 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 126 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 121 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 122 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 123 para CDR-L3.
- 30 5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, que comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 129 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 127.
- 35 6. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 5, que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo que se une específicamente a TcdB, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 154 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 155 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 156 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 151 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 152 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 153 para CDR-L3.
- 40 7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, que comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 159 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 157.
- 45 8. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión según la reivindicación 1 o una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para uso en tratamiento.
9. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión o composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, para el tratamiento o profilaxis de infección por *Clostridium difficile*.
- 50 10. Un anticuerpo o fragmento de unión o composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9 para uso en una terapia de combinación, que comprende además un compuesto seleccionado del grupo que comprende metronidazol, vancomicina, clindamicina, fidaxomicina y combinaciones de los mismos.

**Figura 1**

**SEQ ID NO: 8 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-toxina A 922.g1 VK (gL1)**

GACCTGTGA TGACCCAGAG TCCGAGCACT CTTTCTGCCT CCGTGGGAGA CCGCGTGACC  
 ATTACATGTC AGGCTTCACA AAGTATCTCC AATGCTCTGG CCTGGTATCA GCAGAAACCC  
 GGCAAAGCCC CTAAGCTGCT CATCTACTCT GCATCAAGCC TGGCTAGCGG CGTGCCAAGC  
 CGATTCAAGG GGAGCGGTTT TGGCACTGAG TTTACGCTGA CCATCAGTAG CTTGCAGCCT  
 GACGATTTTG CAACCTATTA CTGCCAGTAC ACACACTACT CCCATACATC TAAAAACCCA  
 TTCGGAGGGG GTACTAAGGT CGAAATAAAG

**SEQ ID NO: 10 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-toxina A 922.g1 VH (gH1)**

GAAGTGCAAT TGGTGGAAAG TGGCGGAGGA CTGGTGCAAC CCGGGGGTAG TCTGCGACTG  
 AGCTGTGCTG CCTCCGGCTT TACCATTAGC TCCTACTATA TGAGCTGGGT TCGACAGGCC  
 CCTGGAAAAG GACTCGAATG GATCGGCATC ATATCTTCCG GTGGGCATTT CACCTGGTAC  
 GCAAACCTGGG CTAAGGGGAG ATTACAGATT AGCAGCGACT CCACAACCGT GTACCTGCAA  
 ATGAACAGCC TGAGGGATGA GGACACTGCC ACATATTTCT GCGCACGCGC TTACGTGAGC  
 GGAAGCTCAT TTAATGGCTA TGCCTGTGG GGGCAAGGAA CACTCGTGAC TGTCTCG

**SEQ ID NO: 18 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-toxina A CA923.g1 gL1**

GACGTCGTGATGACTCAGAGCCCATCTAGTCTGAGCGCTAGCGTCGGAGACCGAGTCAACAATTACC  
 TGTCAAGCCTCCCAGAGCATCTCCAACCTACCTGGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCAAGGTGCC  
 AAGCTGCTGATCTATAGTGTTCACACTCGCAAGCGGCGTTCCGTCACGCTTTAAGGGATCTGGC  
 TCTGGCACTCAGTTCACCTTGACGATCTCAAGCCTGCAGCCAGAAAGATGTGGCCACCTATTACTGC  
 CAGTATCCCACTACGGGACTGGGGTGTTCGGTGCCTTTGGAGGTGGGACCAAAGTGGAGATAAAG

**Figura 2**

**SEQ ID NO: 20 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-toxina A CA923.g1 gH1**

GAAGTTCAACTTGTGGAATCTGGAGGCGGGCTCGTGCAGCCTGGTGGAAAGCCTTAGACTGAGCTGC  
 GCTGCATCCGCATTTTCCCTGTCCAACCTACTACATGAGCTGGGTGCGACAAGCACCAGGCAAGGGA  
 CTGGAATGGATTGGCATCATAAGCTCCGGTTCCAATGCCCTGAAATGGTACGCATCATGGCCGAAA  
 GGCCGCTTTACCATAAGCAAGGACTCCACCACCGTCTATCTGCAGATGAACTCATTTGCGTGCCGAG  
 GACTGCAACGTACTTCTGTGCTCGCAACTACGTGGGAAGCGGATCTTATTATGGCATGGATCTG  
 TGGGACAAGGTACACTCGTGACCGTCTCG

**SEQ ID NO: 28 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-toxina A CA993.g1 gL1**

GATGTCGTGA TGACTCAGTC CCCCTCTACA TTGAGTGCCT CTGTGCGTGA TCGAGTTACC  
 ATCACCTGTC AAGCAAGCCA GAGCATCAGC TCCTACTTCT CTTGGTACCA GCAAAAGCCG  
 GGAAAAGCCC CTCAACTGCT GATTTATGGG GCCTCAACAC TGGCTTCTGG CGTGCCATCA  
 AGATTCAAGG GATCTGGCTC CGGCACTGAG CTTACACTGA CCATTAGCTC CCTGCAACCT  
 GACGATTTTG CTACCTACTA CTGCCAGTGC ACCGACTATA GTGGGATATA TTTCGGCGGA  
 TTTGGGGGAG GGACGAAAGT GGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 30 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-toxina A CA993.g1 gH1**

GAAGTTCAGC TGGTCGAGAG CGGAGGCGGA CTGGTGCAAC CTGGTGGTAG CCTGAAACTC  
 TCTTGTAAGT CCTCCGGGTT TTCCCTGAGC TCTTACTATA TGTCATGGGT GAGACAGGCT  
 CCCGGGAAAG GATTGGAAATG GATCGGGATT ATCTCCTCCG GCTCTTCCAC CACTTTTACA  
 TGGTACGCCT CATGGGCAA GGGGAGGTTT ACCATAAGCA AGACAAGCAC GACCGTGTAT  
 CTTTCAAGT ACTCCCTGAA GACGGAGGAT ACTGCCACCT ACTTTTGCAG TCGGGCCTAT  
 GTGGGCTCAA GCTCTTACTA TGGCTTCGAC CCATGGGGAC AGGGCACACT TGTGACCGTC  
 TCG

**Figura 3**

**SEQ ID NO: 38 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina A 995.g1**

GACGTCGTGA TGACACAGAG CCCTTCAACA CTGTCTGCAA GCGTGGGCGA TAGGGTCACC  
 ATAACGTGCC AGGCCTCTCA ATCCATCAAC AACTATTTTA GCTGGTACCA GCAGAAGCCA  
 GGCAAGGCTC CGAAACTTCT GATCTACGGA GCTGCCAACC TGGCAAGTGG CGTGCCATCA  
 CGGTTCAAGG GATCCGGGAG CGGTACTGAG TATACCCTGA CCATTTTCATC TCTCCAACCC  
 GACGATTTTCG CCACCTACTC CTGCCAGAAT AATTACGGCG TGCACATCTA TGGAGCTGCC  
 TTTGGCGGTG GGACAAAAGT GGAAATTAAG

**SEQ ID NO: 40 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina A 995.g1**

GAAGTTCAGC TGGTCGAGAG TGGGGGAGGG CTGTGTCAAC CTGGTGGCTC CCTCCGTCTG  
 AGCTGTACTG CTTCTGGATT CTCACTGAGC AATTACGACA TGATCTGGGT GCGACAGGCA  
 CCCGGCAAAG GACTGGAGTA CATTGGCTTC ATCAACACCG GGGGTATAAC GTACTATGCC  
 TCATGGGCTA AGGGGCGCTT TACAATTAGT AGGGATTCTT CTACCGTGTA CCTGCAGATG  
 AACTCACTGA GAGCCGAGGA CACTGCCACA TATTTCTGCG CTCGGGTGGA TGACTATATC  
 GGGGCCTGGG GCGCCGATT GTGGGGCCAA GGAACACTGG TCACCGTCTC G

**SEQ ID NO: 48 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina A 997.g1**

GCACTCGTGATGACACAGAGCCCGAGTAGCTTTAGTGCTTCAACCGGTGATAGGGTCACTATTACT  
 TGCCAAAGCCTCTCAGAGTATATCTAGCTATCTGAGCTGGTACCAGCAAAGCCCGGGAAGGCTCCT  
 AAAGTCTGATCTACCGGGCTTCCACATTGGCCTCCGGCGTTCCCTCACGCTTTAGCGGCTCCGGA  
 TCCGGAACCGAGTACACCCTGACTATCTCTTGCCTGCAATCTGAGGACTTCGCAACCTACTATTGT  
 CTGGGCGTCTACGGATATAGCAACGATGACGGGATCGCCTTCGGCGGCGGTACCAAAGTGAAATT  
 AAG

**Figura 4**

**SEQ ID NO: 50 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina A 997.g1**

GAGGTGCAACTTGTGGAAAGCGGGGAGGACTGGTGCAGCCTGGGGGCTCATTGAGACTGAGCTGC  
 ACCGTTTCTGGTATTGACCTGAGCTCCCATCATATGTGCTGGGTGCGCCAGGCACCCGAAAAGGA  
 CTGGAATACATCGGCGTCATATAACCACTTTGGCTCTACATACTATGCCAACTGGGCAACTGGGCGA  
 TTCACAATTAGCAAGGACTCAACTACCGTTTACCTGCAAATGAATAGCCTGAGGGCTGAGGATACT  
 GCCACCTATTTCTGTGCCCGGGCTTCAATCGCCGGCTATTCTGCCTTTGATCCATGGGGGCAAGGA  
 AACTCGTGACCGTCTCG

**SEQ ID NO: 58 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina A 1000.g1**

GAAATCGTGA TGACGCAGTC ACCAAGCACA CTGAGCGCTT CTGTGGGAGA TCGGGTCACA  
 ATAACCTGTC AGGCCTCCCA GAGCATCTAC TCTTATCTGG CATGGTACCA GCAGAAGCCA  
 GGGAAAGCTC CCAAGCTGCT GATTTATGAC GCCAGCACTT TGGCTTCCGG TGTTCTTAGT  
 AGGTTCAAAG GCTCCGGAAG CGGTACCGAG TTTACCCTGA CCATCTCATC TCTGCAACCC  
 GATGACTTTG CCACATACTA TTGCCAGGGG AATGCCTACA CTTCCAACCTC ACACGACAAC  
 GCATTCGGGG GAGGCACCAA AGTCGAAATT AAG

**SEQ ID NO: 60 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina A 1000.g1**

GAAGTTCAGC TGGTCGAGAG CGGAGGGGGT TTGATTCAGC CCGGTGGCTC ACTTAGATTG  
 AGCTGCACCG TGTCCGGAAT CGATCTGTCA TCTGATGCCG TGGGCTGGGT GCGACAGGCA  
 CCTGGGAAAG GACTGGAGTA TATAGGGATC ATCGCCACCT TCGACTCCAC ATACTACGCT  
 AGCTGGGCAA AAGGGCGCTT TACGATTAGC AAGGCCTCCT CTACTACCGT GTACCTCCAA  
 ATGAACTCAC TGAGGGCCGA GGACACTGCC ACTTATTTCT GTGCTCGGAC CGGTAGCTGG  
 TACTACATCT CTGGCTGGGG CTCCTACTAT TATGGCATGG ACCTGTGGGG ACAGGGGACA  
 CTCGTGACCG TCTCG

**Figura 5**

**SEQ ID NO: 68 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 926.g1**

GATACCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCTACATTGTCACTGAGCCCCGGGGAGAGGGCCACATTGAGC  
 TGCCGGGCTTCAAAATCCGTGTCCACCCCTCATGCACTGGTTTCAGCAAAGCCCCGGGCAGGCCCA  
 AAAGTGTGATCTACCTCGCATCTAACCTTGAATCTGGCGTGCCGGCCCGCTTTAGTGGCTCCGGA  
 AGCGGAACCGACTTCACACTGACGATTAGCTCCCTGGAGCCTGAGGATTTCCCGTGTACTATTGC  
 CAGCAAATTTGGAATGACCCTTGGACTTTCGGGGCGGTACTAAGGTGAAATAAAG

**SEQ ID NO: 70 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 926.g1**

GAGGTGGAAGTGTCTGAATCTGGTGGTGGGCTGGTGCAGCCCGGTGGATCTCTGAGATTGTCATGC  
 GAGGCATCCGGCTTTACCTTTTCCAACACTACGGAATGGCCTGGGTGAGACAGGCCCAACGAAGGGG  
 CTCGAATGGGTTACAAGCATCAGCTCTTCTGGGGGATCTACTTACTATCGCGATAGCGTCAAAGGC  
 CGGTTTACCATTAGCCGAGATAATGCCAAATCAAGCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCT  
 GAGGACACCGCCACATACTATTGTACAACCGTGATAAGGGGCTACGTGATGGACGCATGGGGACAG  
 GGGACATTGGTTACCGTCTCG

**SEQ ID NO: 78 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 927.g2**

GACACACAGA TGACCCAGAG CCCATCCACT TTGTCTGCAT CCGTGGGCGA CCGAGTGACA  
 ATCACCTGTA GAGCAAGCGG TTCCGTGAGC AACTGATGC ATTGGTACCA GCAGAAGCCT  
 GGGAAAGGCTC CCAAGCTGCT GATCTACAAA GCCAGCAACC TTGCCTCCGG CGTTCCAAGC  
 CGGTTTAGCG GTTCCGGATC TGAACCGAG TTCACCCTGA CCATATCAAG CCTGCAACCC  
 GACGACTTCG CCACCTACTA TTGCCACCAG AGCTGGAATA GCGACACGTT CGGGCAAGGC  
 ACAAGGCTGG AAATCAAA

**SEQ ID NO: 80 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 927.g2**

GAGGTGCAAC TTGTGGAAAG CGGAGGGGGC GTGGTCCAAC CCGGAAGAAG TCTCCGTCTT  
 TCTTGCGCCG CAAGTGGCTT CACCTTTTCC AACTACGGAA TGGCCTGGGT TCGACAAGCT  
 CCTGGGAAAG GATTGGAGTG GGTGGCCACT ATCAACTATG ACGGACGCAC GACACACTAC  
 CGAGACTCTG TTAAGGGGCG CTTTACGATT TCCC GCGACA ATAGCAAGAG CACCCTCTAC  
 CTGCAAATGA ATAGCCTCCG GGCCGAGGAT ACTGCTGTGT ACTATTGTAC CTCCATCTCA  
 CGGAGCCACT ACTTCGATTG CTGGGGACAA GGCACACTCG TGACTGTCTCG

**Figura 6**

**SEQ ID NO: 88 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1099.g2**

GACGTCCAGC TCACTCAATC TCCCTCCTTT CTGTCTGCTT CTGTGGGCGA TCGCGTGACA  
 ATAACCTGCA AGGCCTCCAA ATCAATTAGC AACCATCTGG CATGGTATCA GGAGAAGCCT  
 GGCAAAGCCA ATAAGCTGCT GATCCACTCC GGCTCAACTC TGCAATCCGG TACCCCAAGC  
 CGATTTAGCG GATCTGGGAG CGGAACCGAG TTCACACTTA CCATTAGCTC CCTGCAACCG  
 GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGCCAGCAA TACGACGAAT ACCCCTATAC GTTCGGCCAA  
 GGGACAAGAT TGGAAATCAA GCGTACG

**SEQ ID NO: 90 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1099.g2**

GAAGTTCAGC TGCAGGAATC TGGACCTGGC TTGGTGAAAC CAAGCGAGAC ACTTAGTCTC  
 ACTTGCACCG TTTCCGGCTT CTCCTTCAA TCCTACACGA TCTCTTGGGT GCGGCAACCA  
 CCCGGGAAAG GACTGGAATG GATCGCAGCC ATTAGCGGGG GAGGGAGCAC CTATTACAAC  
 TTGCCTCTCA AGAGCCGCGT GACCATATCC CGTGACACAA GCAAGAGCCA GGTTCCTTG  
 AAGCTGAGCT CCGTGACTGC TGCCGATACG GCTGTTTACT ATTGCACCCG ACCTCGCTGG  
 TATCCCGTT CCTATTTCGA CTACTGGGGA AGAGGCACAC TGGTTACCGT CTCG

**SEQ ID NO: 98 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1102.g4**

AACATCGTGC TGACACAGTC TCCTGCAACC CTTTCACTGT CTCCAGGTGA ACGAGCAACC  
 CTGAGTTGTA GAGCCAGTCA GAGGATCTCC ACGAGCATTG ACTGGTATCA GCAAAAGCCT  
 GGGCAAGCTC CCAGACTCTT GATCAAGTAC GCCTCTCAGA GCATAAGTGG CATTCCAGCT  
 AGGTTTAGCG GCTCAGGCTC AGGAACAGAC TTCACTCTGA CCATCAGCTC CCTGGAACCG  
 GAGGACTTTG CCGTCTATTA CTGCCAGCAA TCCTACTCCA GTCTGTACAC CTTCCGGCAG  
 GTACTAAAC TGGAGATAAA G

**Figura 7**

**SEQ ID NO: 100 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1102.g4**

GAAGTGCAGC TGGTCGAATC CGGGGGAGGT TTGGTGCAAC CAGGTGGCTC ACTGAGACTG  
 AGCTGTGCCG TTTCCGGCTT TACGTTCTCA GACAGTTATA TGGCCTGGGT GCGTCAAGCA  
 CCTGGAAAAG GGCTGGAGTG GATTGCCAGT ATCAGCTATG GTGGGACCAT AATCCAGTAC  
 GGCGATAGCG TCAAGGGCAG GTTTACTATC TCCAGGGACA ACGCCAAGTC AAGCCTTTAC  
 CTGCAGATGA ATTCTCTCCG CGCAGAGGAT ACCGCTGTGT ATTACTGCGC TAGACGGCAG  
 GGAACCTACG CTCGATACCT GGACTTCTGG GGTCAGGGAA CACTCGTTAC AGTCTCG

**SEQ ID NO: 108 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1114.g2**

GCGACGCAAA TGACTCAGTC GCCCTCATCG CTTAGCGCGT CCGTCGGAGA TAGAGTGACG  
 ATCACCTGCC GCGCATCAGA GTCGGTGTCC ACACTCCTCC ACTGGTATCA GCAGAAACCG  
 GGGAAAGGCAC CAAAACCTCTT GATCTACAAA GCCAGCAACC TTGCGTCCGG TGTCCCGTCA  
 AGGTCTCTCCG GGAGCGGTTT GGGGACAGAC TTTACTTTGA CCATTTCTGC GCTTCAGCCG  
 GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGTCATCAG TCATGGAAC CACCTCCCAC ATTTGGCCAG  
 GGAACGAAAC TCGAAATCAA G

**SEQ ID NO: 110 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1114.g2**

GAAGTACAAC TCGTAGAGTC AGGGGGTGGG CTGGTCCAAC CTGGCGGCTC CTTTCGGCTT  
 TCGTGTGCCG CCTCGGGATT CACGTTTAGC AATTACGGTA TGGCCTGGGT GAGGCAGGCA  
 CCAGGGAAGG GTCTTGAGTG GGTAGCGATC ATCAACTATG ATGCAAGCAC CACCCACTAC  
 AGGGATAGCG TCAAGGGACG CTTTACTATC AGCCGGGATA ATGCGAAATC CTCGCTCTAT  
 CTGCAGATGA ACTCCCTCAG AGCCGAGGAC ACCGCGAGTGT ACTATTGCAC ACGATACGGA  
 CGCTCGCACT ATTTGACTA TTGGGGACAG GGGACGCTCG TAACTGTCTC G

**Figura 8**

**SEQ ID NO: 118** secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1114.g8

GACACGGTCC TGACTCAGTC GCCCTCATCG CTTAGCGCGT CCGTCGGAGA TAGAGTGACG  
 ATCACCTGCC GCGCATCAGA GTCGGTGTCC AACTCCTCC ACTGGTATCA GCAGAAACCG  
 GGGAAGGCAC CAAAACCTCTT GATCTACAAA GCCAGCAACC TTGCGTCCGG TGTCCTCGTCA  
 AGGTTCTCCG GGAGCGGTTT GGGGACAGAC TTTACTTTGA CCATTTTCGT GCTTCAGCCG  
 GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGTCATCAG TCATGGAAC CACCTCCCAC ATTTGGCCAG  
 GGAACGAAAC TCGAAATCAA G

**SEQ ID NO: 120** secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1114.g8

GAAGTACAAC TCGTAGAGTC AGGGGGTGGG CTGGTCCAAC CTGGCGGCTC CCTTCGGCTT  
 TCGTGTGCCG CCTCGGGATT CACGTTTAGC AATTACGGTA TGGCCTGGGT GAGGCAGGCA  
 CCAGGGAAGG GTCTTGAGTG GGTAGCGATC ATCAACTATG ATGCAAGCAC CACCCACTAC  
 AGGGATAGCG TCAAGGGACG CTTTACTATC AGCCGGGATA ATGCGAAATC CTCGCTCTAT  
 CTGCAGATGA ACTCCCTCAG AGCCGAGGAC ACCCGAGTGT ACTATTGCAC ACGATACGGA  
 CGCTCGCACT ATTTGACTA TTGGGGACAG GGGACGCTCG TAACTGTCTC G

**SEQ ID NO: 128** secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1125.g2

GATATACAAA TGACTCAGAG CCCTAGCTCA CTGAGCGCTT CTGTGGGCGA TCGTGTGACA  
 ATCACTTGCA AAGCAAGCCA GAACATCTAT ATGTACCTGA ATTGGTACCA GCAAAAACCG  
 GGAAAAGCTC CCAAGCGCCT GATTTACAAC ACCAATAAGC TGCATACCGG CGTGCCAAGC  
 CGTTTTAGCG GATCTGGCTC TGGAAACGAA TATACACTGA CCATAAGCTC CCTGCAACCG  
 GAAGACTTTG CAACTACTA TTGCCTCCAG CACAAATCCT TCCCCTATAC GTTCGGACAA  
 GGGACCAAAC TGGAAATCAA A

**SEQ ID NO: 130** secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1125.g2

GAAGTGCAGC TGGTCGAAAG CGGCGGAGGA TTGGTGCAAC CTGGTGGCTC TCTTCGCCTG  
 TCTTGCCTG CAAGCGGCTT TACGTTCCGC GATAGCTTTA TGGCTTGGGT GCGACAAGCT  
 CCTGGGAAAG GGCTGGAATG GGTCGCTAGC ATAAGCTACG AAGGCGACAA GACTTACTAT  
 GGGGACTCTG TGAAAGGCCG ATTCACCATT AGCCGAGACA ACGCAAAGAA CTCCTGTAC  
 CTGCAGATGA ACTCCCTGCG TGCCGAAGAT ACCGCCGTGT ACTATTGCGC TAGGCTGACG  
 ATCACTACAA GCGGAGATAG CTGGGGACAA GGGACAATGG TGACCGTCTC GAGC

**SEQ ID NO: 138** secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1129.g1

GACACCCAGA TGACTCAGTC TCCGTCAAGC CTTTCTGCCT CTGTTGGAGA TCGAGTCACA  
 ATTACGTGCA AGGCAAGCCA ACACGTGGGT ACCAACGTGG ACTGGTATCA ACAGAAGCCA  
 GGGAAGGTCC CCAAACCTGCT GATCTACGGT GCCAGTATTC GCTATACCGG CGTGCCTGAT  
 CGCTTCACCG GAAGCGGGTC AGGGACCGAT TTCACACTGA CAATCAGCTC CCTGCAACCT  
 GAAGACGTGG CTACTTACTA CTGCCTGCAG TACAACATA ATCCCTACAC CTTTGGCCAG  
 GGCACCAAAC TGGAGATAAA G

**SEQ ID NO: 140** secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1129.g1

GAGGTGCAAC TTGTGGAATC AGGAGGTGGC GTGGTTCAGC CCGGTAGATC ACTTCGTCTG  
 AGTTGTGCAA CAAGCGGCTT TATCTTCTCC AACTTCGGGA TGTCTTGGGT TAGACAGGCT  
 CCTGGTAAGG GCCTCGAATG GGTGGCTAGT ATTAGCCCAA GCGGGGAAA CGCCTACTAT  
 AGGGACAGCG TGAAAGGACG CTTCACTATC AGCCGAGATA ACTCCAAGAC CACGCTGTAT  
 CTGCAGATGA ATAGTCTGAG GGCCGAGGAT ACCCGAGTGT ACTACTGCAC TCGACGGGCC  
 TATCTTCCC CTTTTGCCTT TTGGGGACAG GGGACTCTGG TGACAGTCTC GAGC

**Figura 9**

**SEQ ID NO: 148** secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1134.g5

GACGTCCAGC TCACTCAATC TCCCTCCTTT CTGTCTGCTT CTGTGGGCGA TCGCGTGACA  
 ATAACCTGCA AGGCCTCCAA ATCAATTAGC AACCATCTGG CATGGTATCA GGAGAAGCCT  
 GGCAAAGCCA ATAAGCTGCT GATCCACTCC GGCTCAACTC TGCAACCCGG TACCCCAAGC  
 CGATTTAGCG GATCTGGGAG CGGAACCGAG TTCACACTTA CCATTAGCTC CCTGCAACCG  
 GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGCCAGCAA TACGACGAAT ACCCCTATAC GTTCGGCCAA  
 GGGACAAGAT TGGAAATCAA G

**SEQ ID NO: 150** secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1134.g5

GAAGTTCAGC TGCAGGAATC TGGACCTGGC TTGGTGAAC CAAGCGAGAC ACTTAGTCTC  
 ACTTGACCG TTTCGGGCTT CTCCCTTAAT TCCTACACGA TCACTTGGGT GCGGCAACCA  
 CCCGGGAAAG GACTGGAATG GATCGCAGCC ATTAGCGGGG GAGGGAGCAC CTATTTCAAC  
 TCGGCTCTCA AGAGCCGCGT GACCATATCC CGTGACACAA GCAAGAGCCA GGTTCCTCG  
 AAGCTGAGCT CCGTGACTGC TGCCGATACG GCTGTTTACT ATTGCACCCG ACCTCGCTGG  
 TATCCCGGTT CTTATTTCTGA CTACTGGGA AGAGGCACAC TGGTTACCGT CTCG

**SEQ ID NO: 158** secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1151.g4

GCGATTCAA TGA CT CAGTC GCCCTCATCG CTTAGCGCGT CCGTCCGAGA TAGAGTGACG  
 ATCACGTGCA AAGCATCACA AAATGTCGGG AACAAATGTGG CATGGTATCA GCATAAACCG  
 GGGAAGGCAC CAAAACCTCTT GATCTACTAC GCCAGCAACA GGTTTACTGG TGTCCCGTCA  
 AGGTTCACGG GAGGGGGTTA CGGGACAGAC TTTACTTTGA CCATTTCTGTC GCTTCAGCCG  
 GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGTCAGAGG GTCTACCAGT CAACGTGGAC ATTTGGCCAG  
 GGAACGAAAG TGGAAATCAA G

**Figura 10**

**SEQ ID NO: 160** secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1151.g4

GAAGTACAAC TCCAAGAGTC GGGGCCTGGT CTGGTCAAGC CGTCCGAAAC ACTTTCGCTG  
 ACGTGTACGG TATCAGGATT CTCACTTACA TCATACTACG TCCACTGGGT GAGGCAGCCA  
 CCCGGGAAGG GTCTTGAGTG GATGGGCTGC ATTAGAACCG GAGGGAATAC CGAGTACCAG  
 AGCGAATTTA AGAGCCGCGT CACTATCAGC CGGGATACGT CCAAAAACCA GGTGTCGCTC  
 AAATTGTCCT CCGTGACGGC CGCTGACACC GCAGTGTACT ATTGCGCGCG AGGAAACTAT  
 GGCTTTGCGT ATTGGGGACA GGGGACGCTC GTA ACTGTCT CG

**SEQ ID NO: 168** secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo anti-toxina B 1153.g8

GATATACAGA TGA CT CAGTC CCCTTCTAGC CTTTCAGCTT CCGTGGGCGA TAGAGTGACT  
 ATCACGTGTA AGGCTAGTCA GAACATTAAC AAGTATCTGG ACTGGTACCA GCAGAAACCC  
 GGGAAAGTTC CCAAGCTGCT GATCTACAAC ATCCAGTCCC TGCATACAGG CATTCTAGC  
 CGGTTTAGCG GATCTGGTTC AGGGACCGAC TTCACCCTGA CAATCAGCTC TCTGCAACCA  
 GAAGACGTGG CCACCTATTA CTGCTTCCAG CACAATAGTG GCTGGACTTT TGGACAAGGT  
 ACCAGGCTGG AGATCAA

**SEQ ID NO: 170** secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo anti-toxina B 1153.g8

GAGGTTTCAGC TGGTGAATC AGGAGGGGGT CTGGTGCAAC CAGGAGGCTC CCTGAAACTG  
 TCTTGCGCCG CAAGCGGCTT TACGTTTACC CAGGCCGCTA TGTTCTGGGT TAGGCAGGCC  
 AGTGGGAAGG GTCTTGAAGG CATCGCAAGA ATCAGCACCA AGAGCAACAA TTTCGCTACG  
 TACTATCCGG ACTCCGTGAA AGGCCGGTTT ACCATTTCTC GCGATGACAG CAAGAACACC  
 GTGTACCTGC AGATGAACAG TCTCAAGACC GAGGACACAG CCGTGTACTA TTGTACTGCT  
 CCCGCCATT ATTACGATGG CACAGTGCCT TTCGCATACT GGGGACAGGG  
 TACTTTGGTG ACTGTCTCG

**Figura 11**

Títulos séricos de 4 conejos inmunizados con toxoide de TcdA y 5 ratas inmunizadas con el dominio de unión de TcdB (TcdB1234). Datos ELISA generados usando la toxina TcdA o el dominio de unión de TcdB recubiertos sobre una placa ELISA

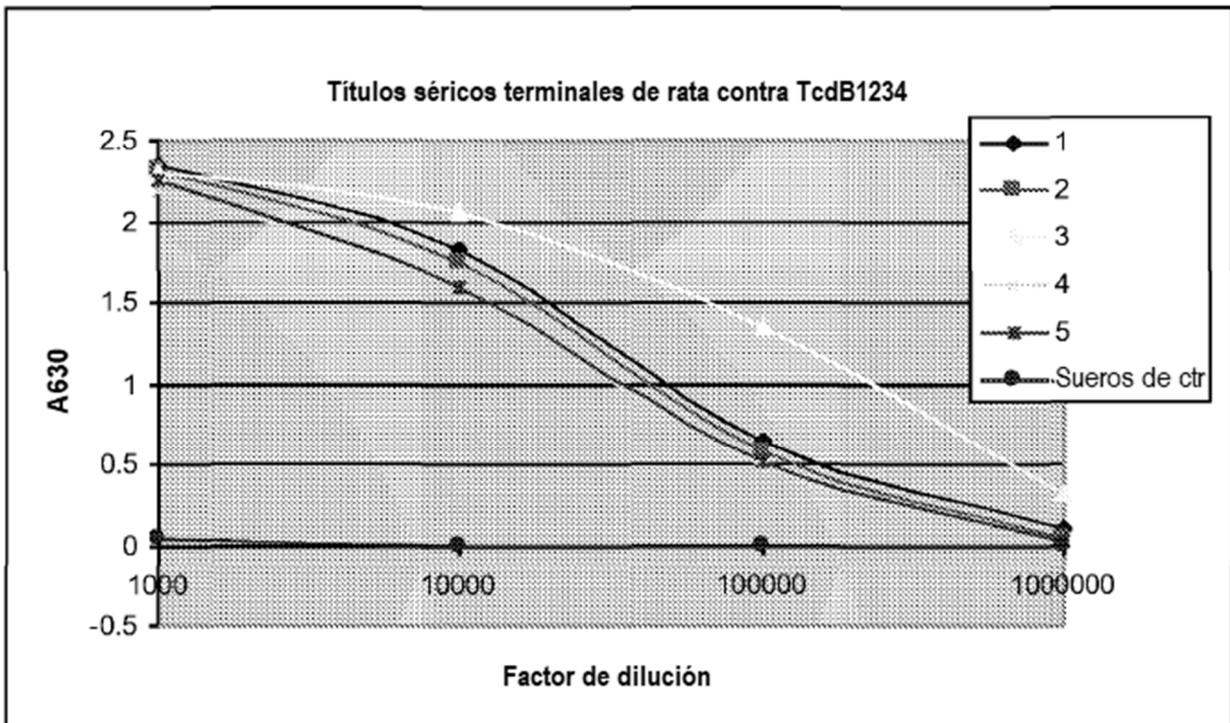
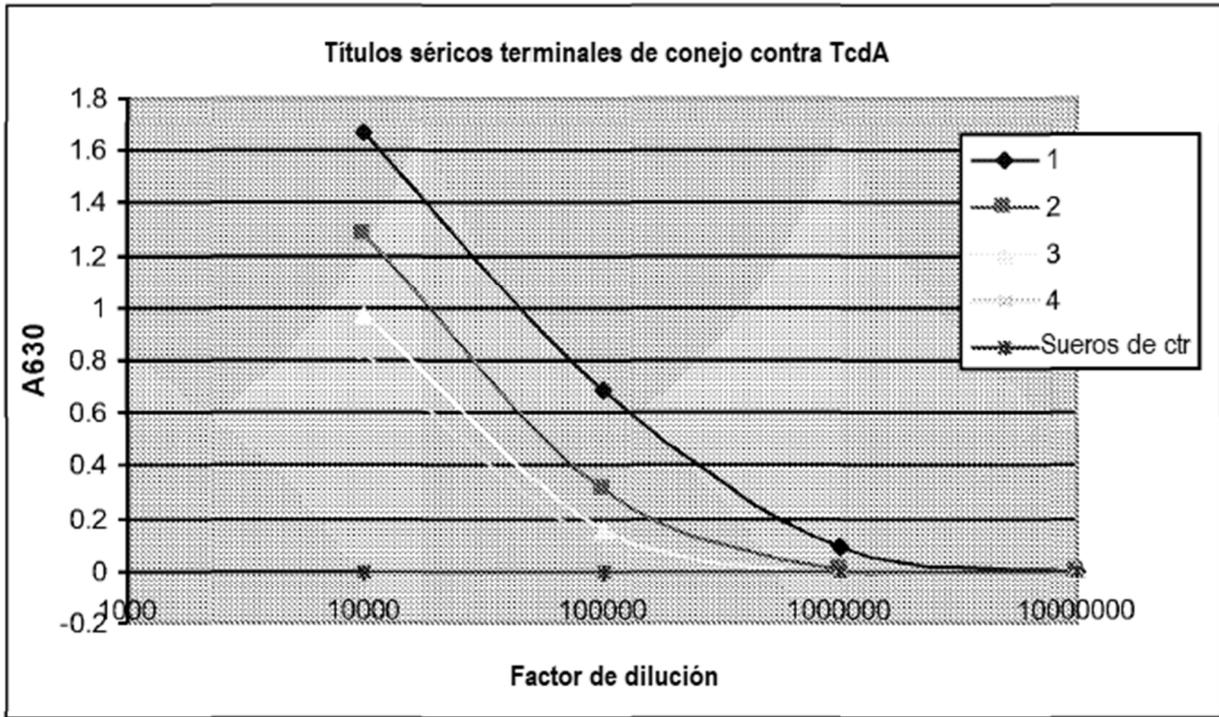


Figura 12 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

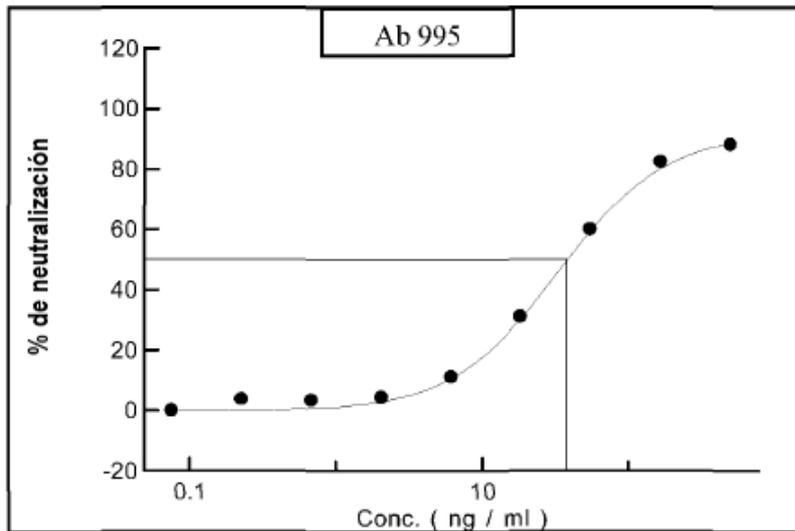
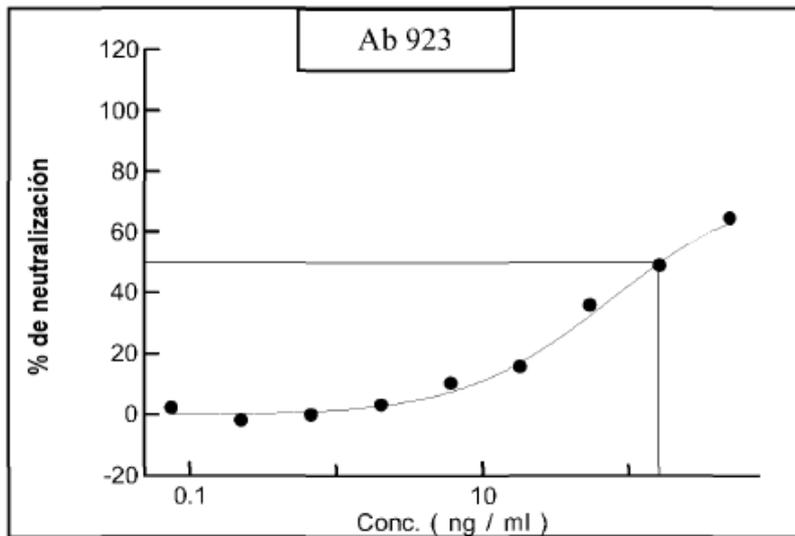
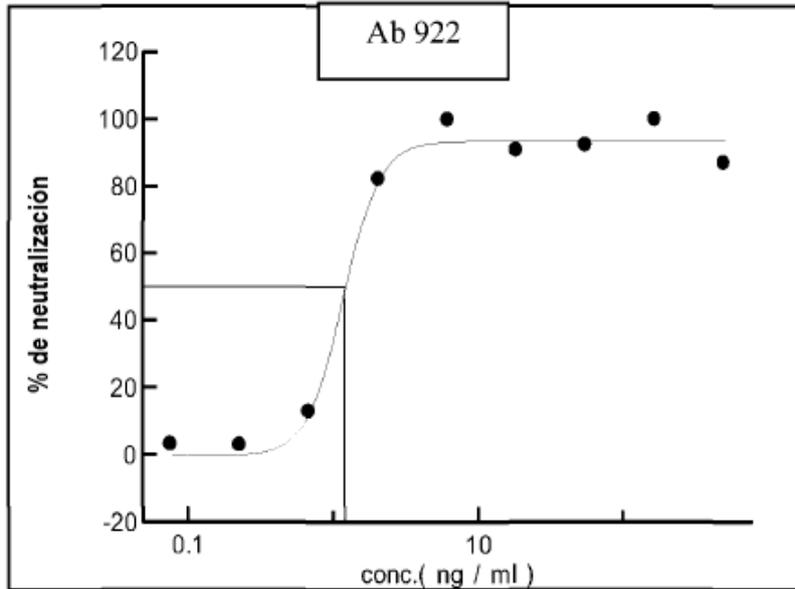


Figura 13 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

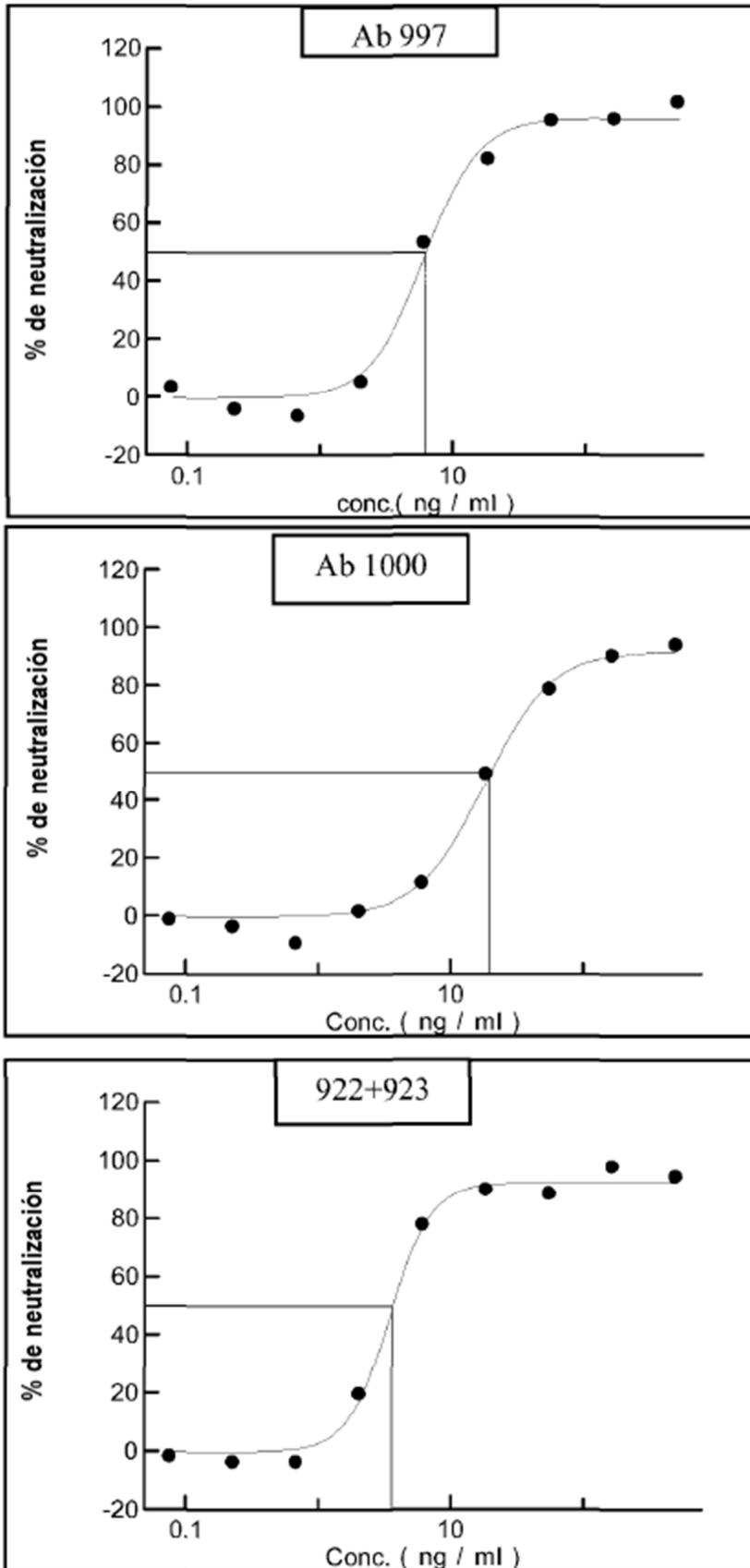


Figura 14 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab apareados (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

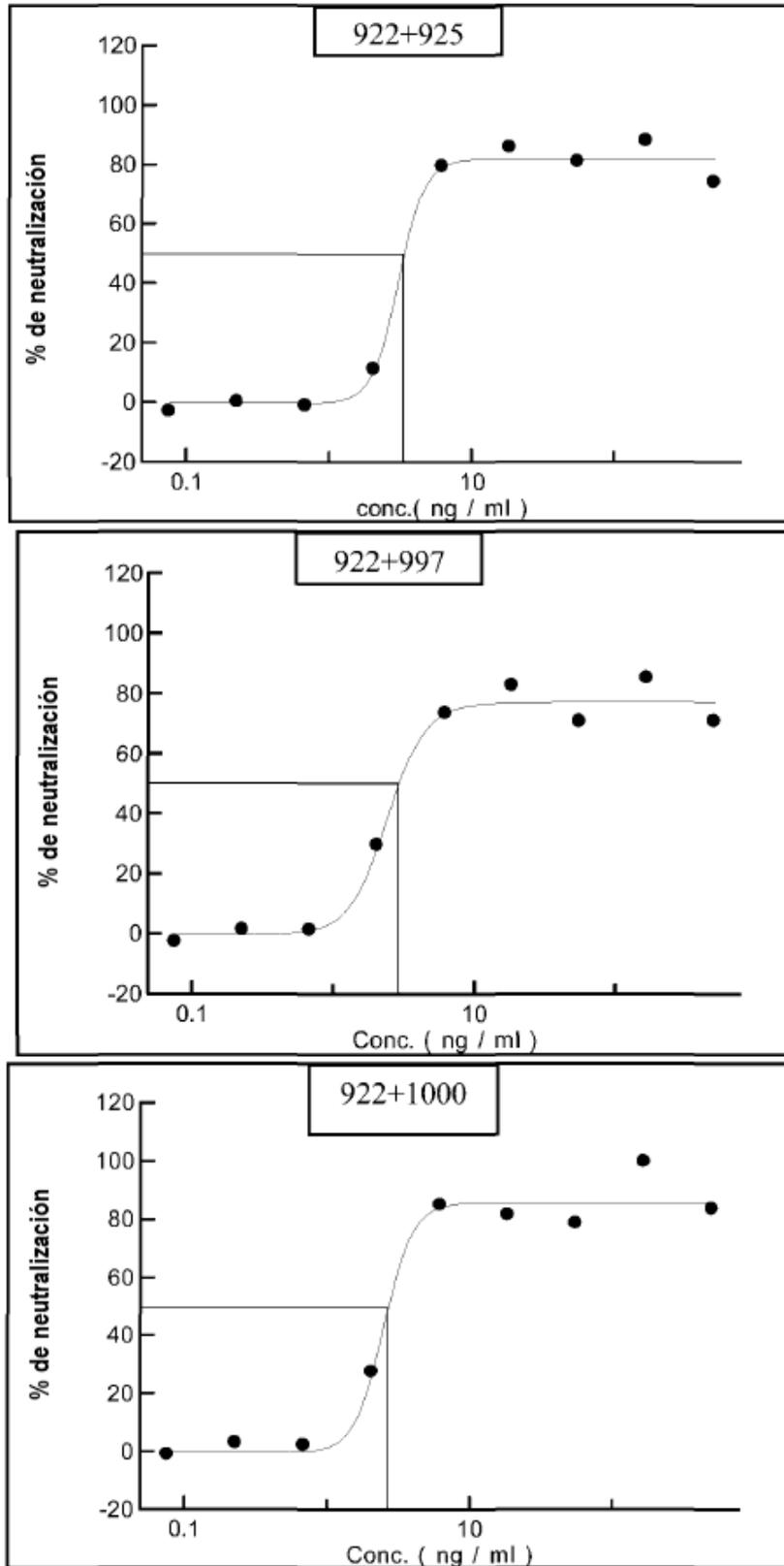


Figura 15 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab apareados (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

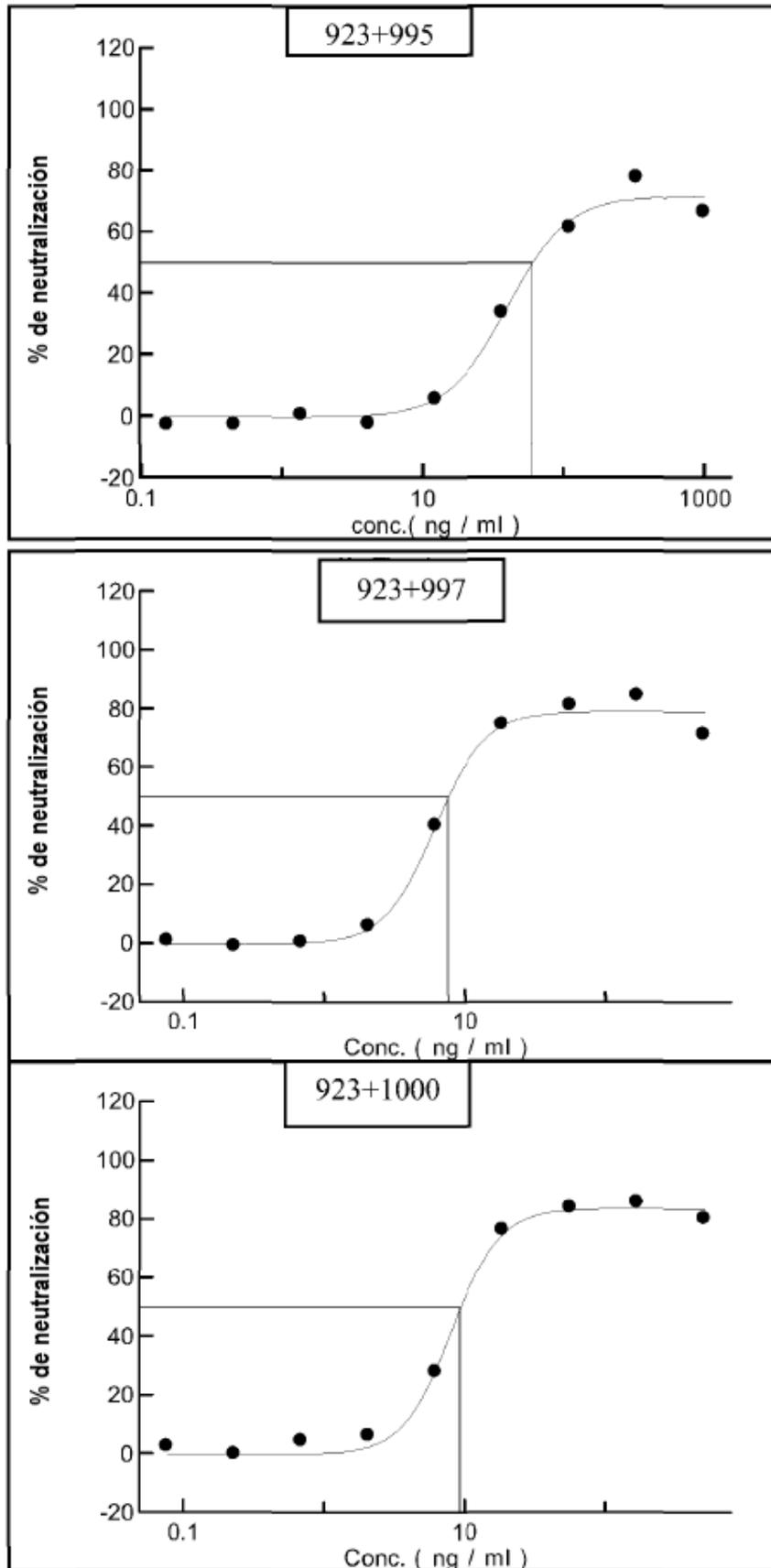


Figura 16 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para mezclas de 3 Mab (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

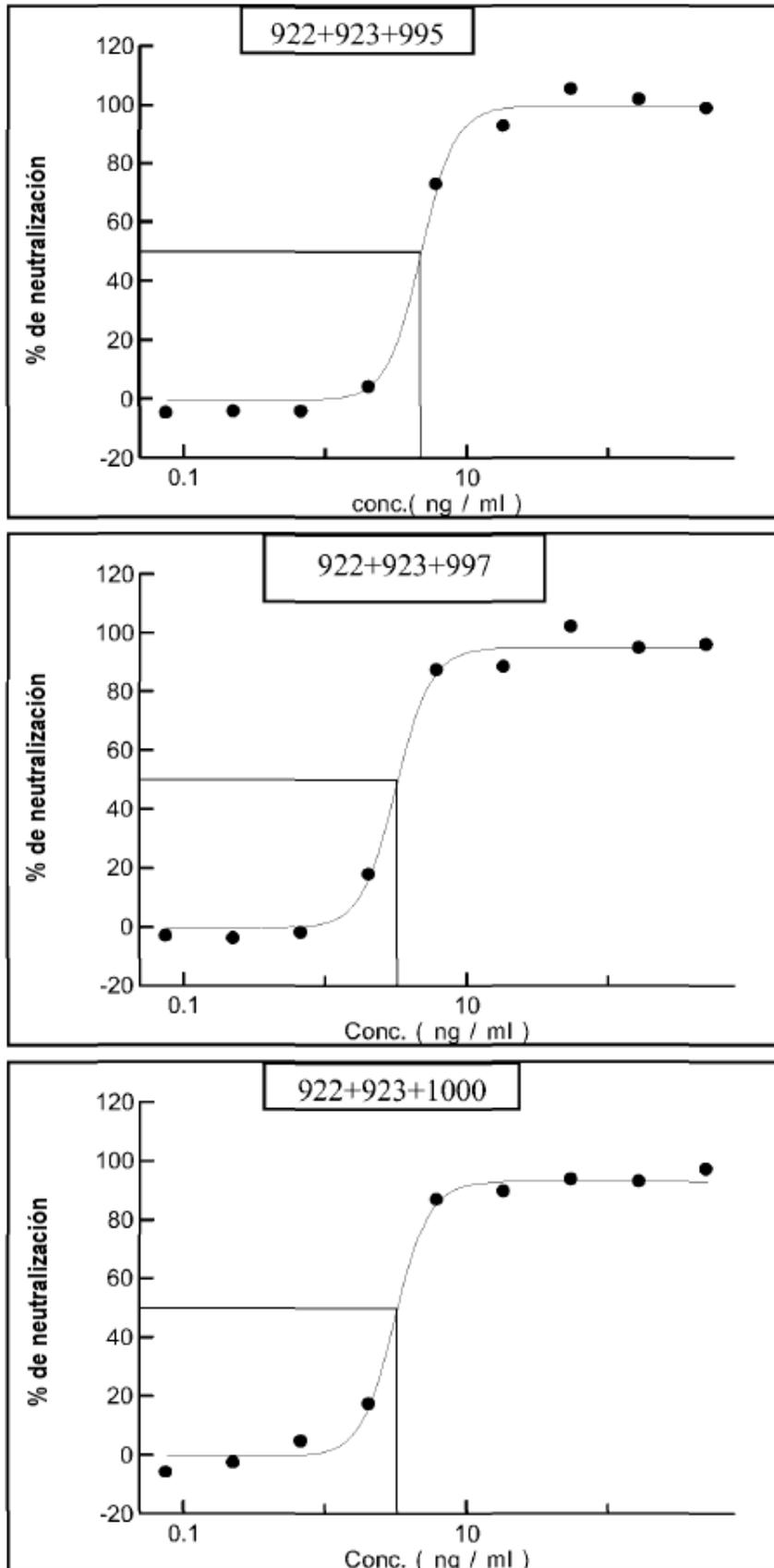


Figura 17 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para mezclas de 3 Mab (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

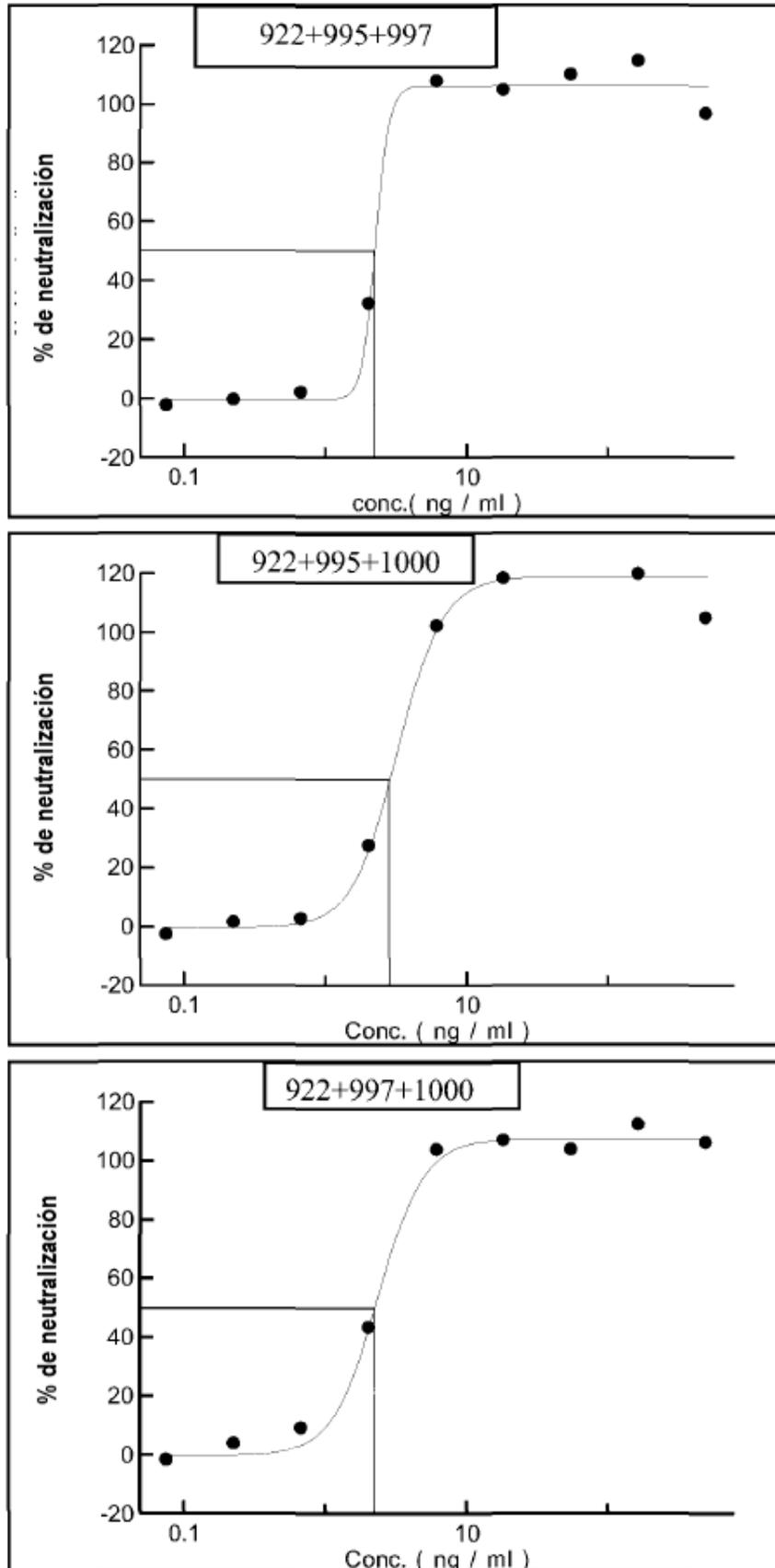


Figura 18 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para mezclas de 3 Mab (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

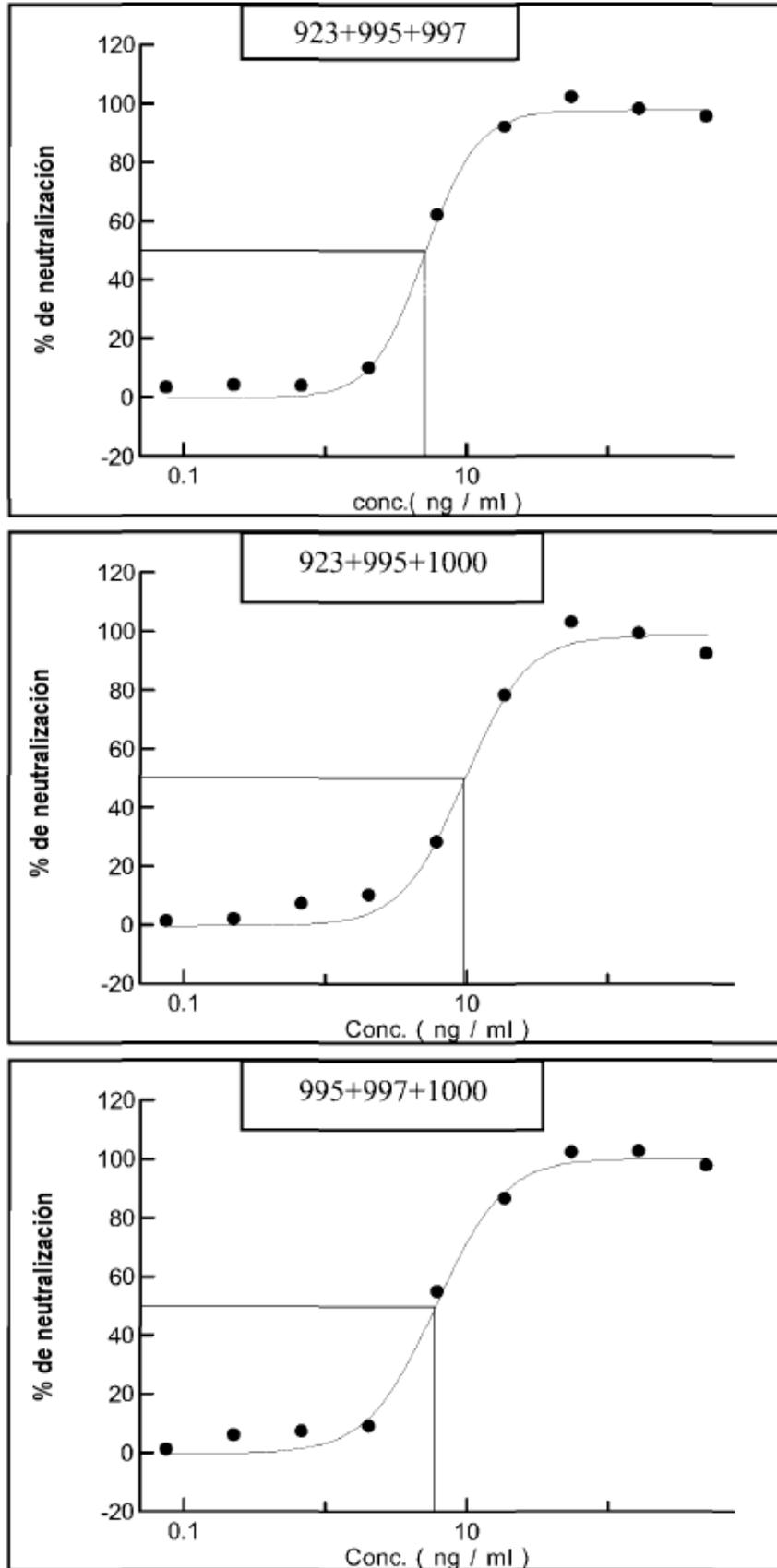


Figura 19 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para mezclas de 4 y 5 Mab (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

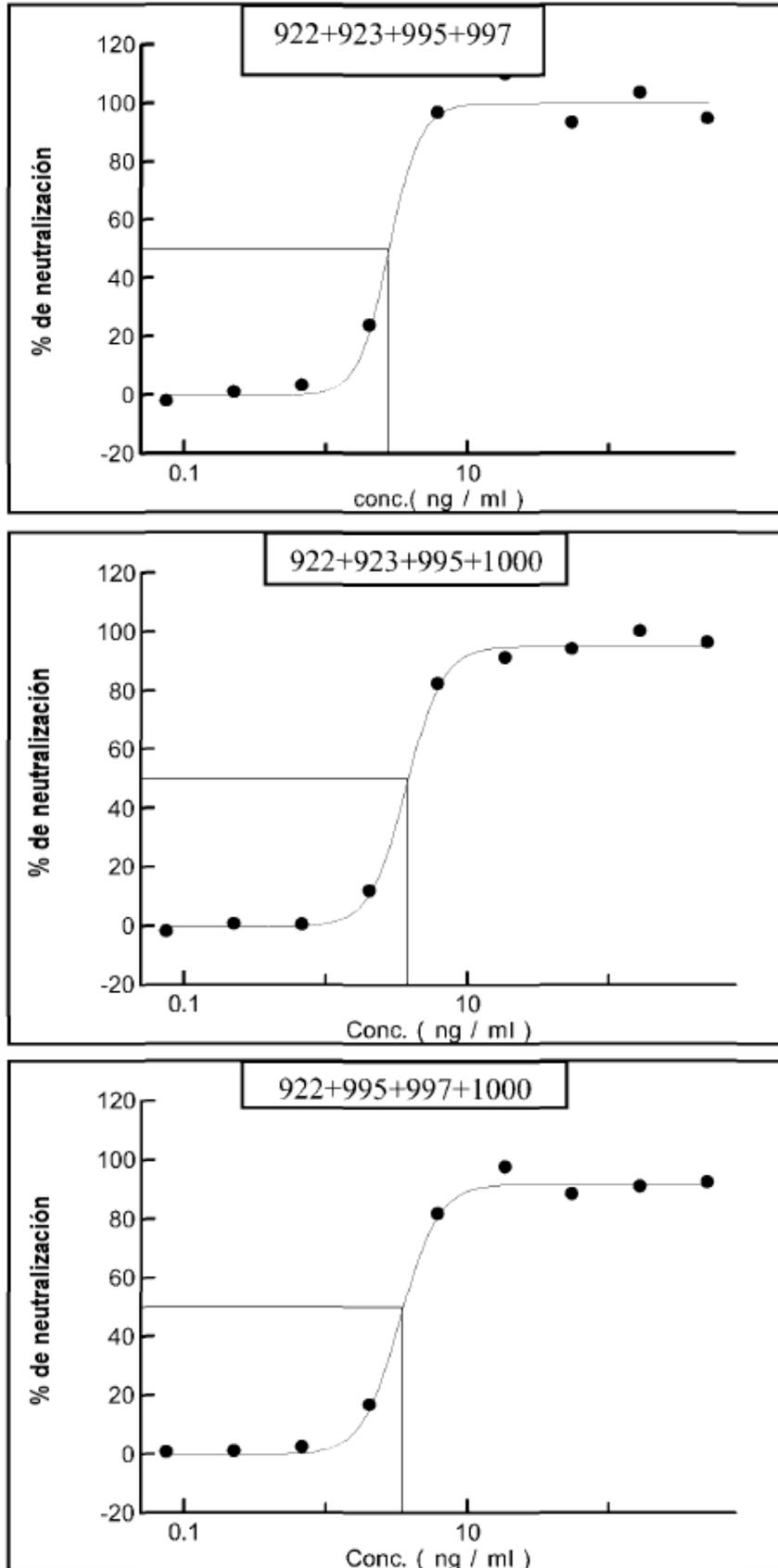


Figura 20 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para mezclas de 4 y 5 Mab (eje X conc. (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

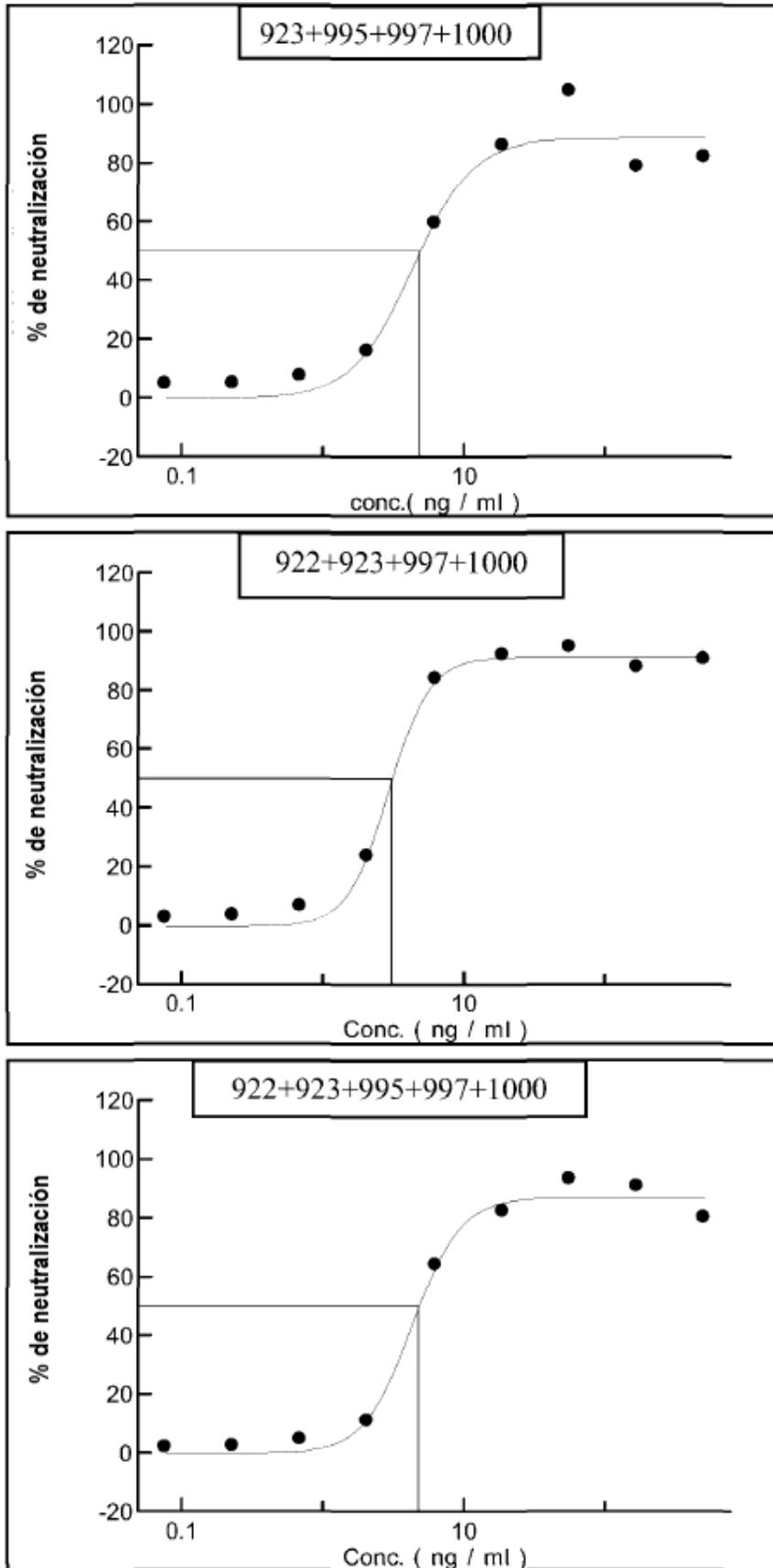


Figura 21 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos y apareados a diferentes concentraciones de TcdA (el eje X es conc ng/ml)

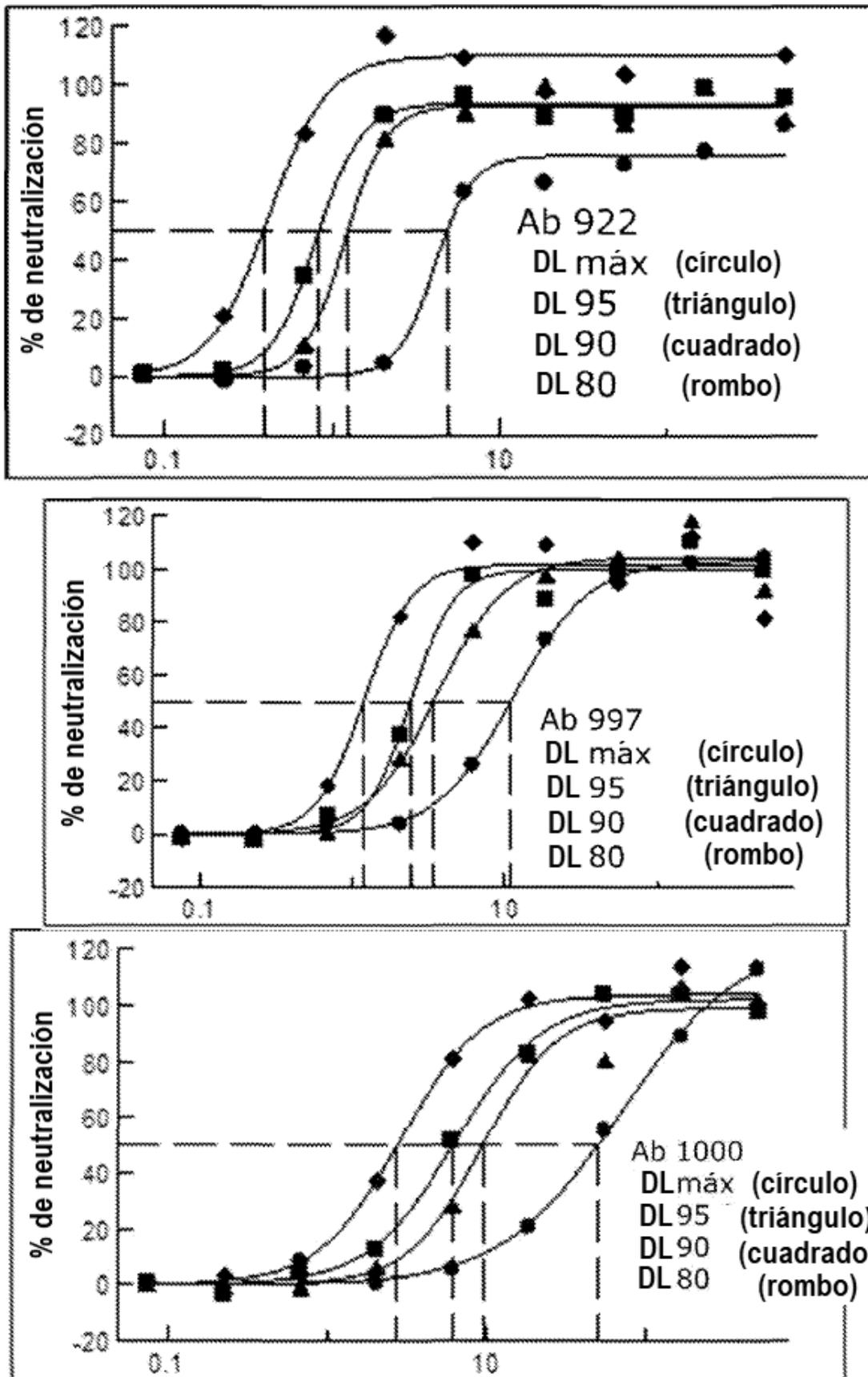


Figura 22 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos y apareados a diferentes concentraciones de TcdA (el eje X es conc ng/ml)

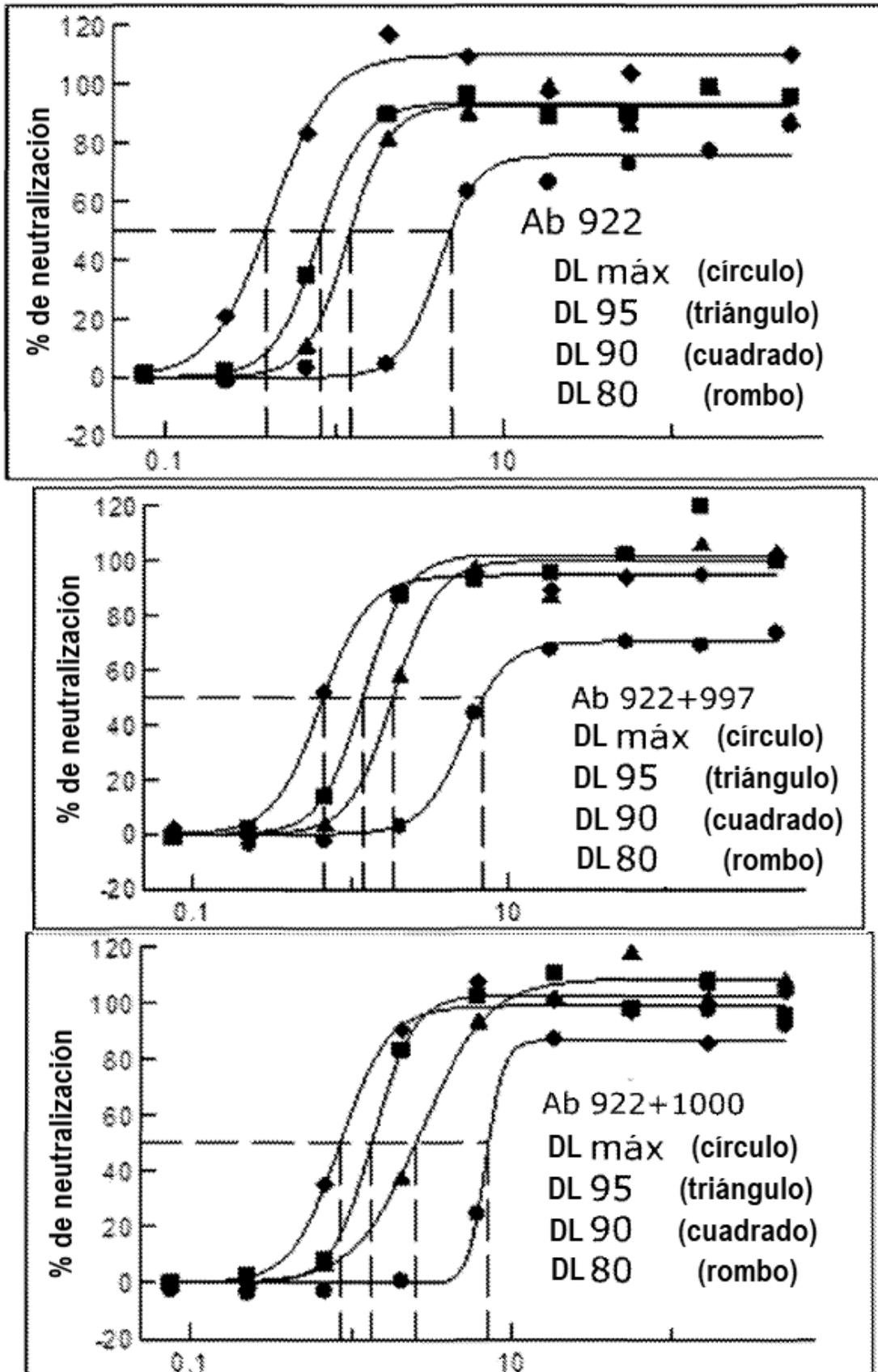


Figura 23 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos y mezclas de 5 Mab a diferentes concentraciones de TcdA (el eje X es conc ng/ml)

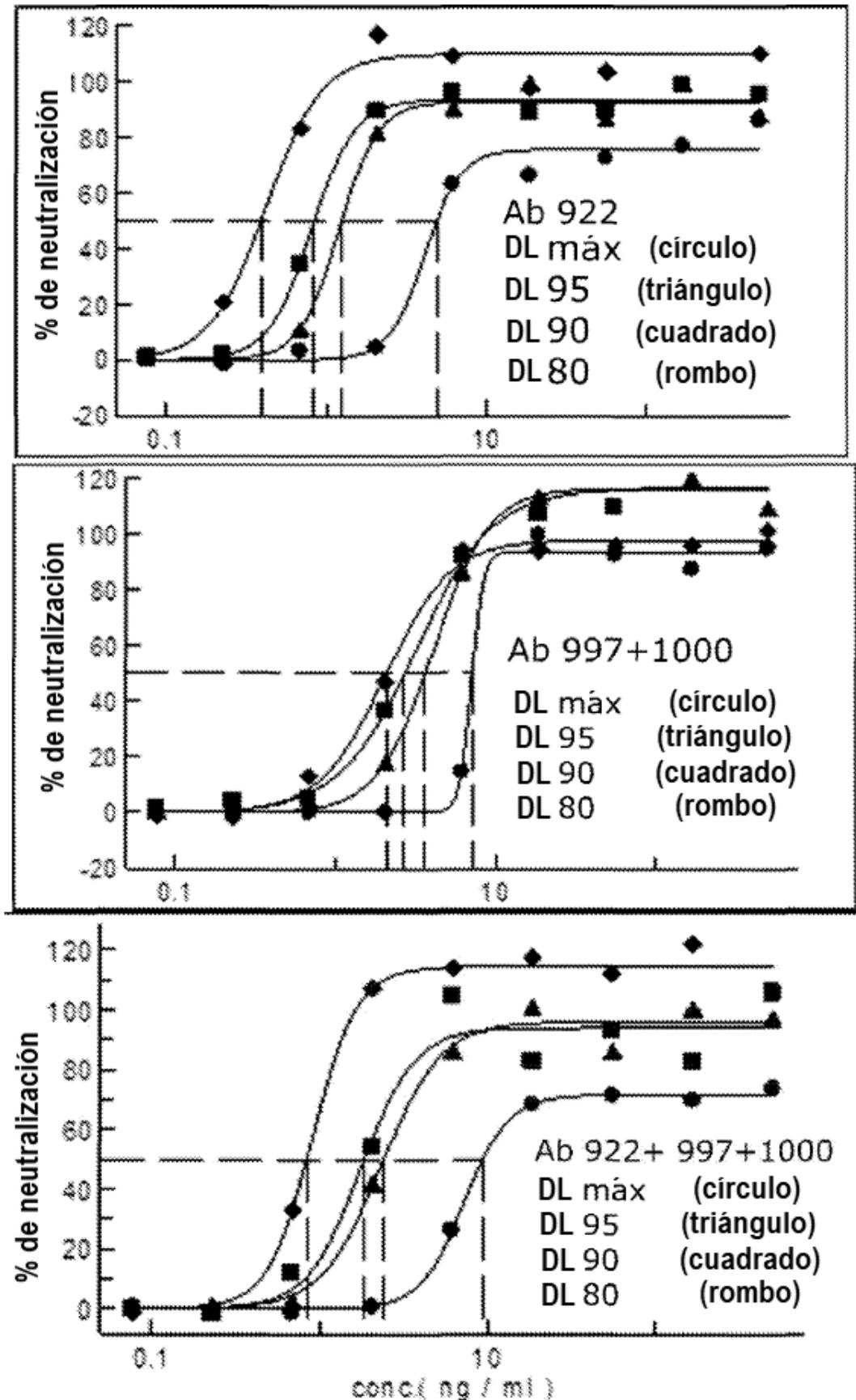


Figura 24 Datos de neutralización in vitro anti-TcdA (ribotipo 003) para Mab únicos y mezclas de 5 Mab a diferentes concentraciones de TcdA (el eje X es conc ng/ml)

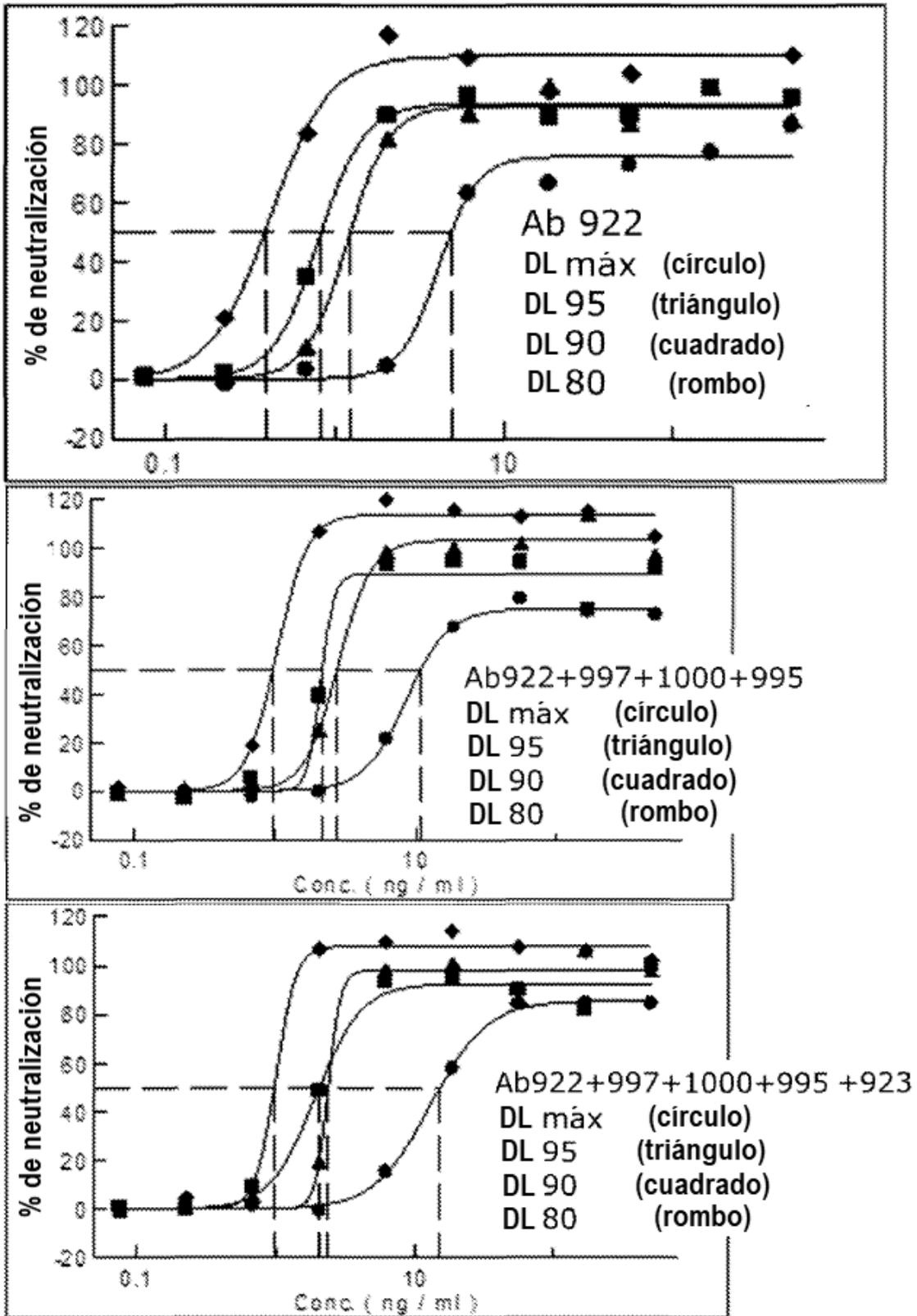


Figura 25 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para Mab únicos (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para 1125.g2, 1134.g5 y 927.g2, respectivamente)

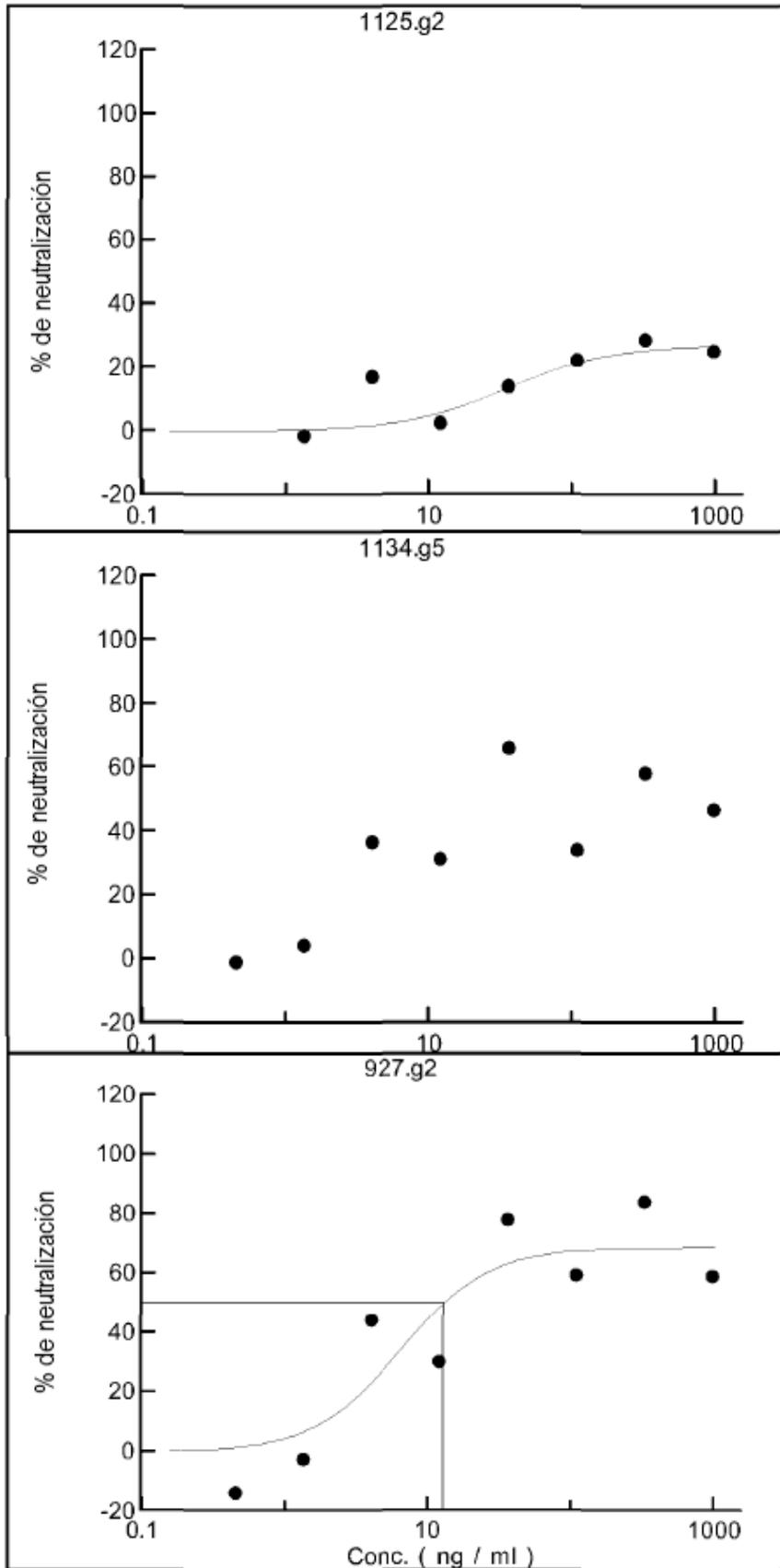


Figura 26 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para Mab únicos (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para 1153.g8 y 1102.g4, respectivamente)

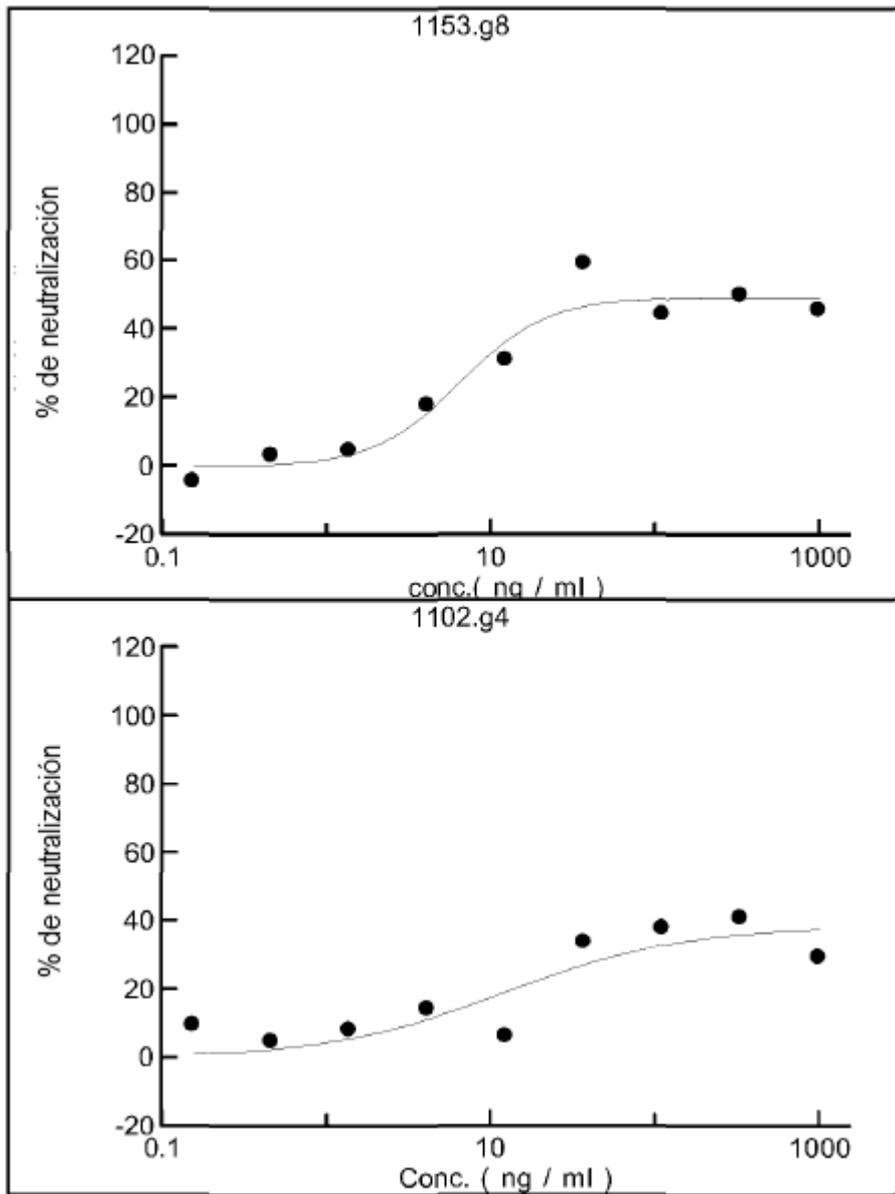


Figura 27 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para Mab apareados (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para combinaciones de 927 + 1099, 927 + 1102, 927 + 1114, respectivamente)

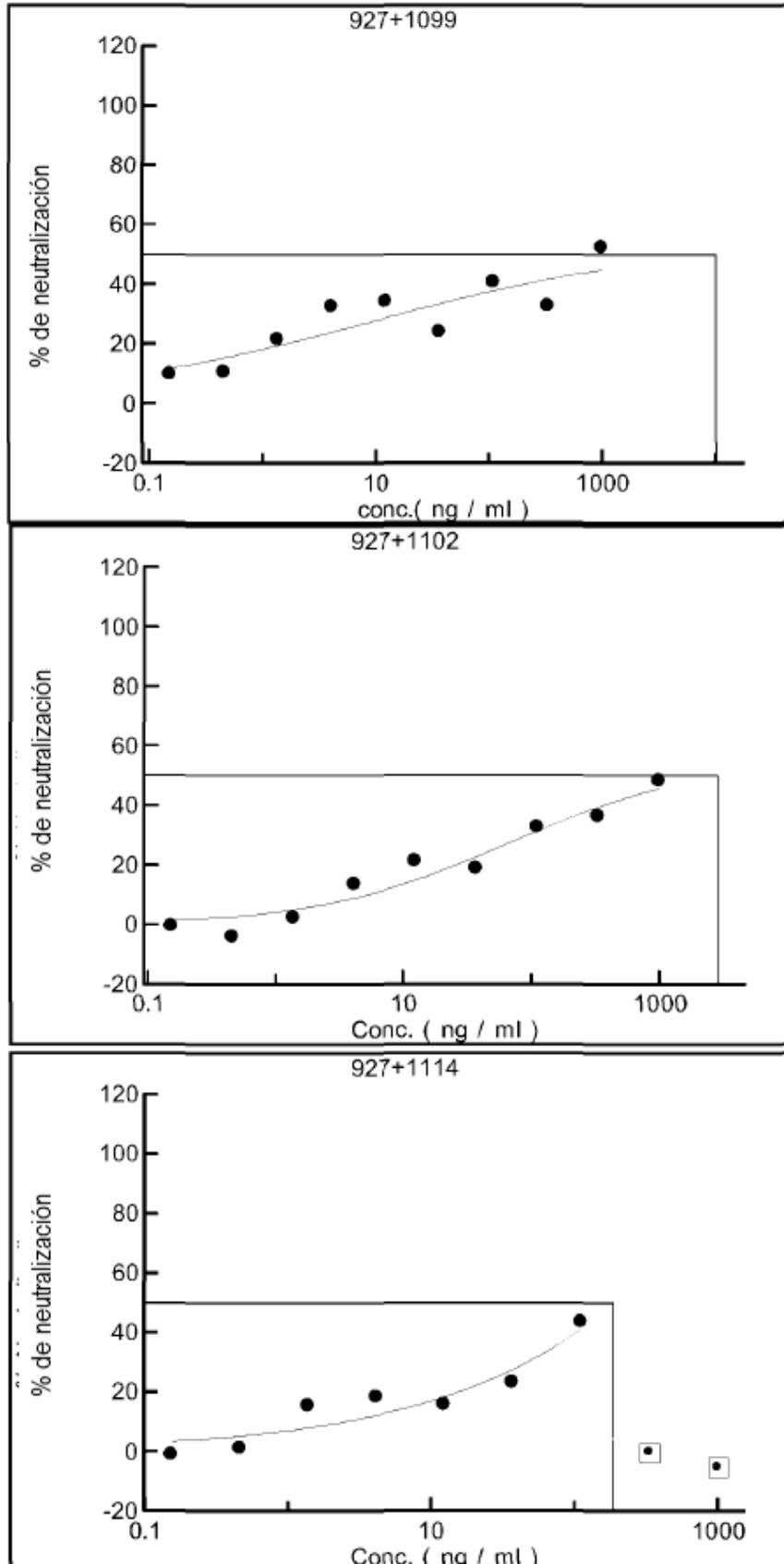


Figura 28 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para Mab apareados (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para combinaciones de 927 + 1125, 927 + 1134, 1099 + 1114, respectivamente)

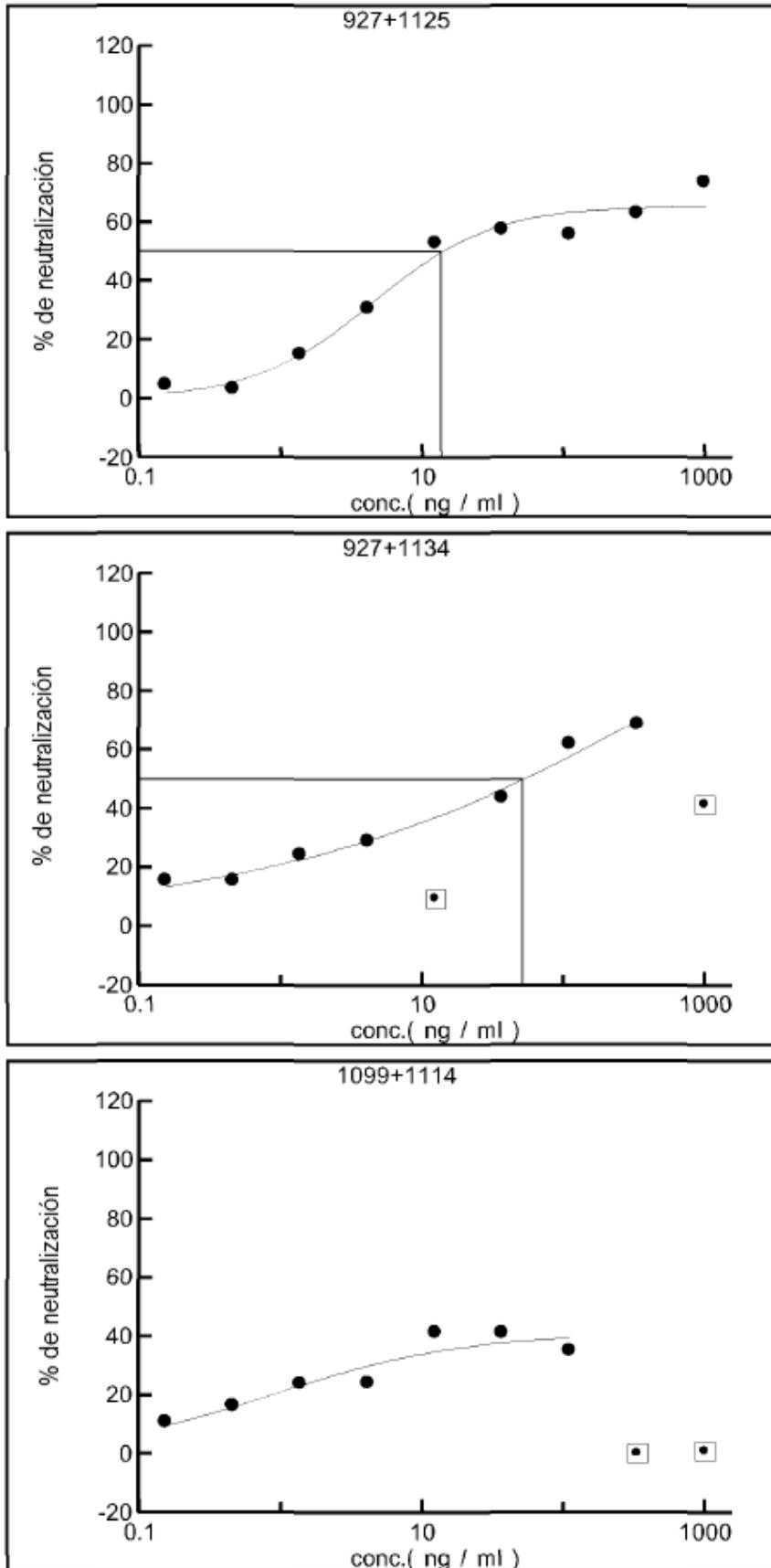


Figura 29 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para Mab apareados (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para combinaciones de 1102 + 1114, 1102 + 1125, 1114 + 1134, respectivamente)

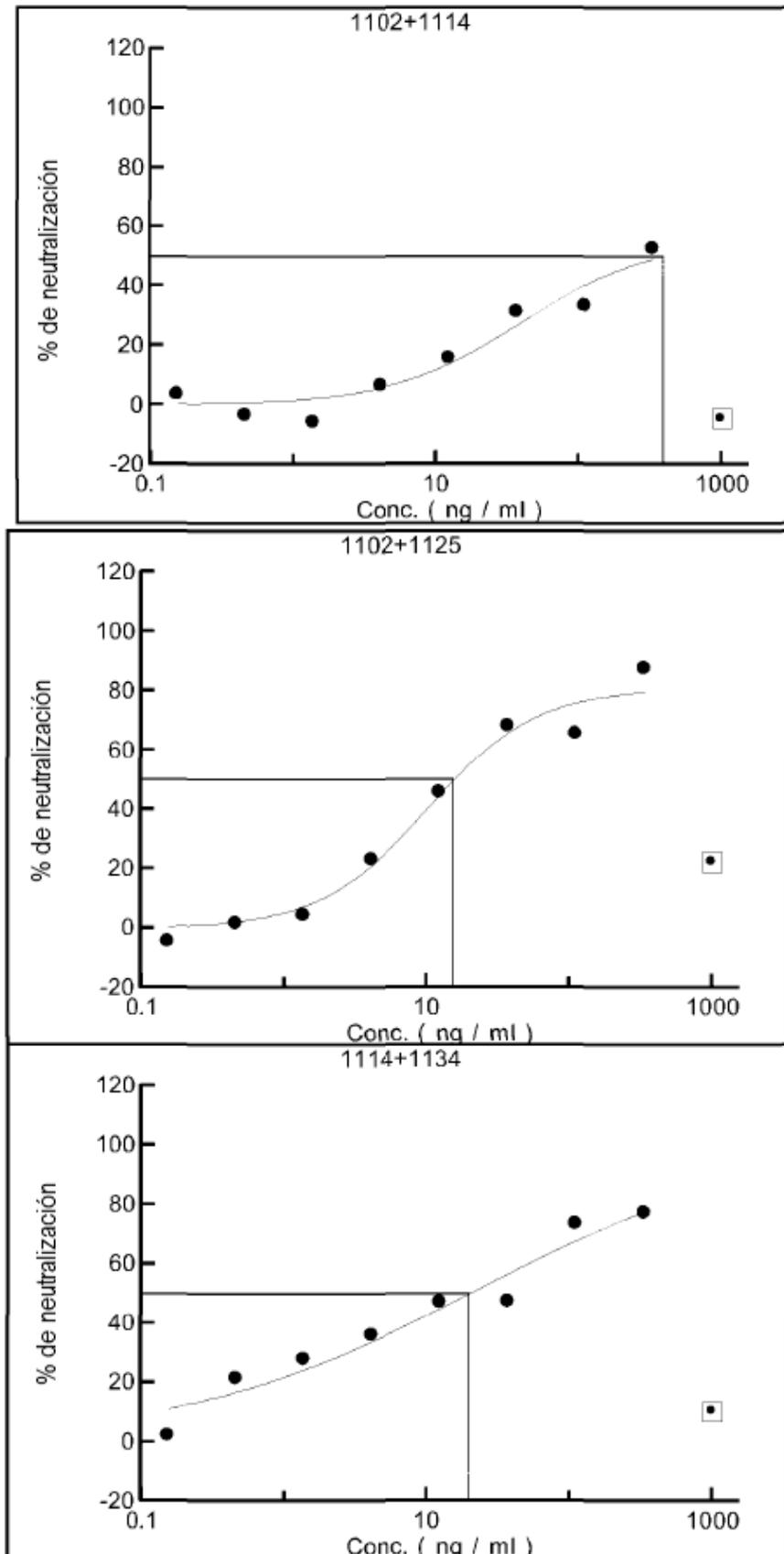


Figura 30 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para Mab apareados (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para combinaciones de 1114 + 1151, 1114 + 1153, 1125 + 1134, respectivamente)

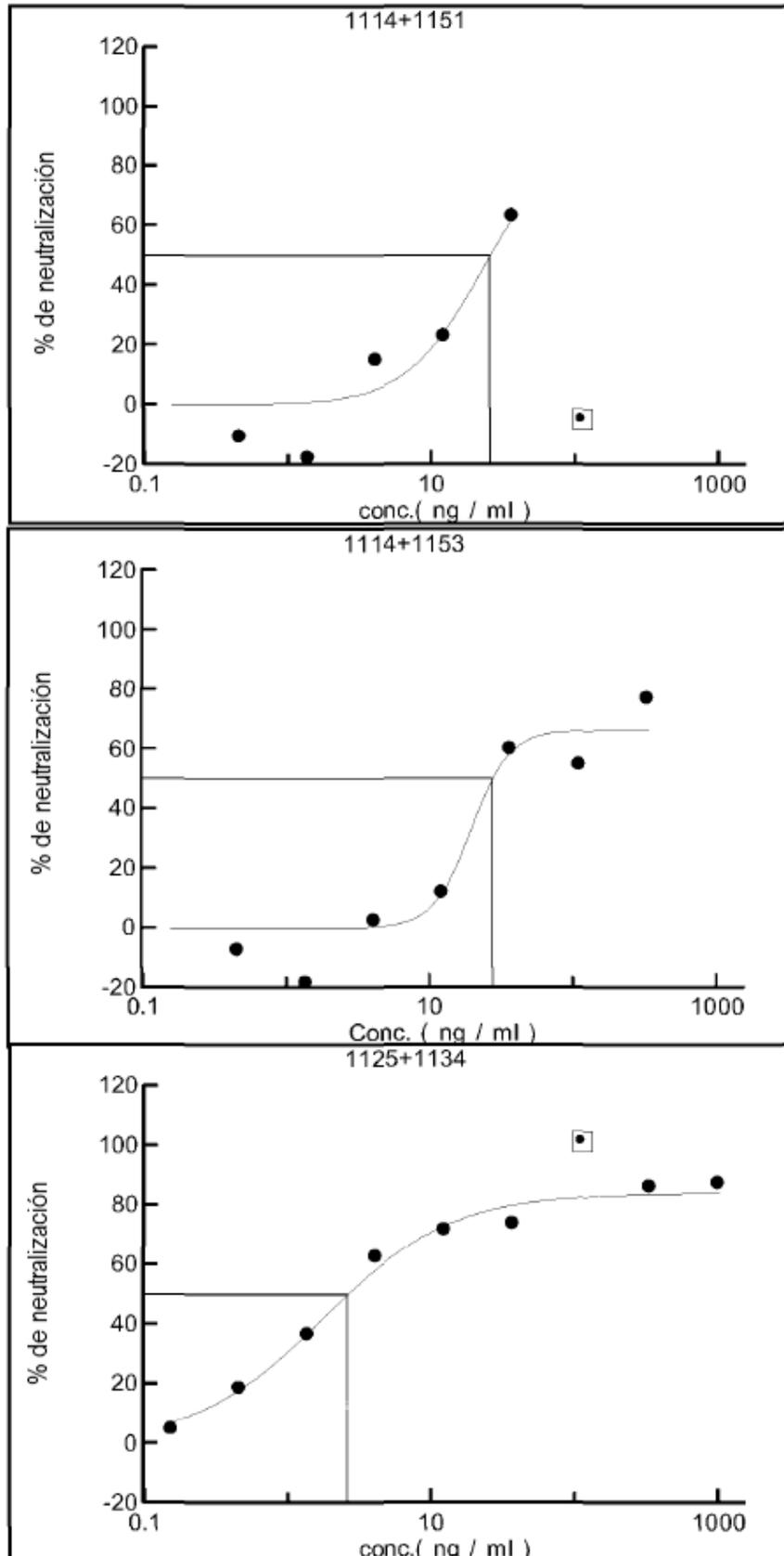


Figura 31 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 3 Mab (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para combinaciones de 1125 + 1134 + 1114, 1125 + 1134 + 927, 1125 + 1151 + 1114, respectivamente)

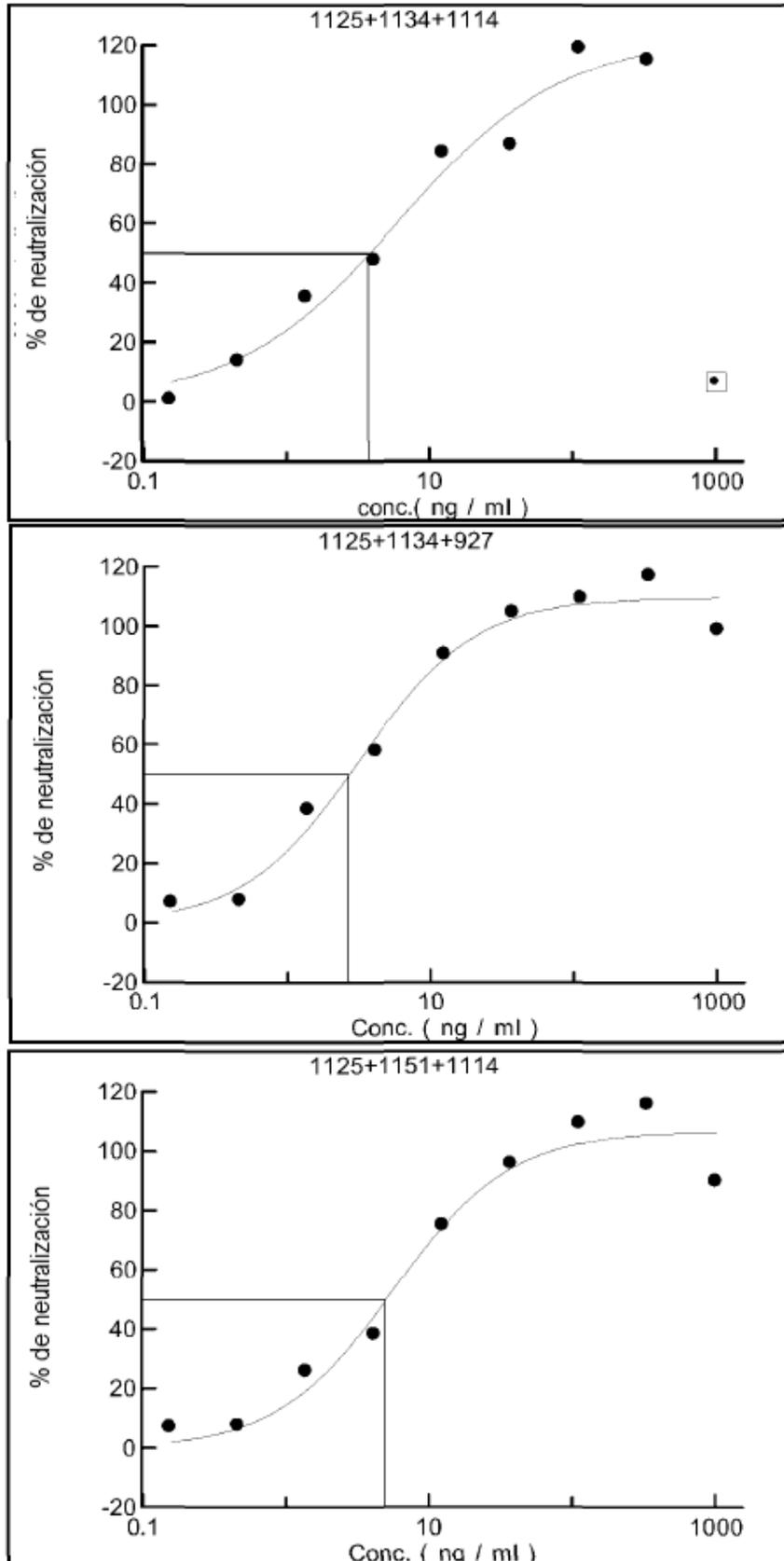


Figura 32 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 3 Mab (eje Y neutralización, eje X conc. ng/ml para combinaciones de 1125 + 1151 + 927, 1125.g2 + 1134.g5 + 927.g2, respectivamente)

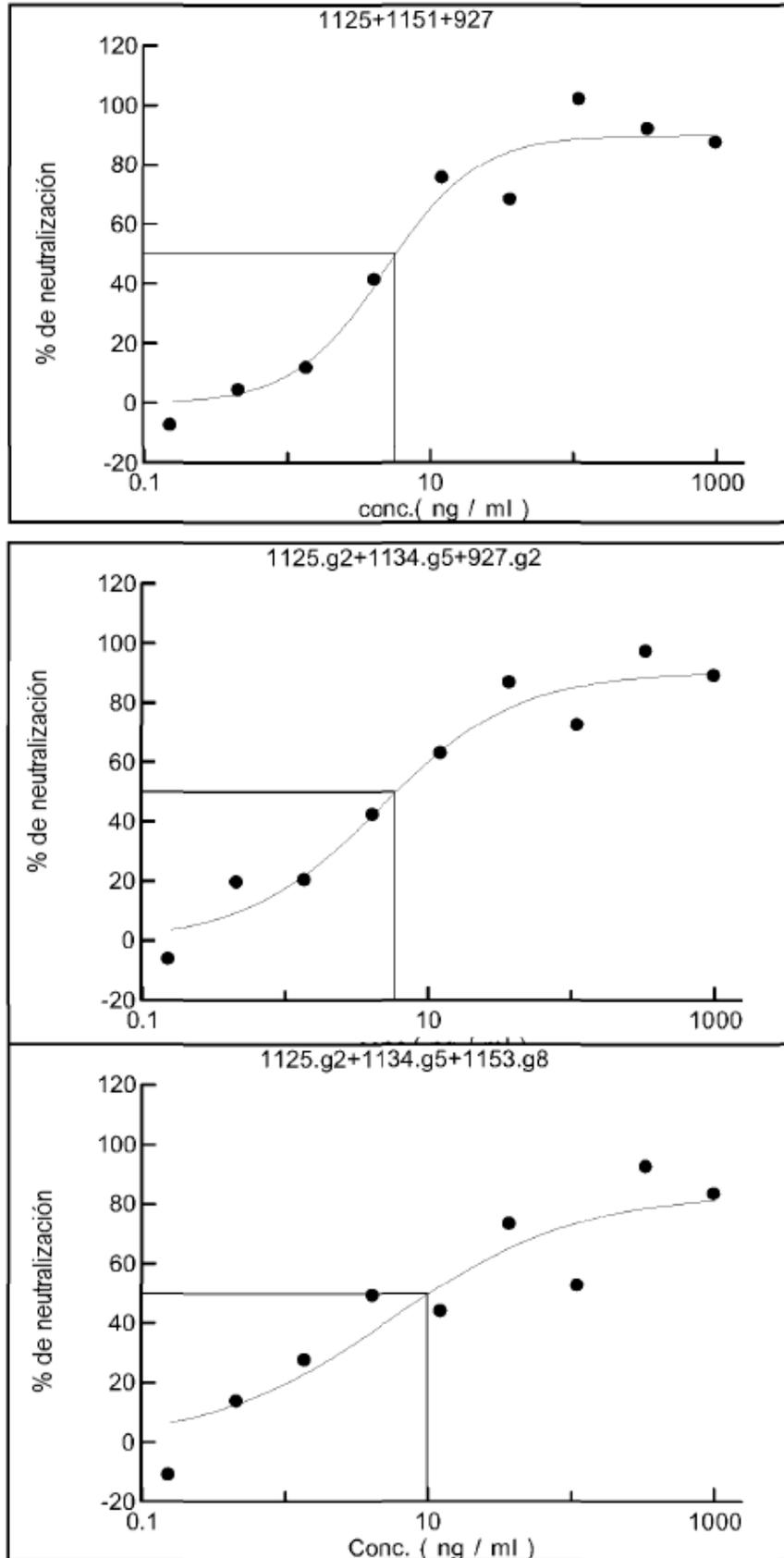


Figura 33 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 3 Mab

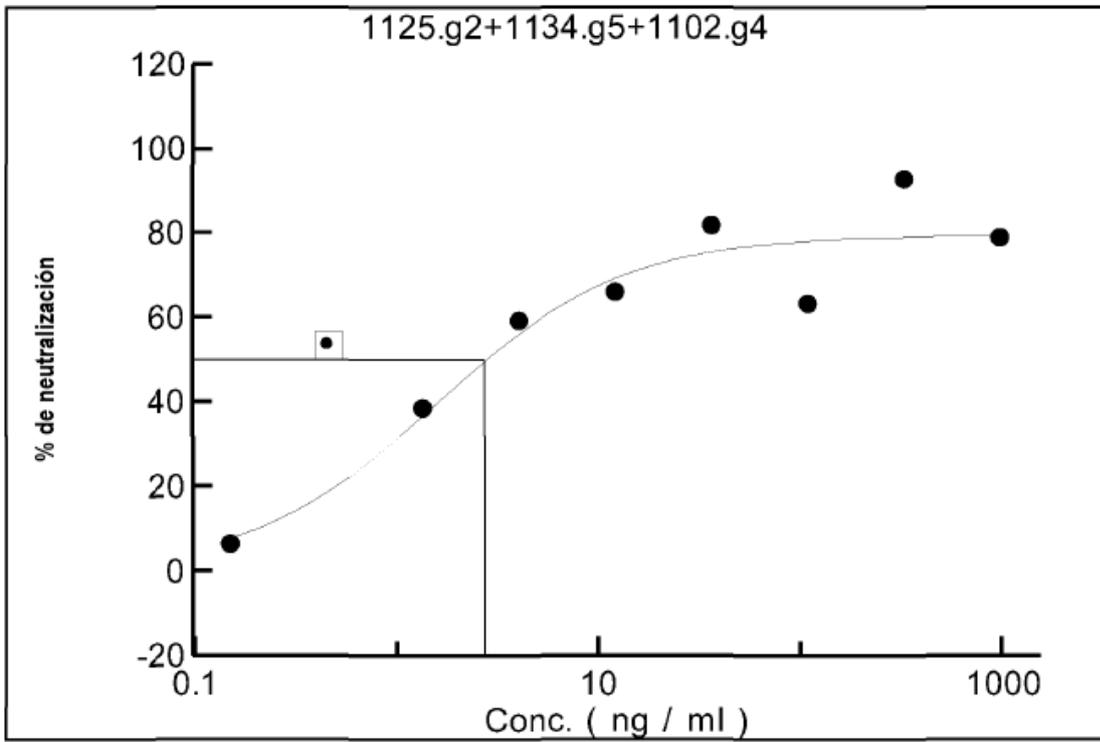


Figura 34 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes concentraciones de toxina

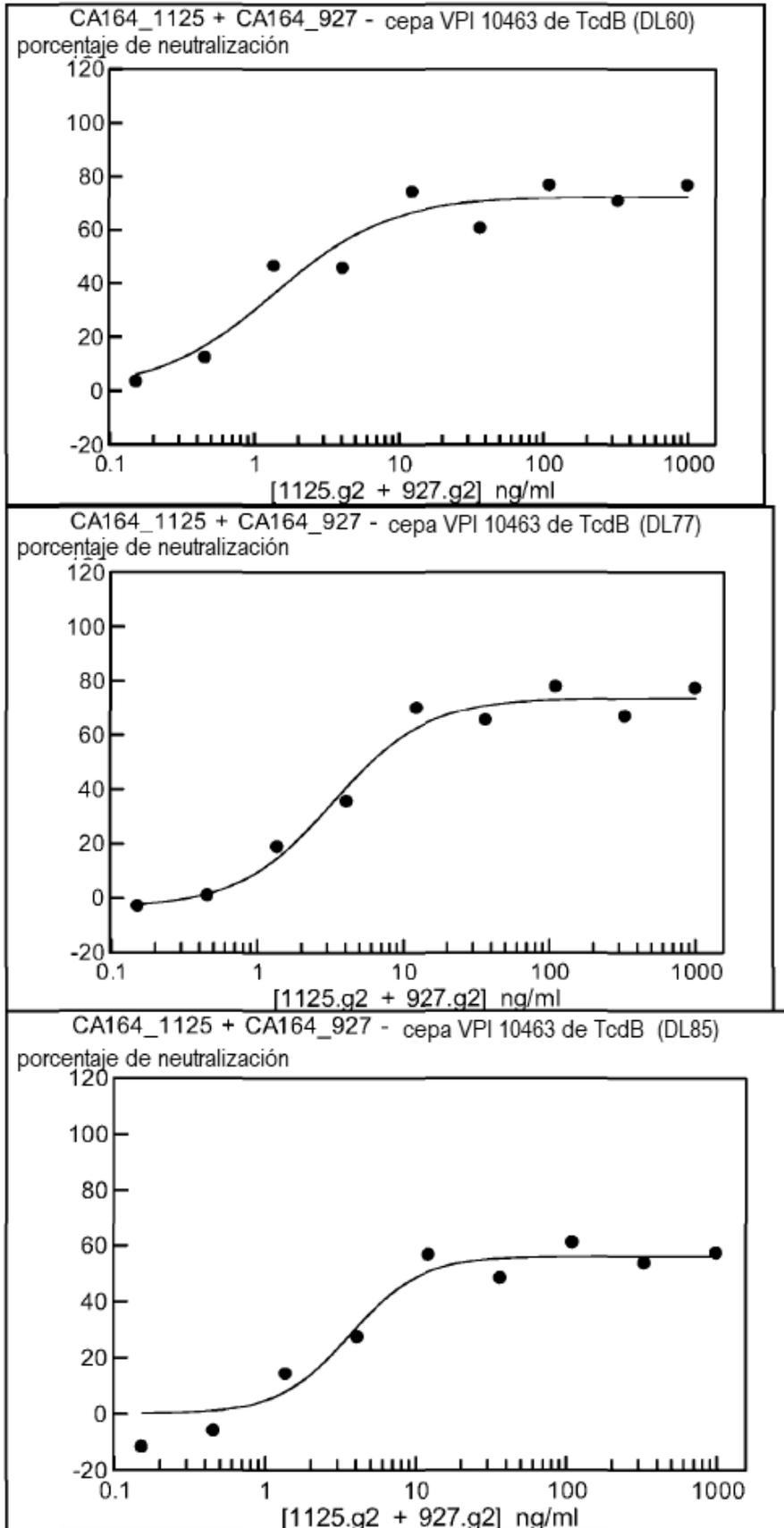


Figura 35 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes concentraciones de toxina

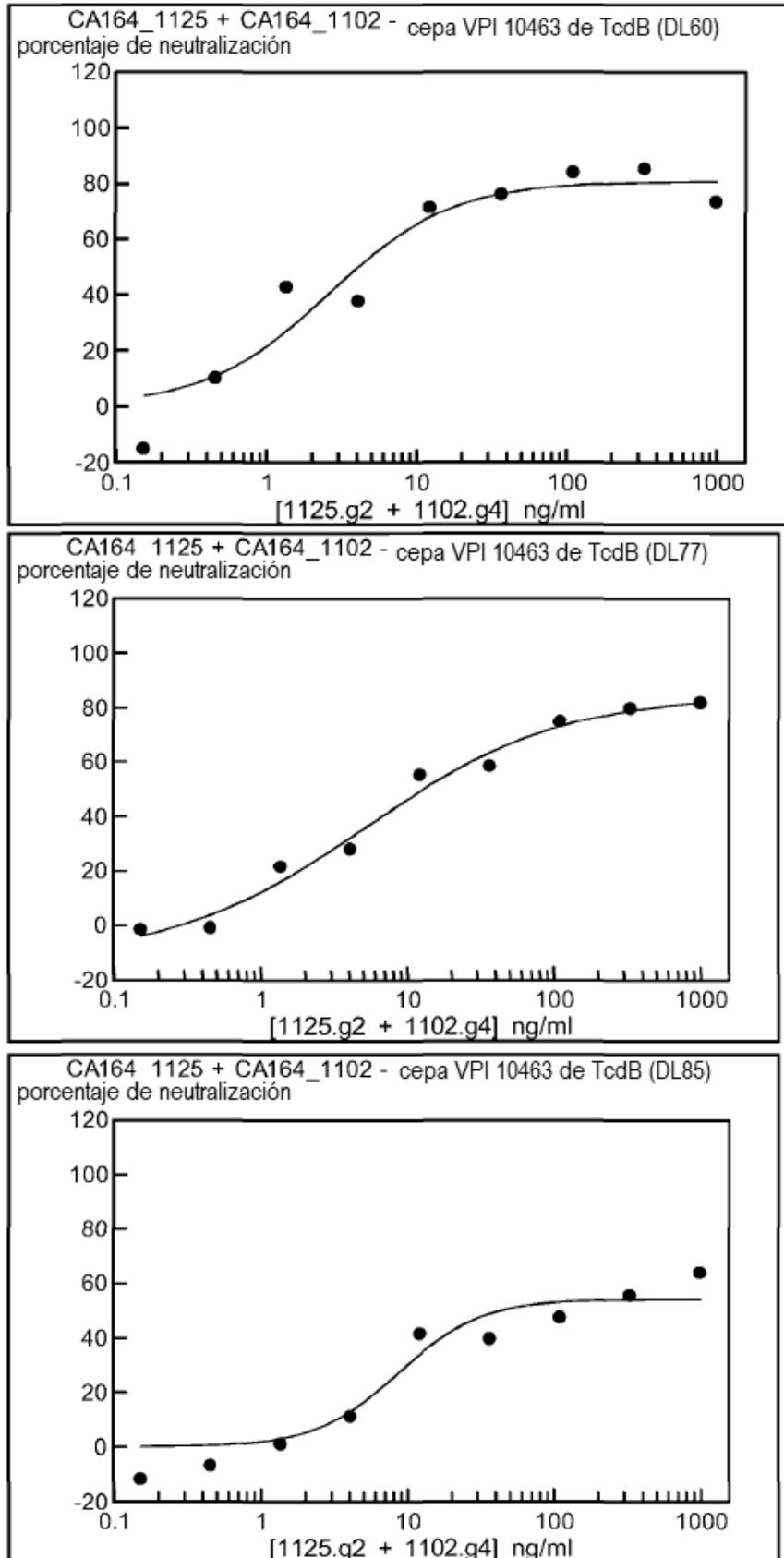


Figura 36 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes concentraciones de toxina

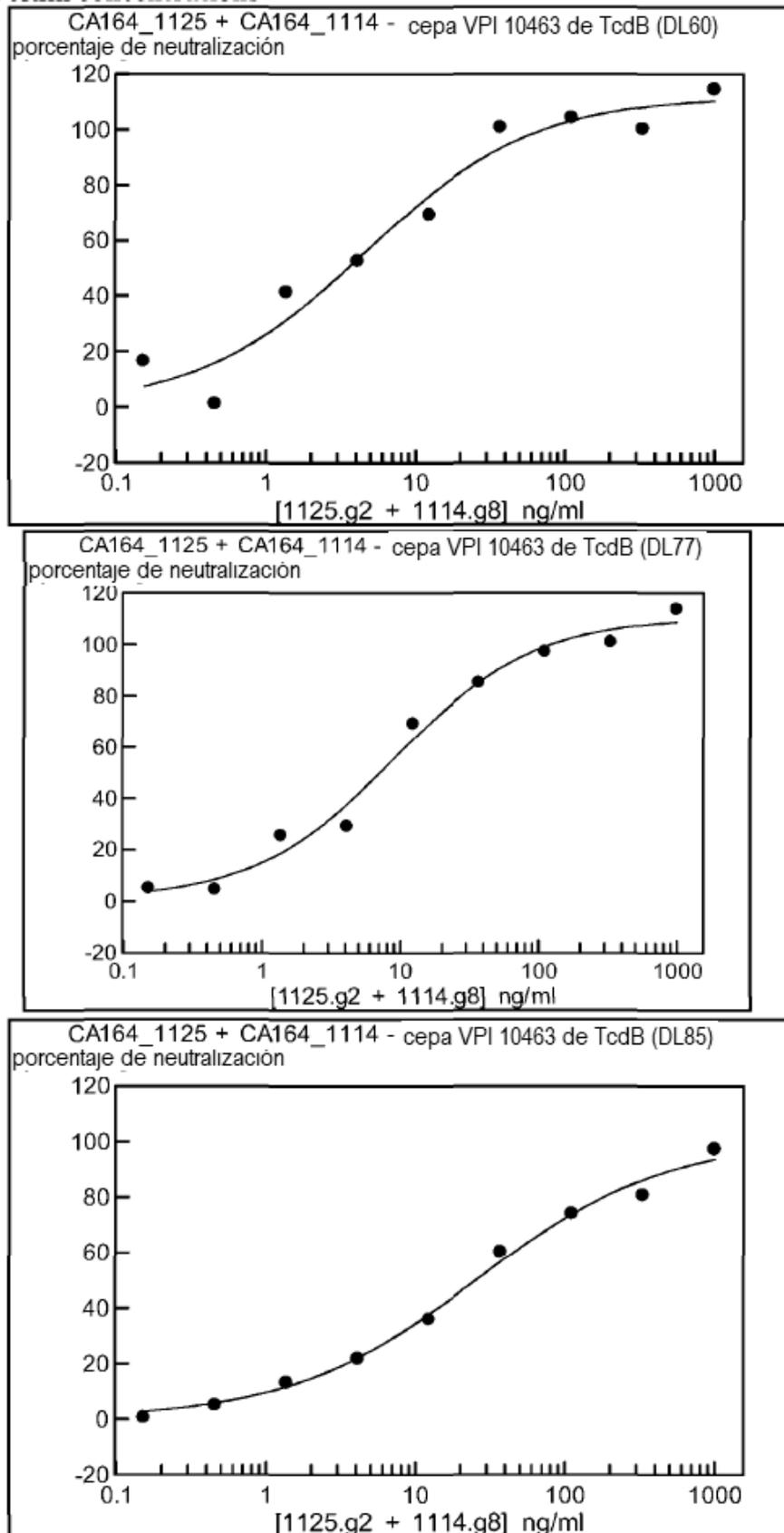


Figura 37 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes concentraciones de toxina

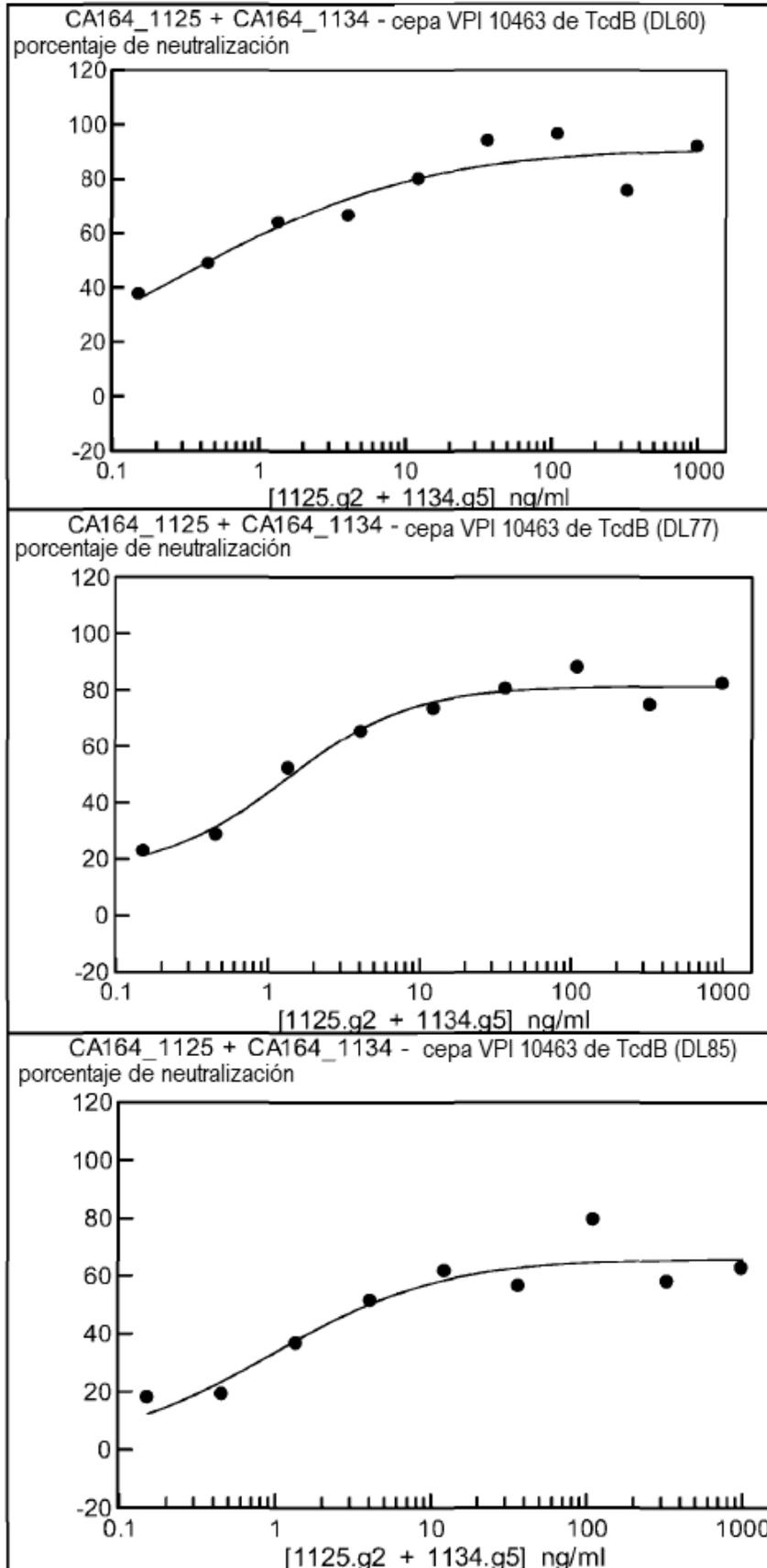


Figura 38 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes concentraciones de toxina

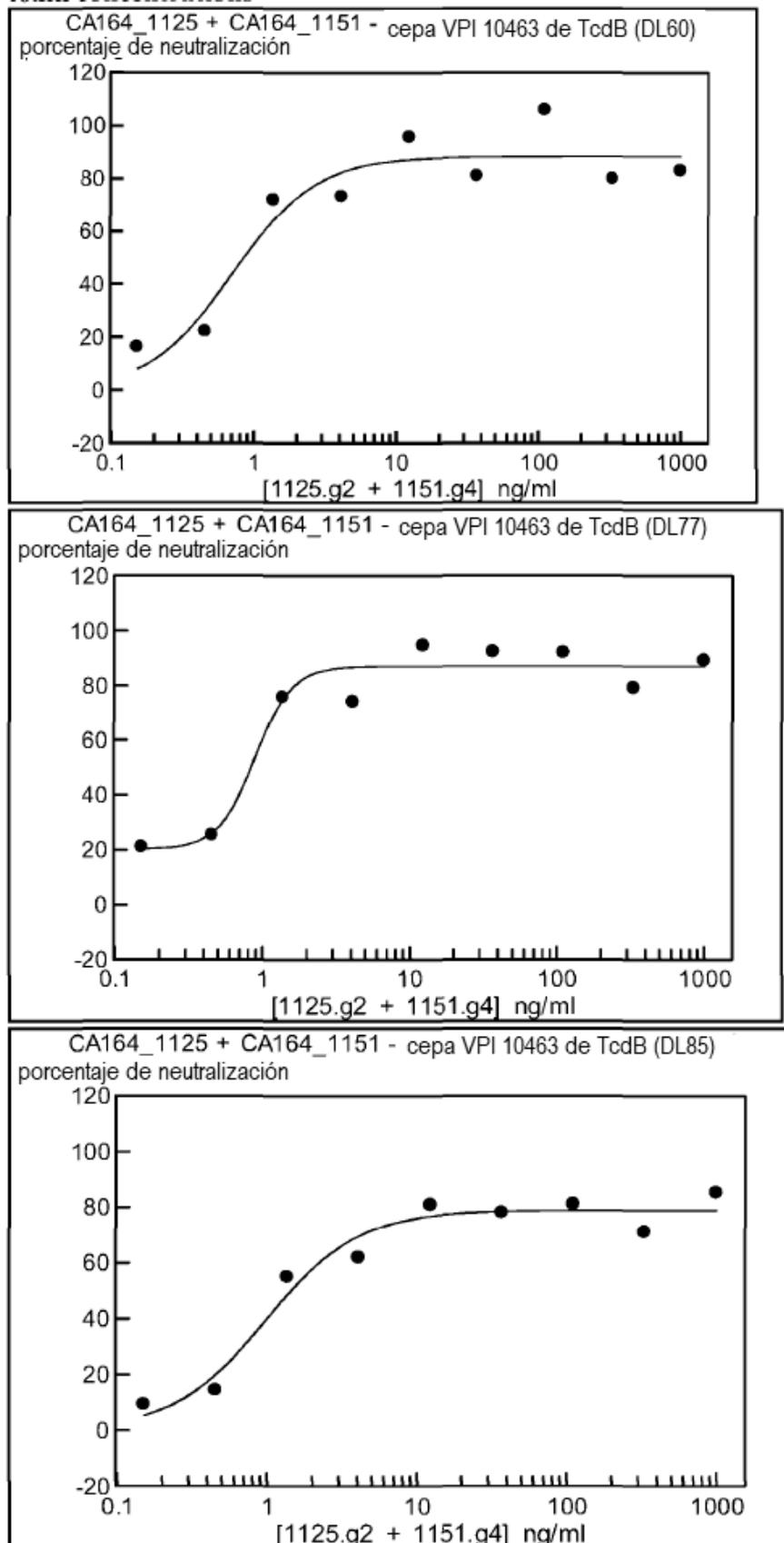


Figura 39 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes concentraciones de toxina

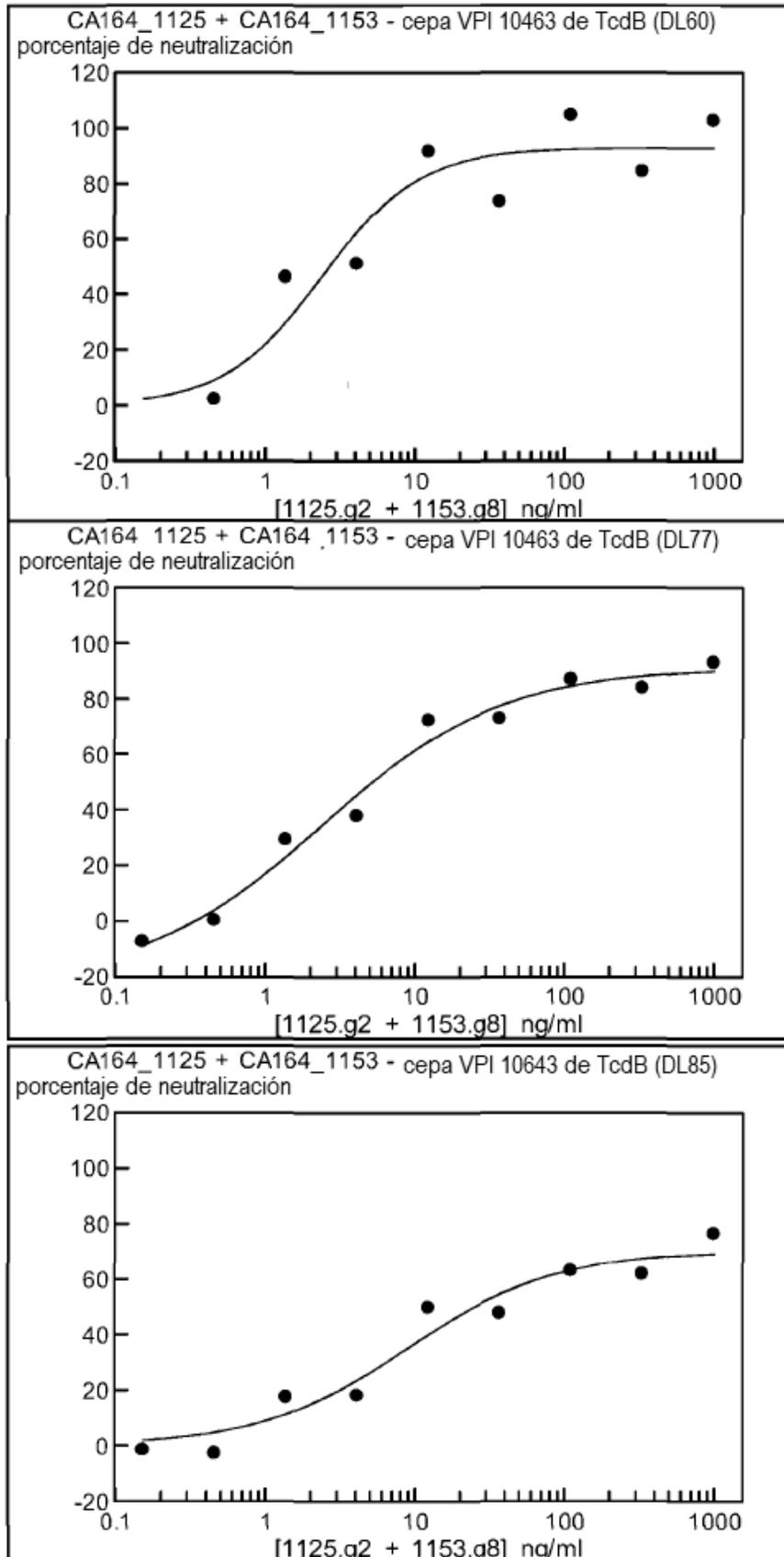


Figura 40 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes concentraciones de toxina

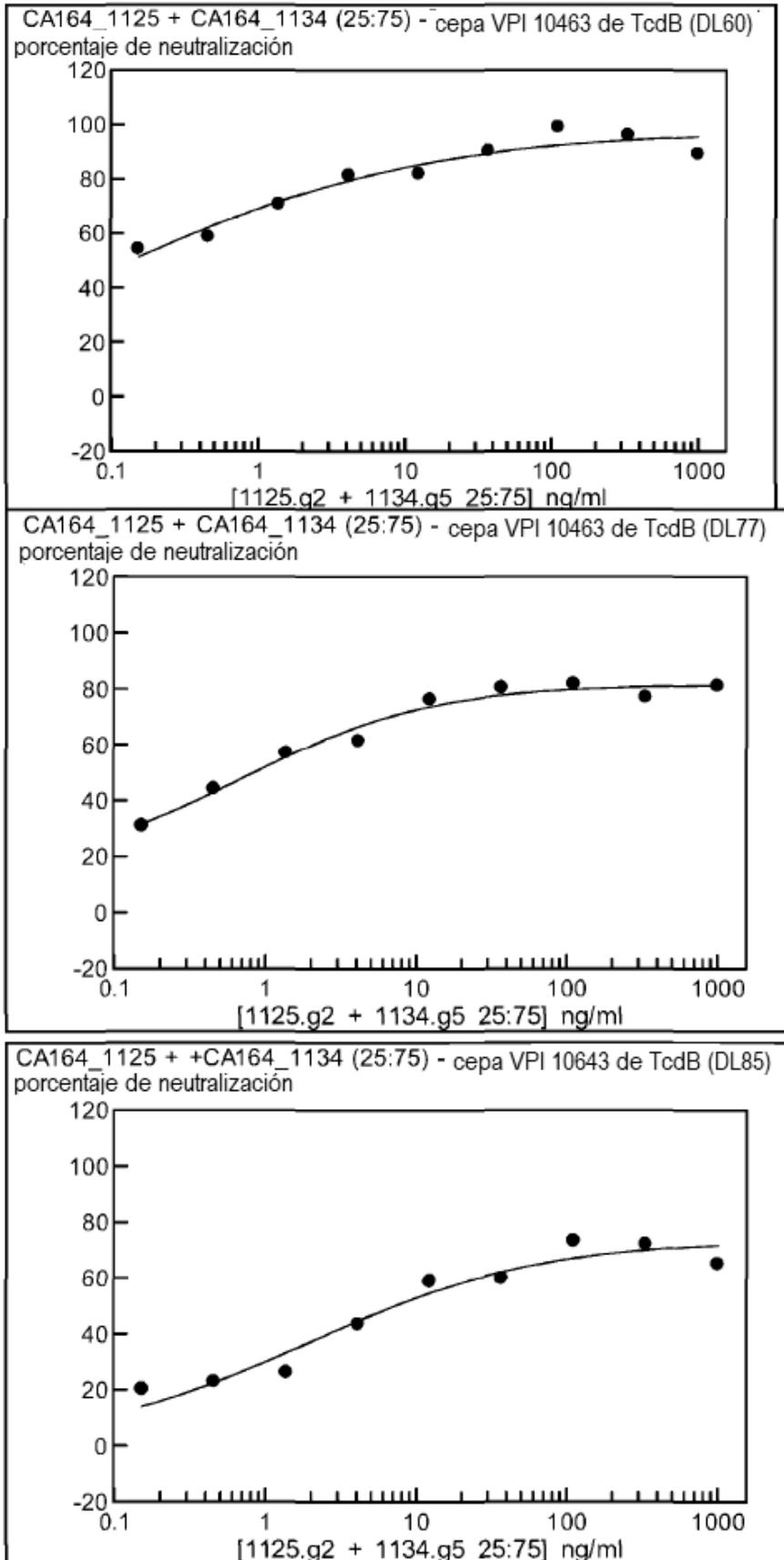


Figura 41 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes relaciones relativas de Mab y diferentes concentraciones de toxina

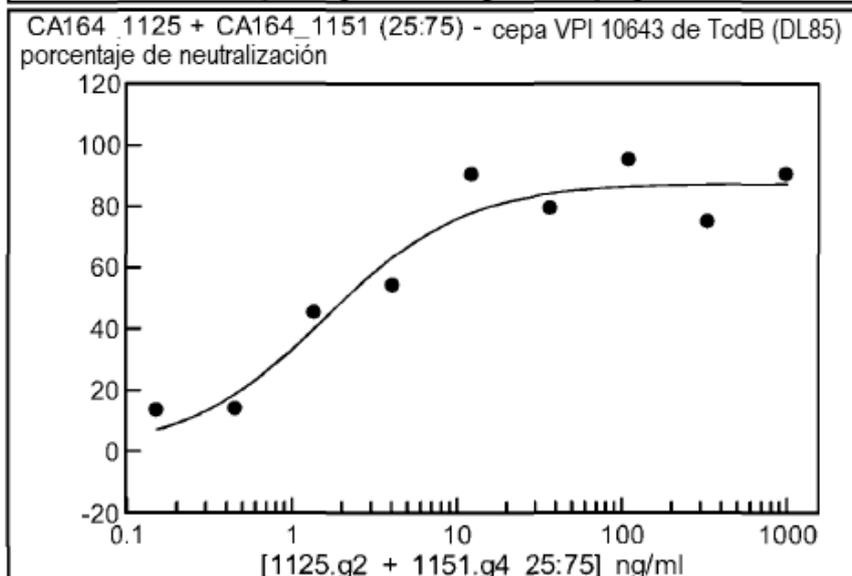
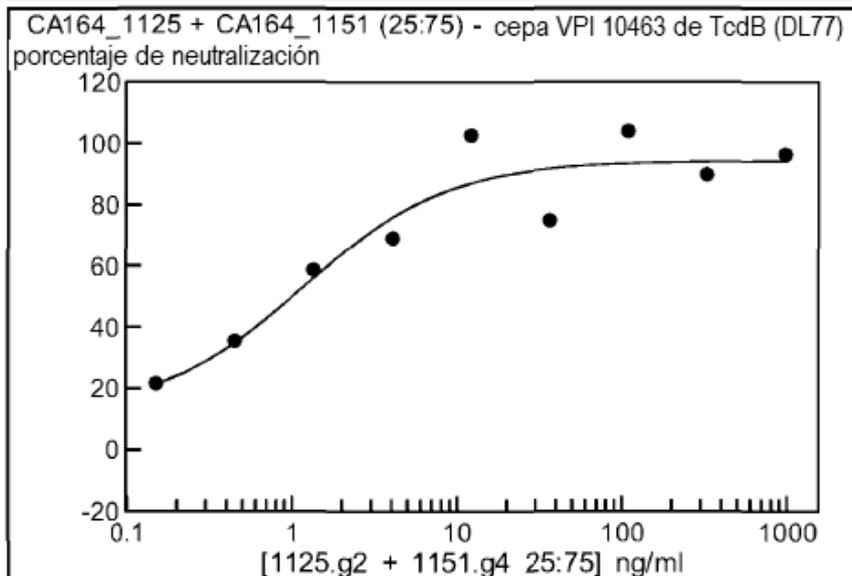
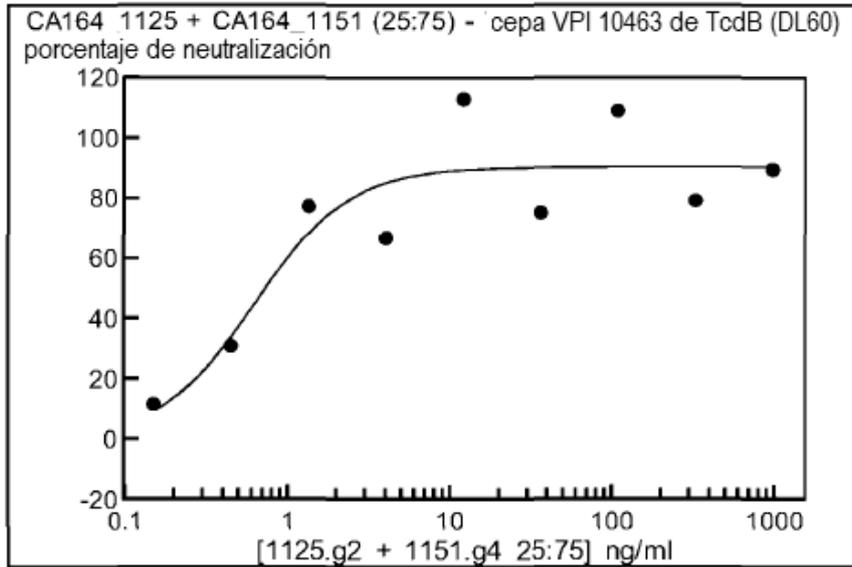


Figura 42 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes relaciones relativas de Mab y diferentes concentraciones de toxina

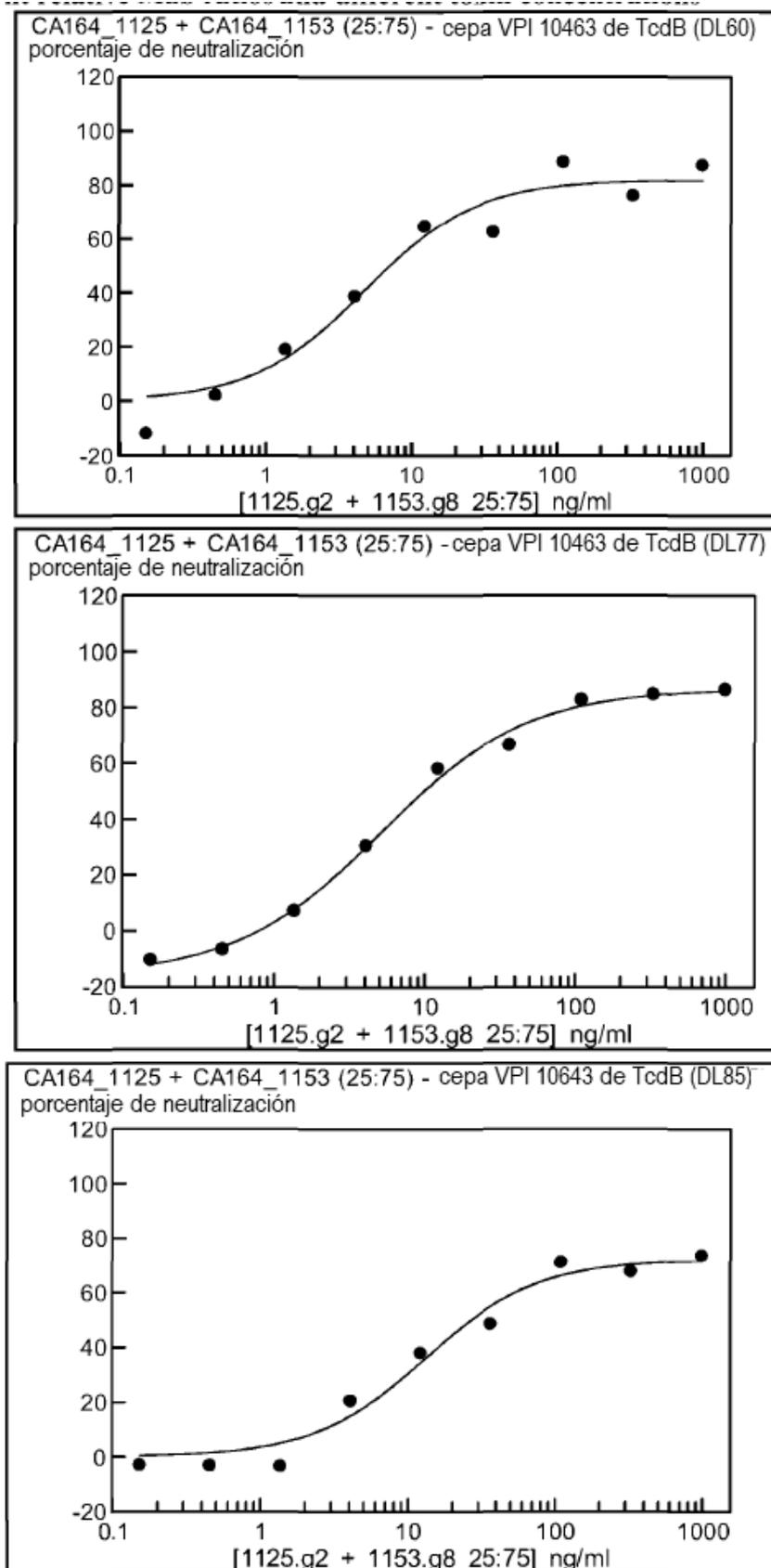


Figura 43 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes relaciones relativas de Mab y diferentes concentraciones de toxina

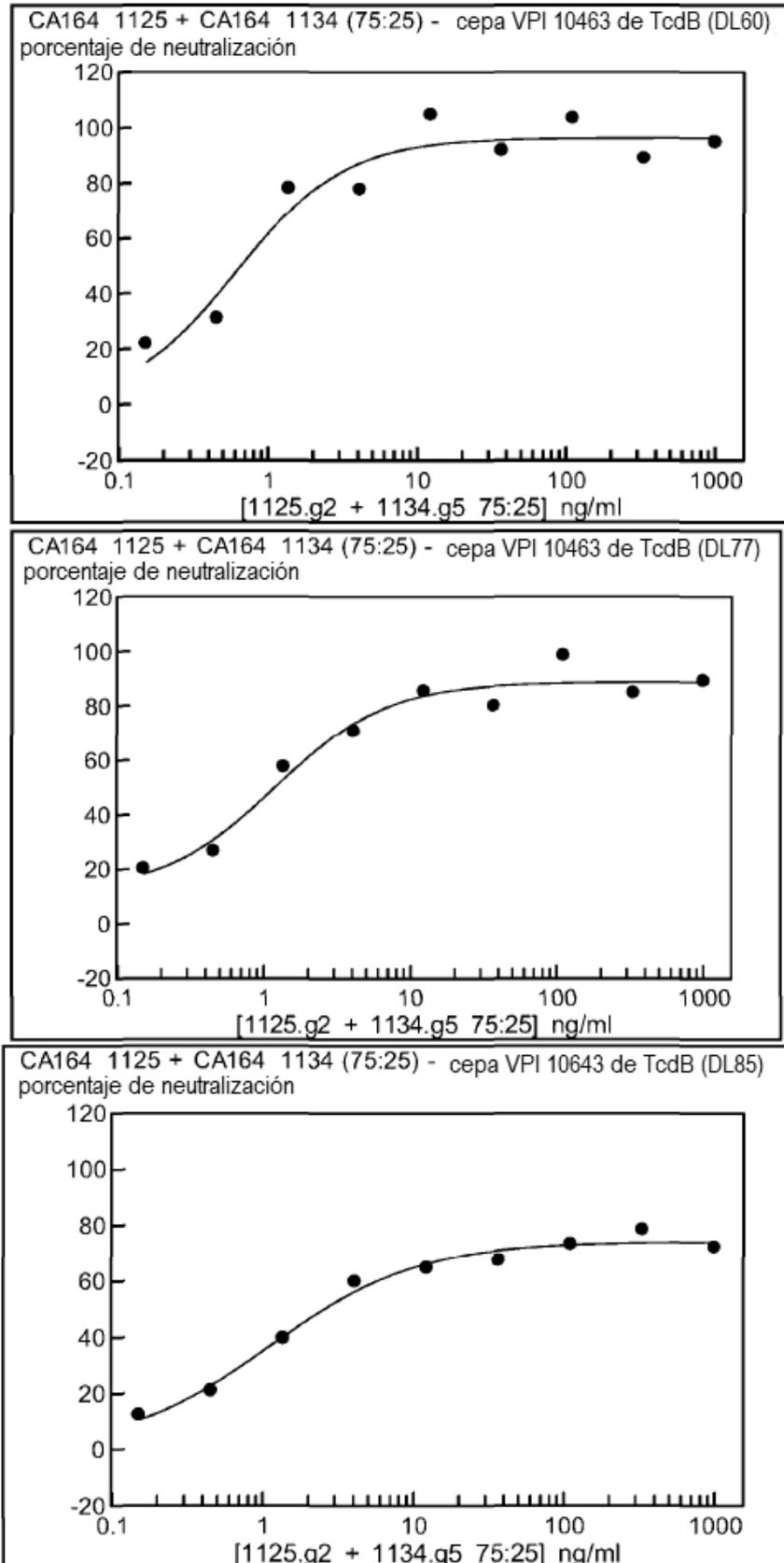


Figura 44 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes relaciones relativas de Mab y diferentes concentraciones de toxina

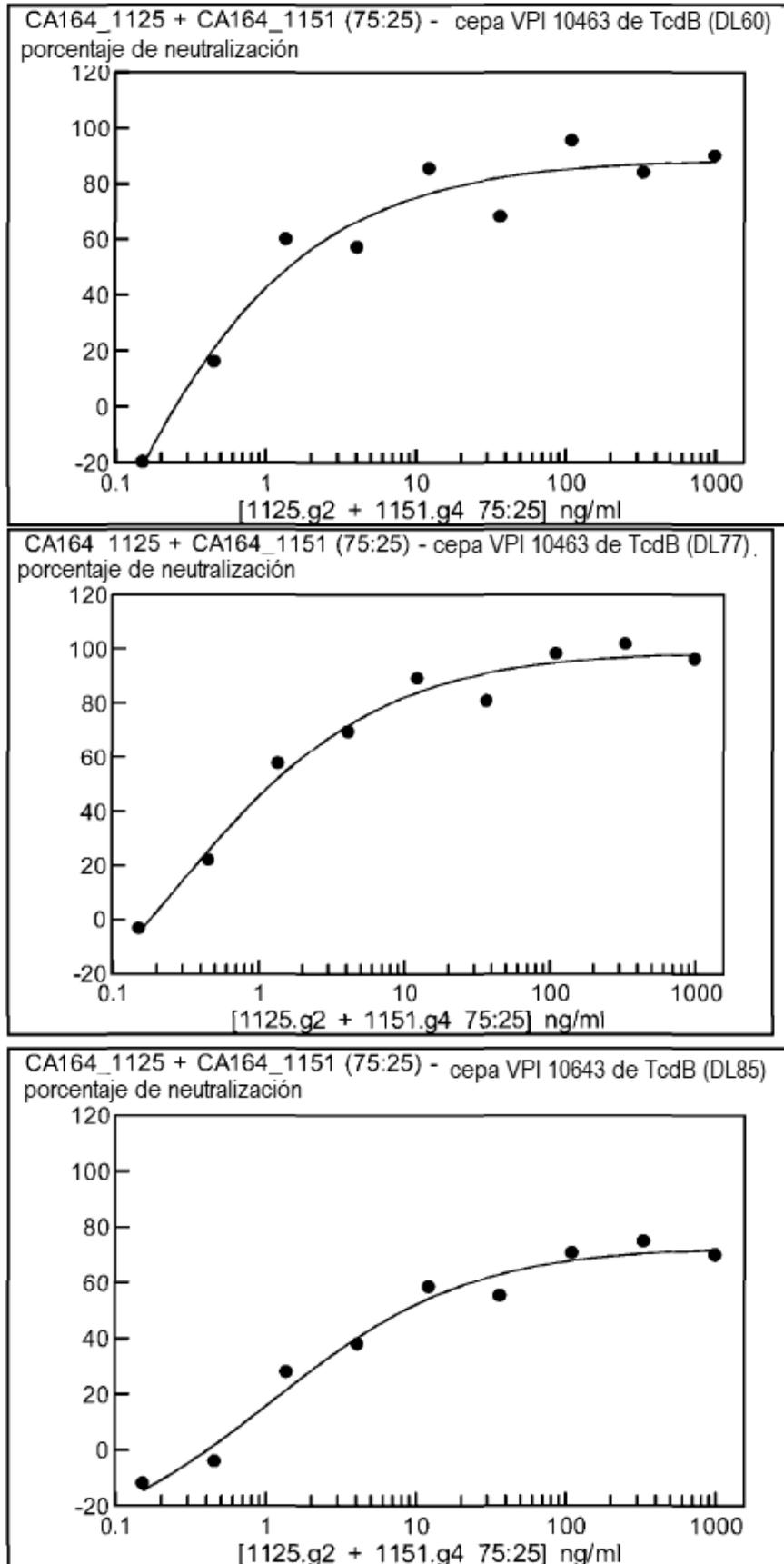


Figura 45 Datos de neutralización in vitro anti-TcdB (ribotipo 003) para mezclas de 2 Mab a diferentes relaciones relativas de Mab y diferentes concentraciones de toxina

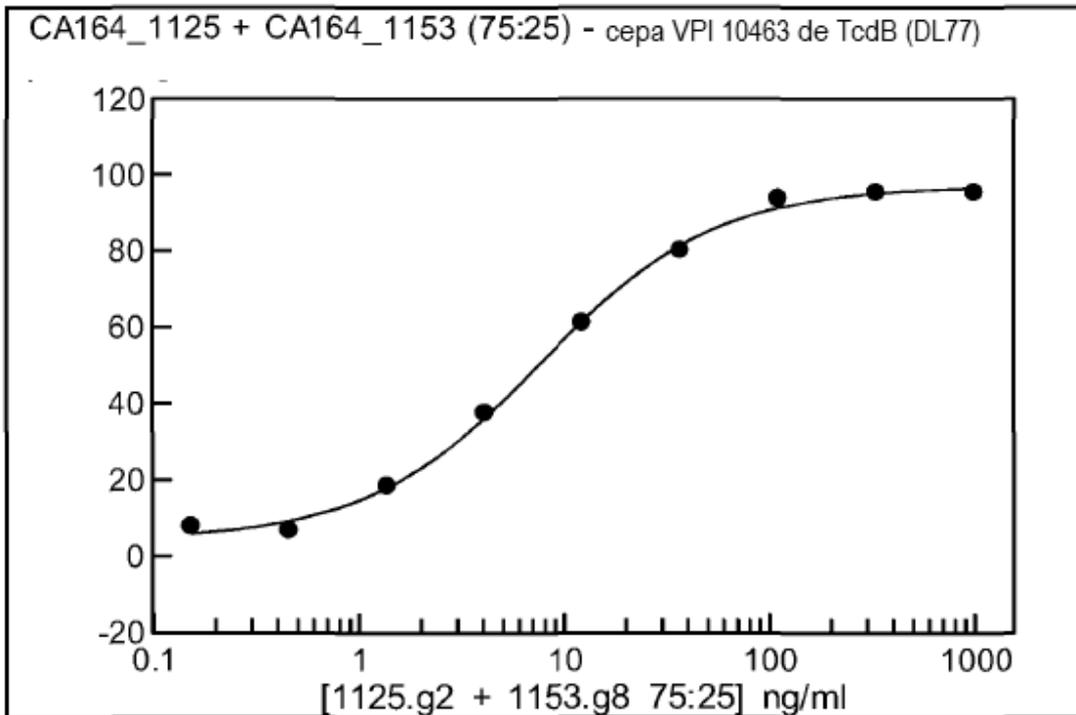
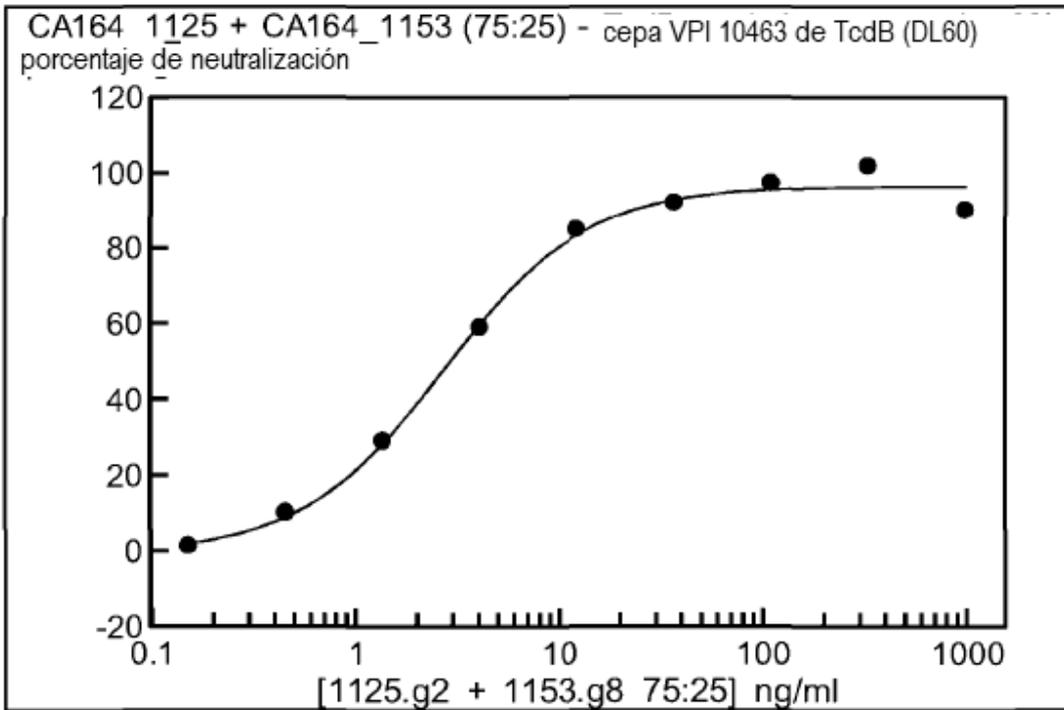


Figura 46 Neutralización de la cepa VPI 10463 de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis constante de toxina (DL80)

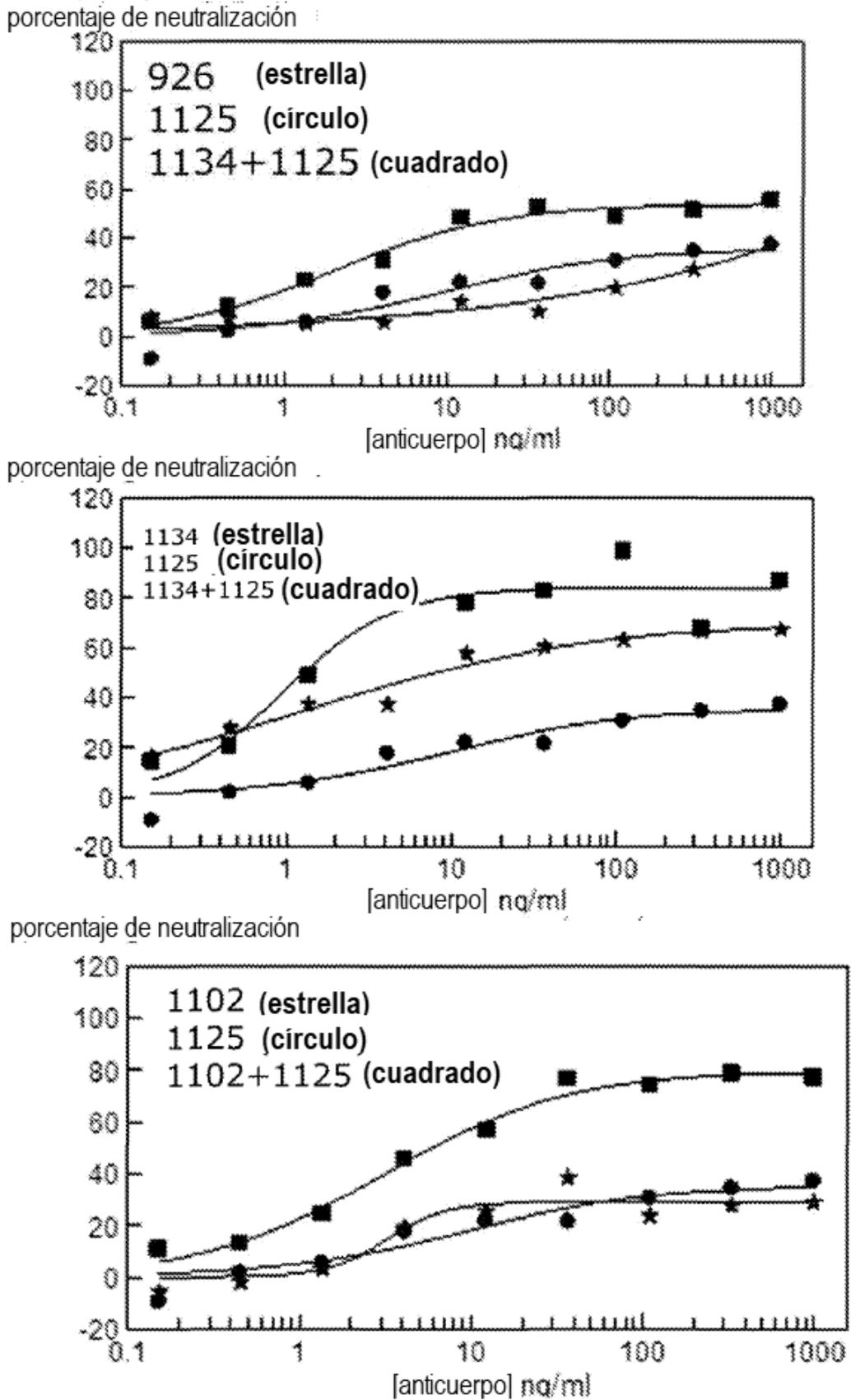


Figura 47 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis constante de toxina (DL80)

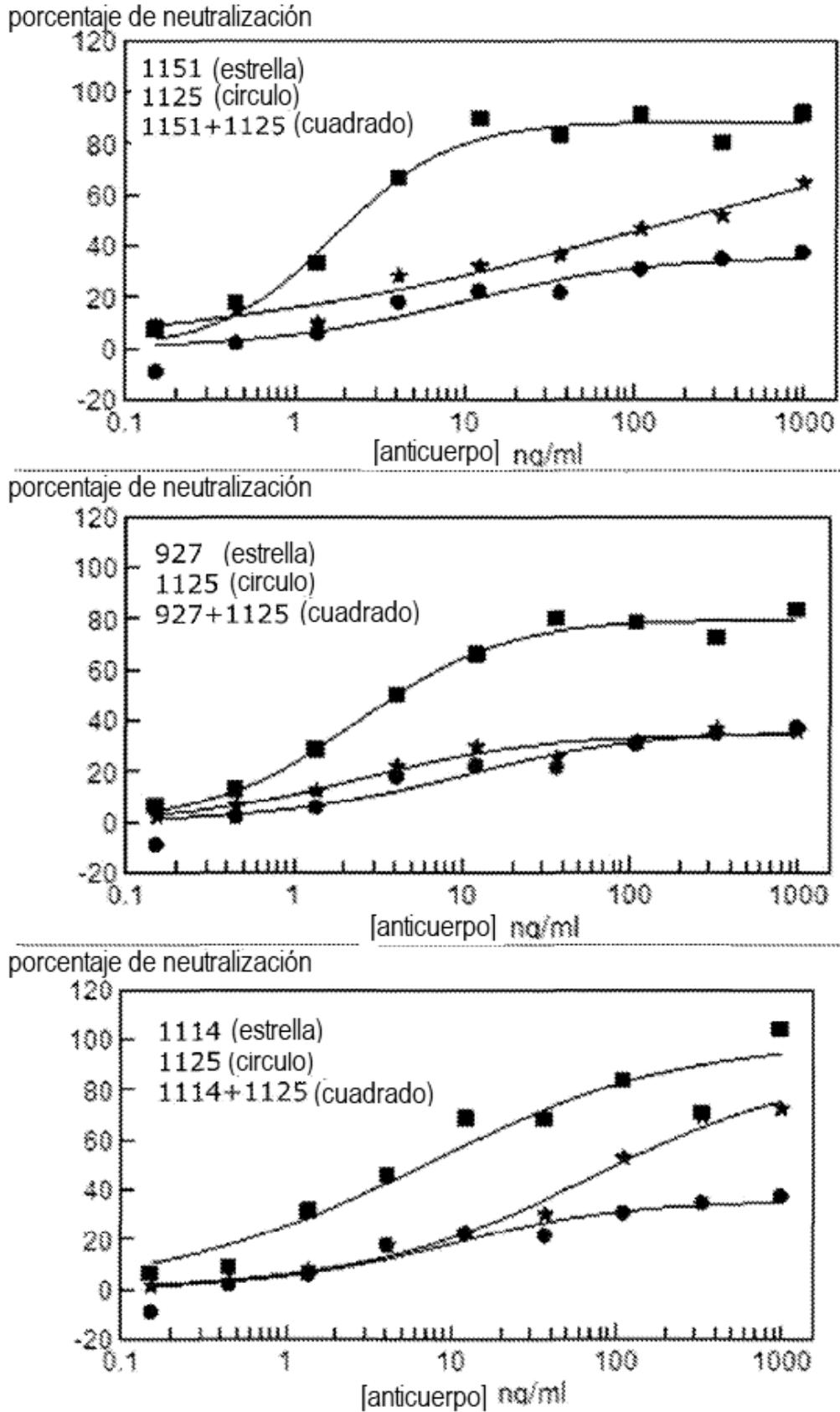


Figura 48 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis constante de toxina (DL80)

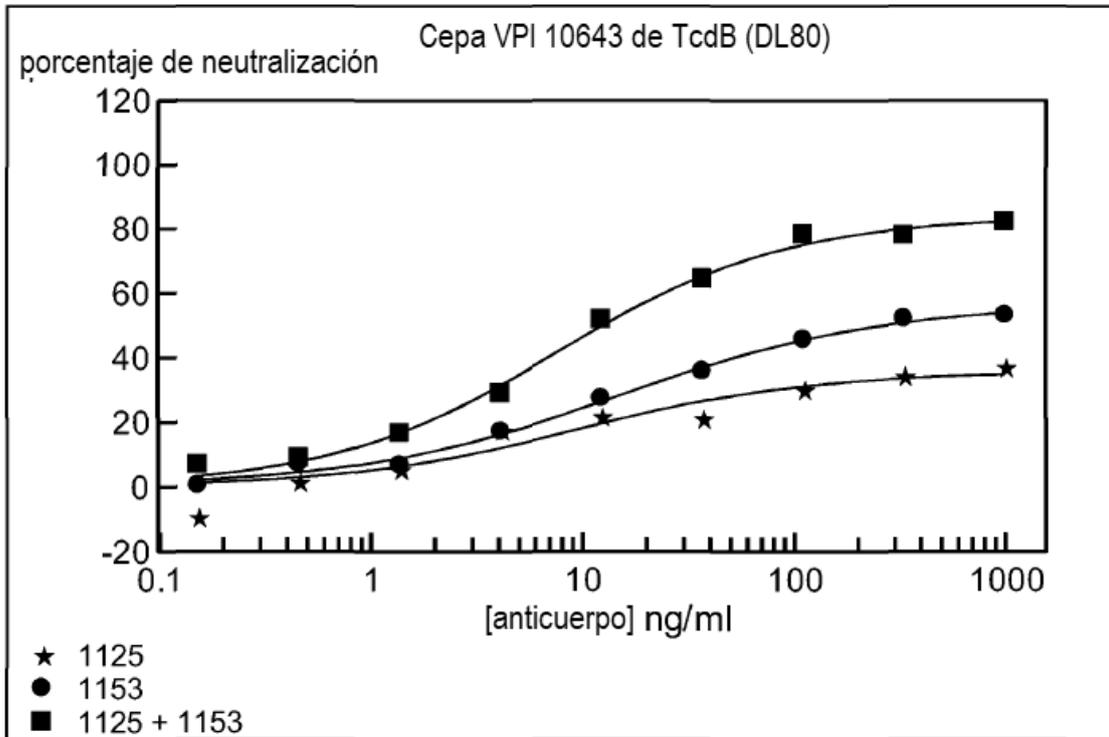


Figura 49 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

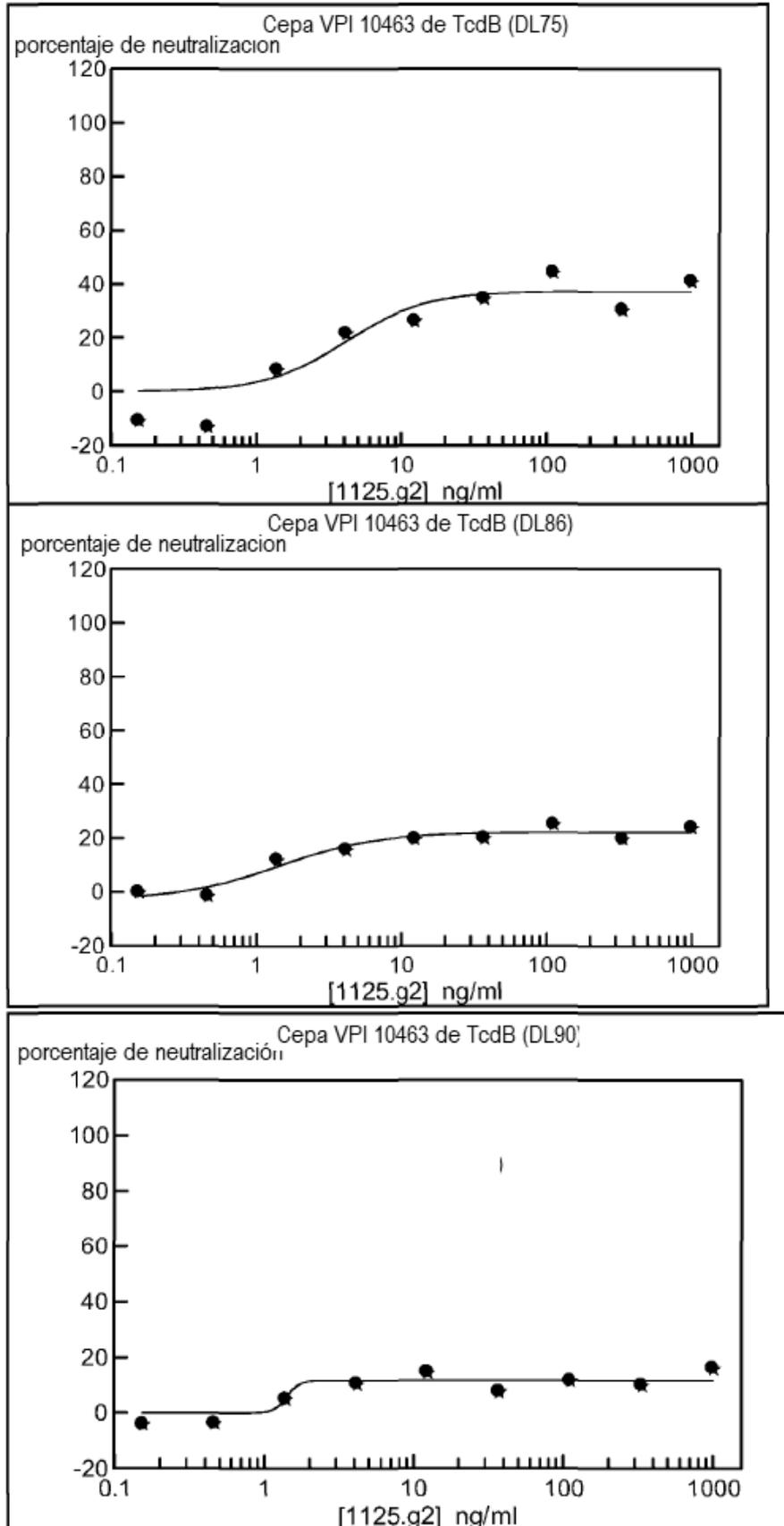


Figura 50 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

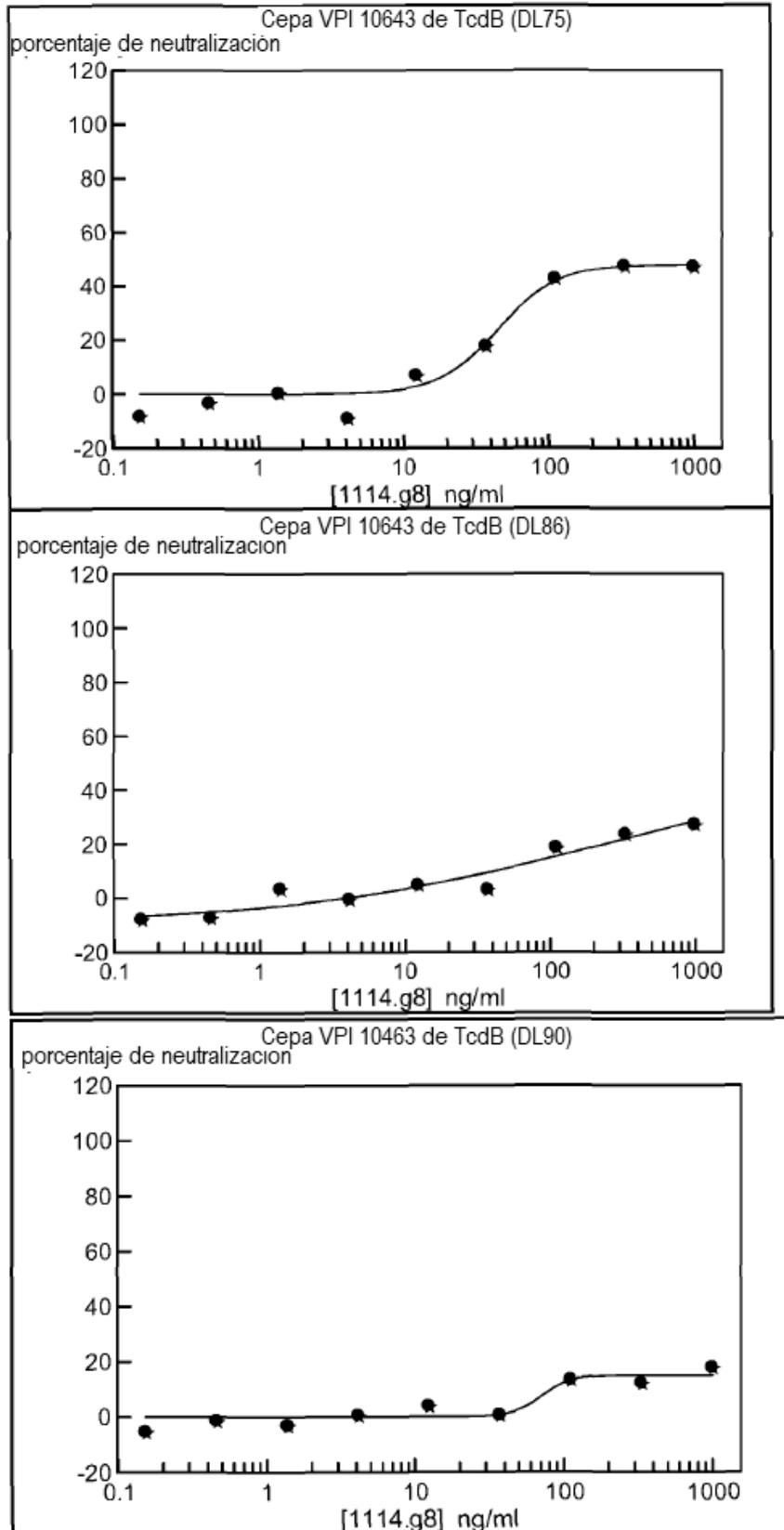


Figura 51 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

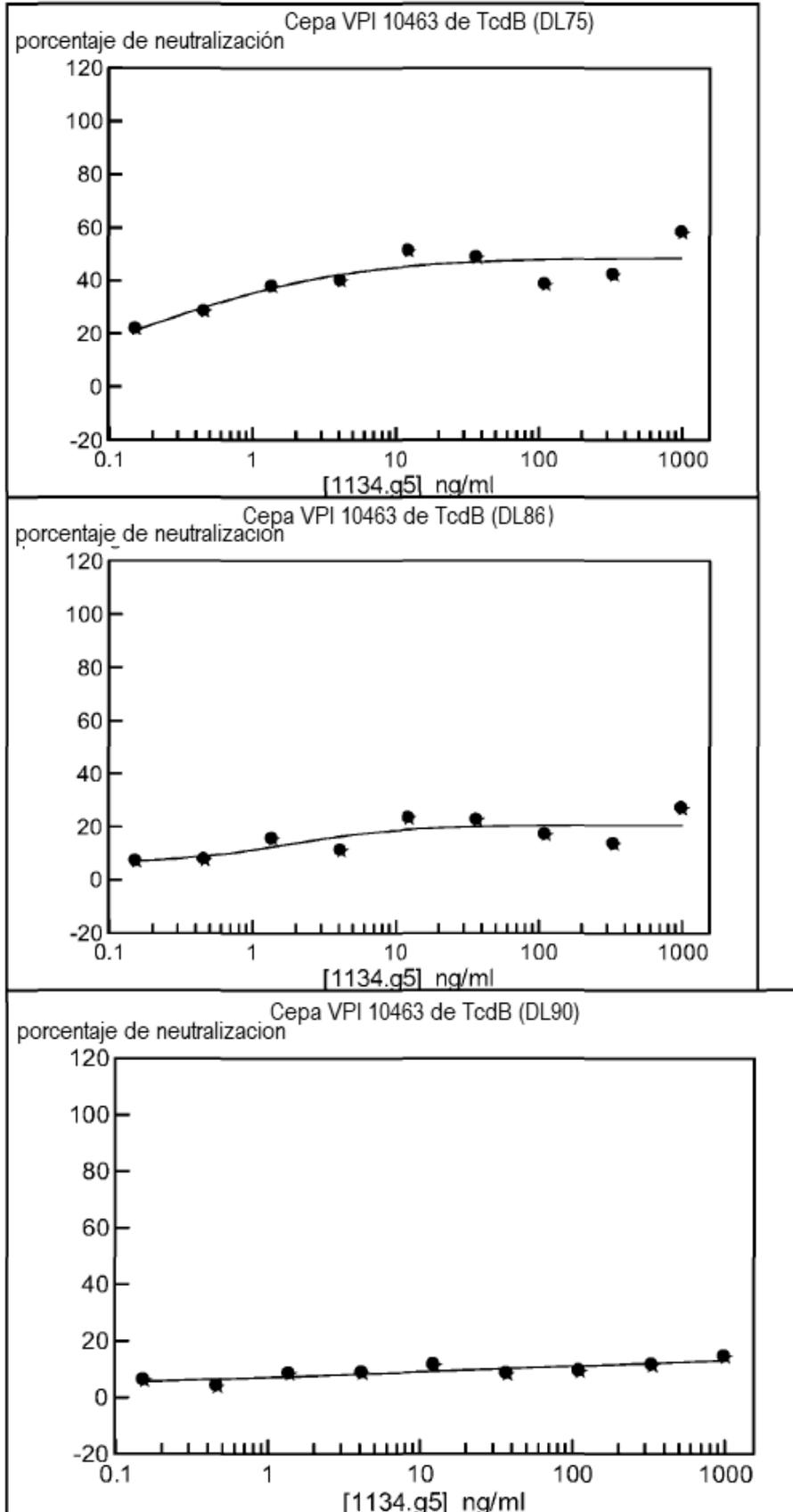


Figura 52 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

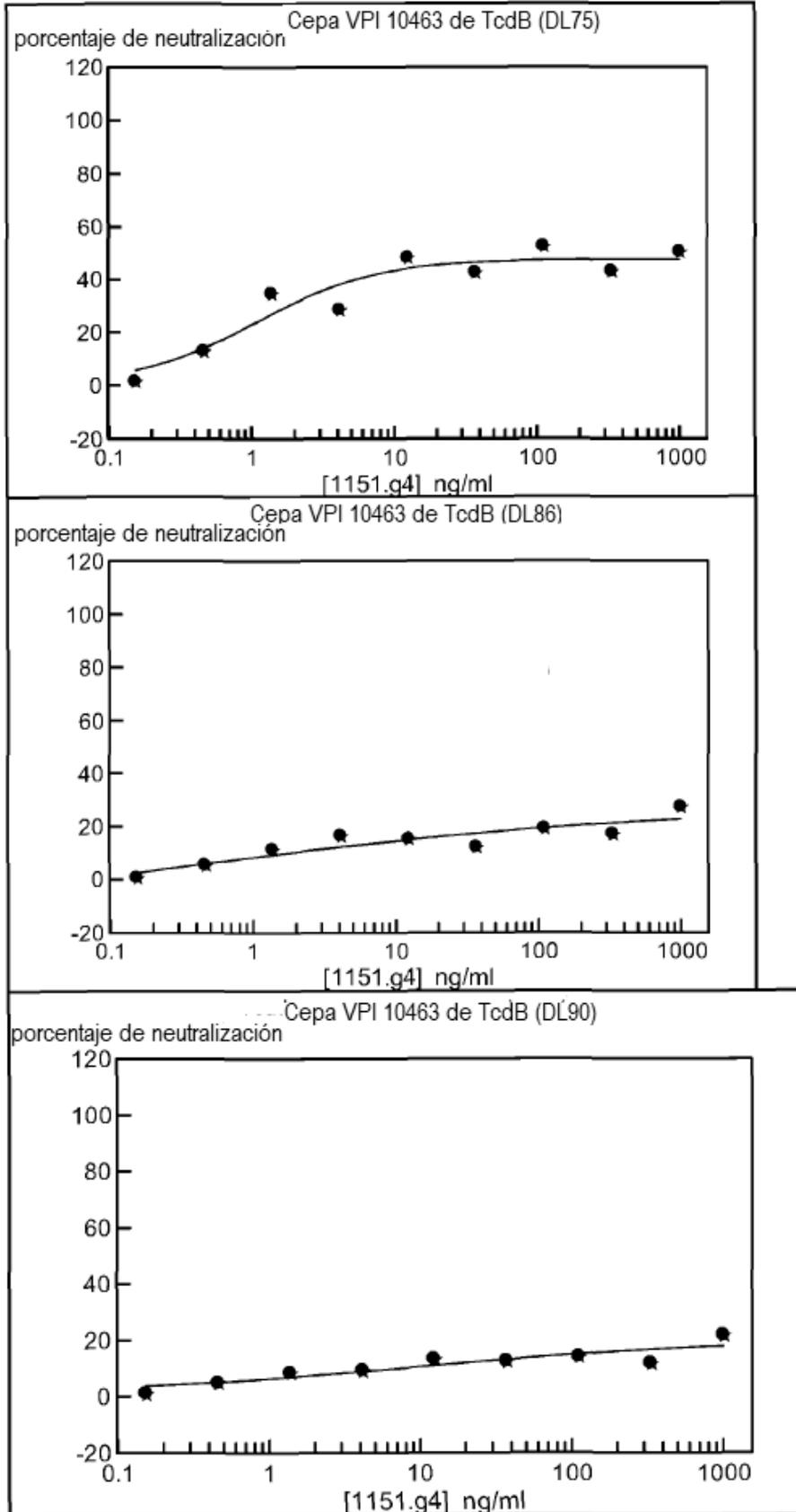


Figura 53 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

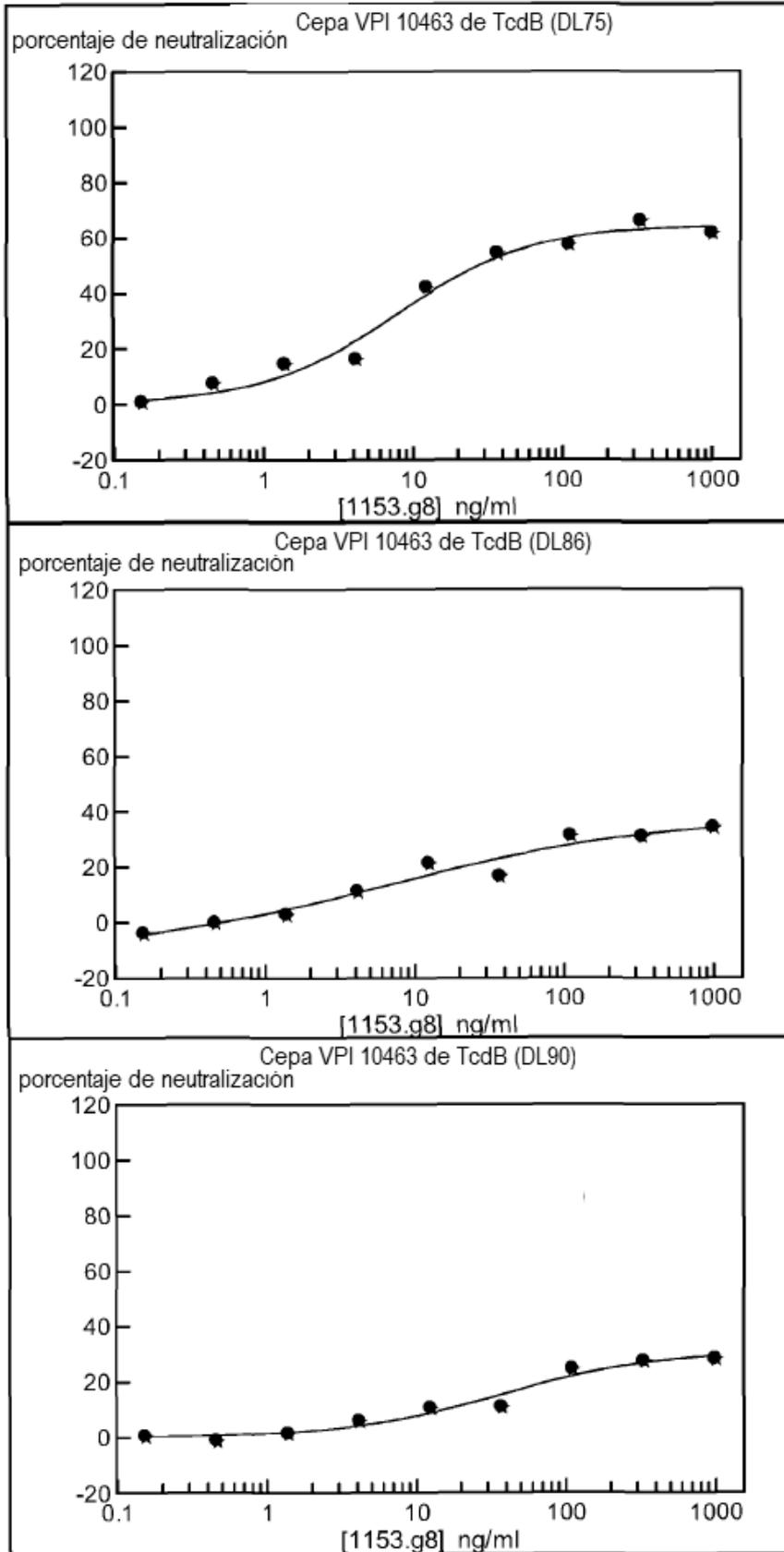


Figura 54 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

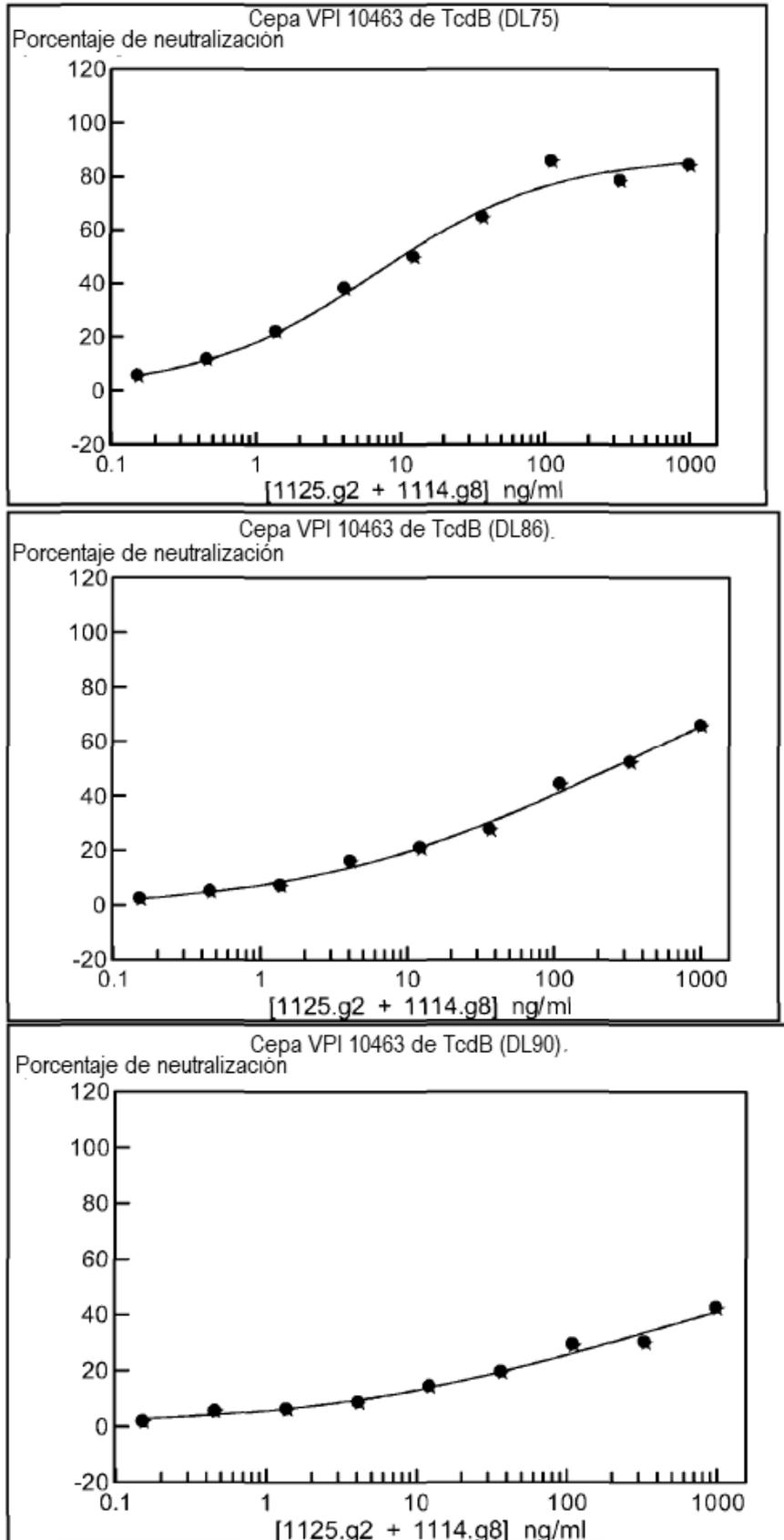


Figura 55 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

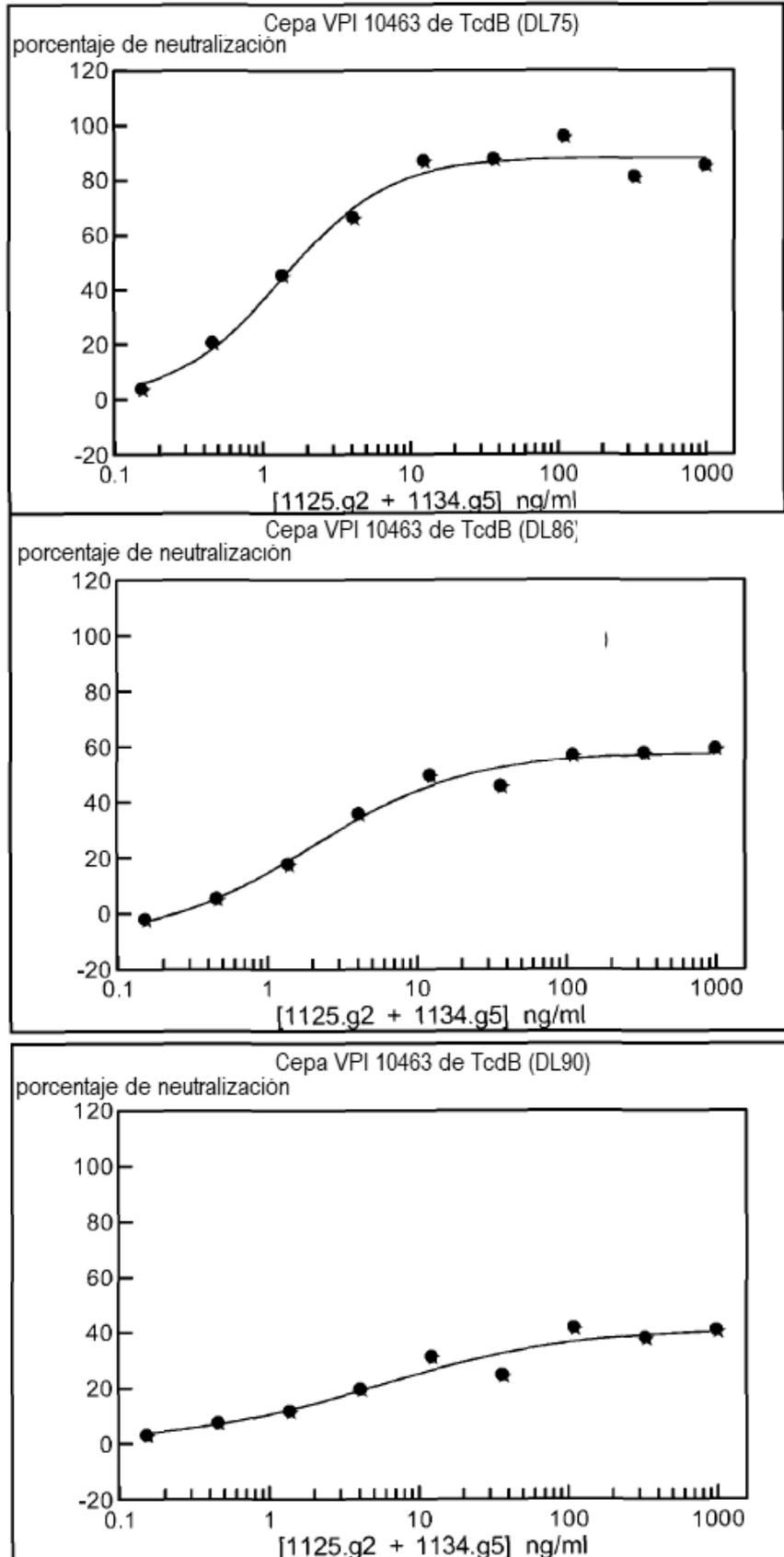


Figura 56 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

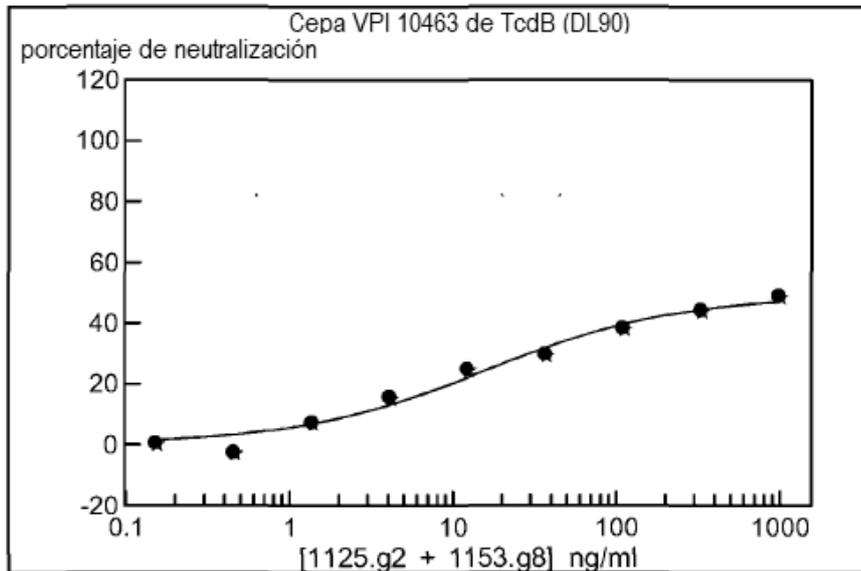
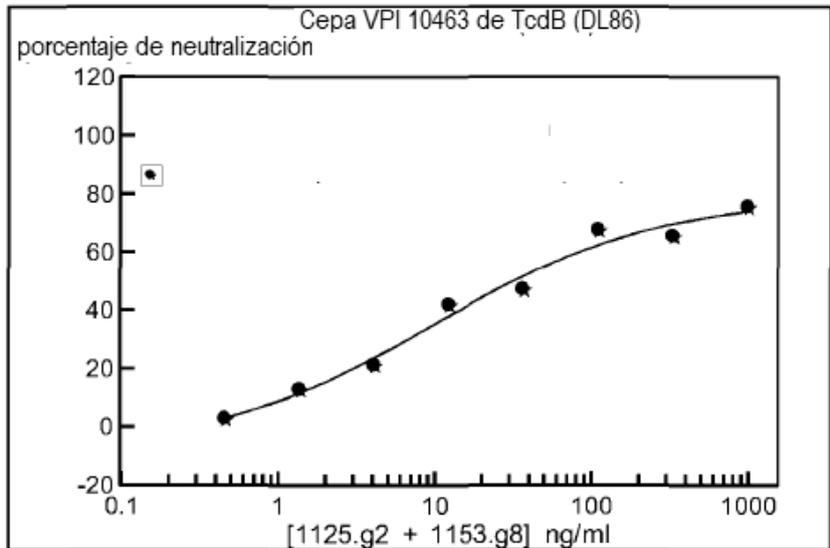
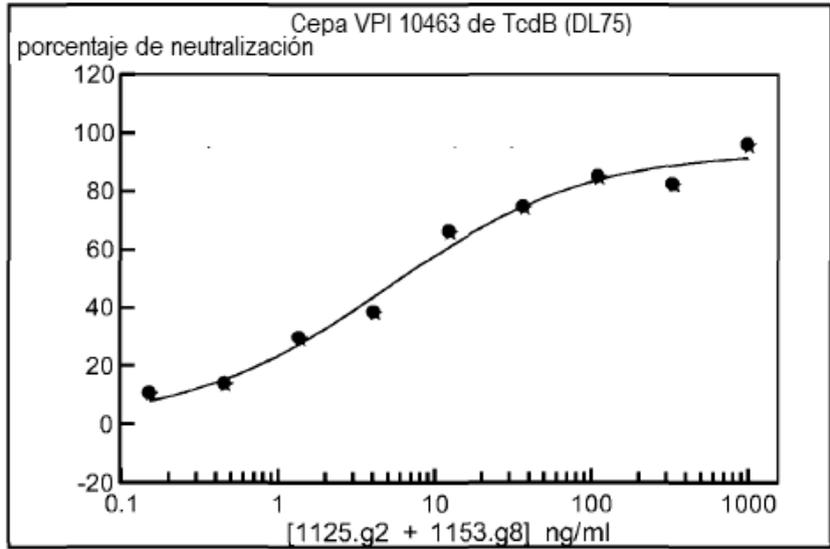


Figura 57 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

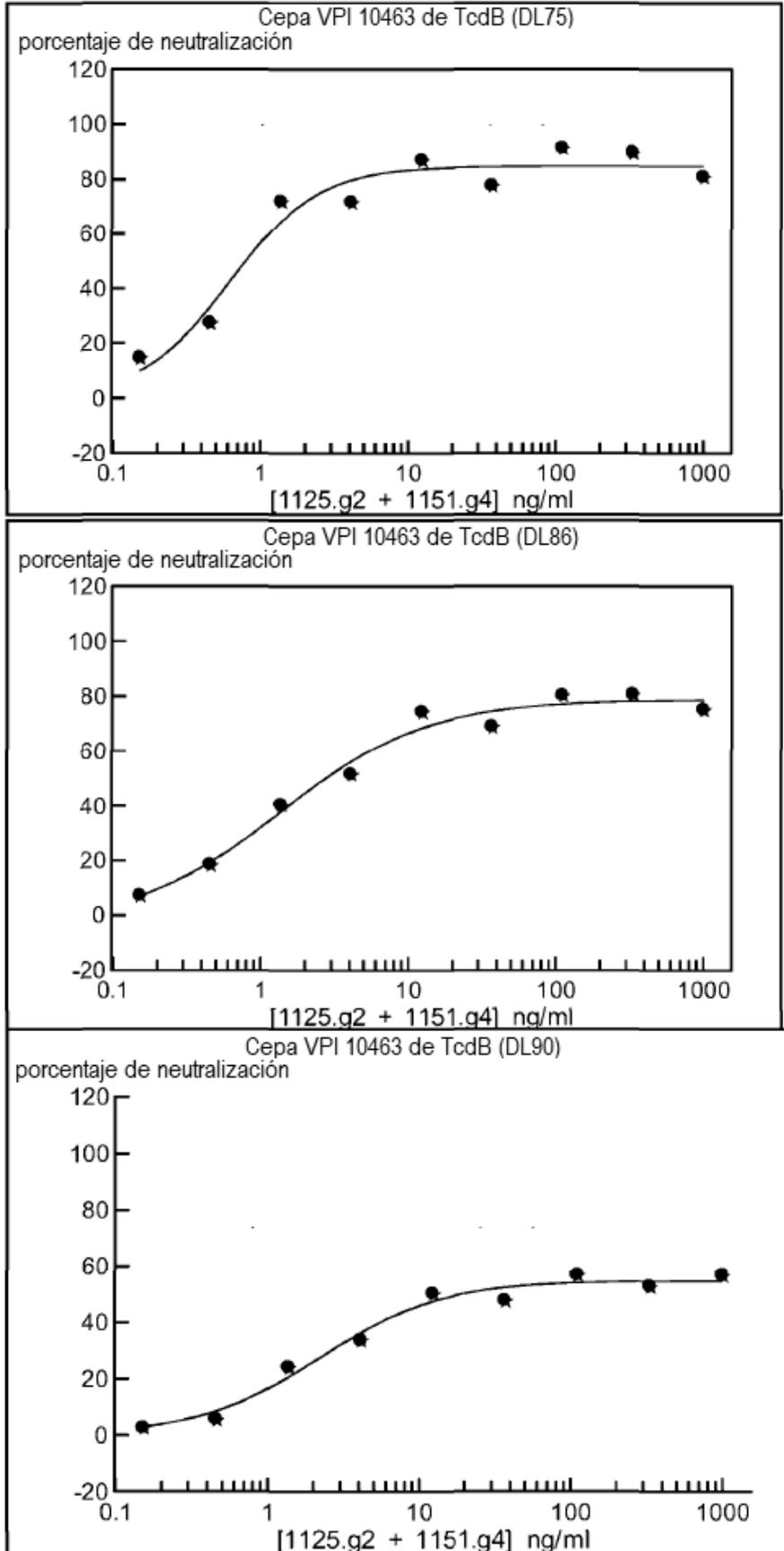


Figura 58 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

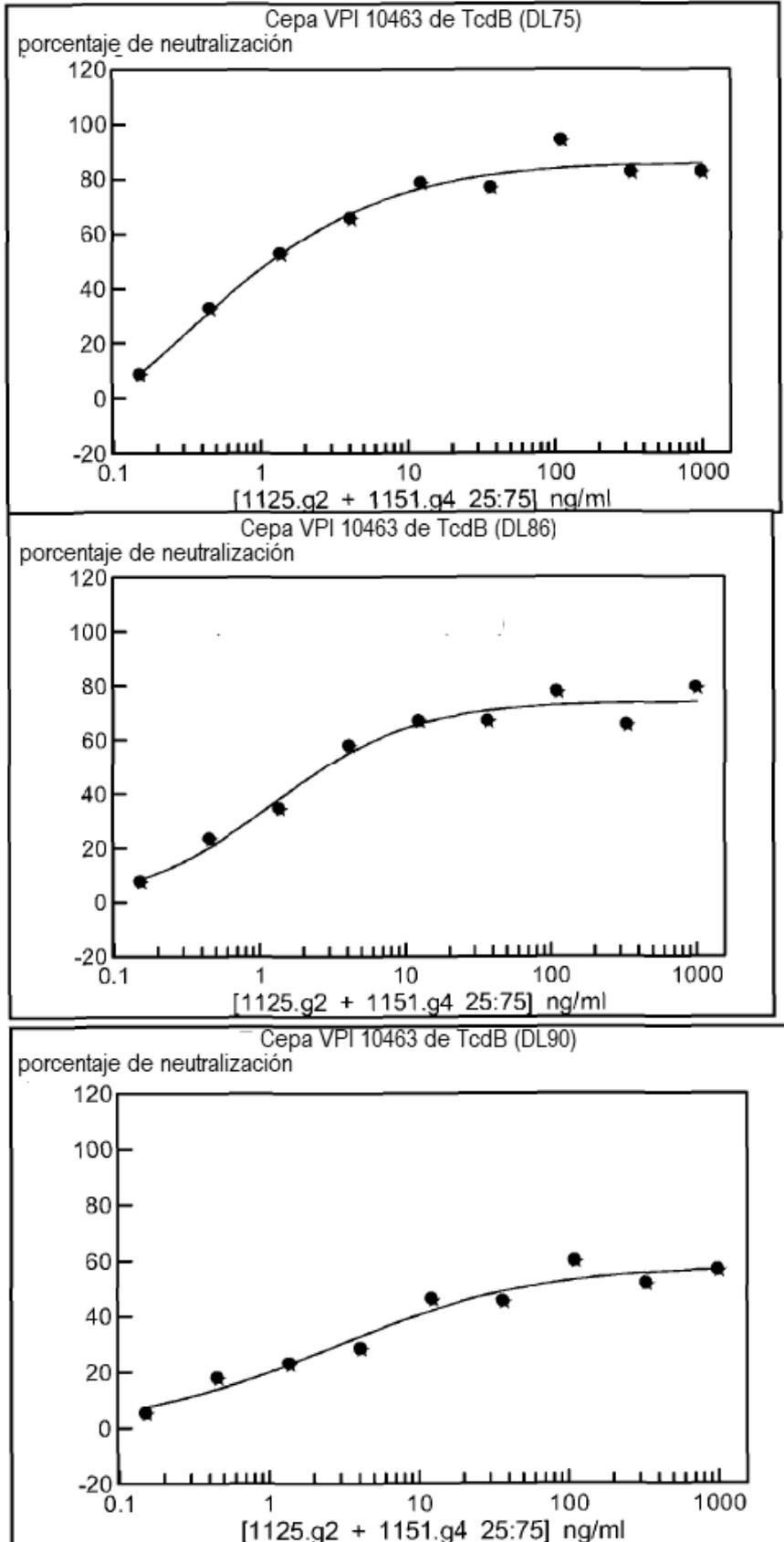


Figura 59 Neutralización de TcdB, anticuerpos únicos y pares, dosis variable de toxina (diversificada)

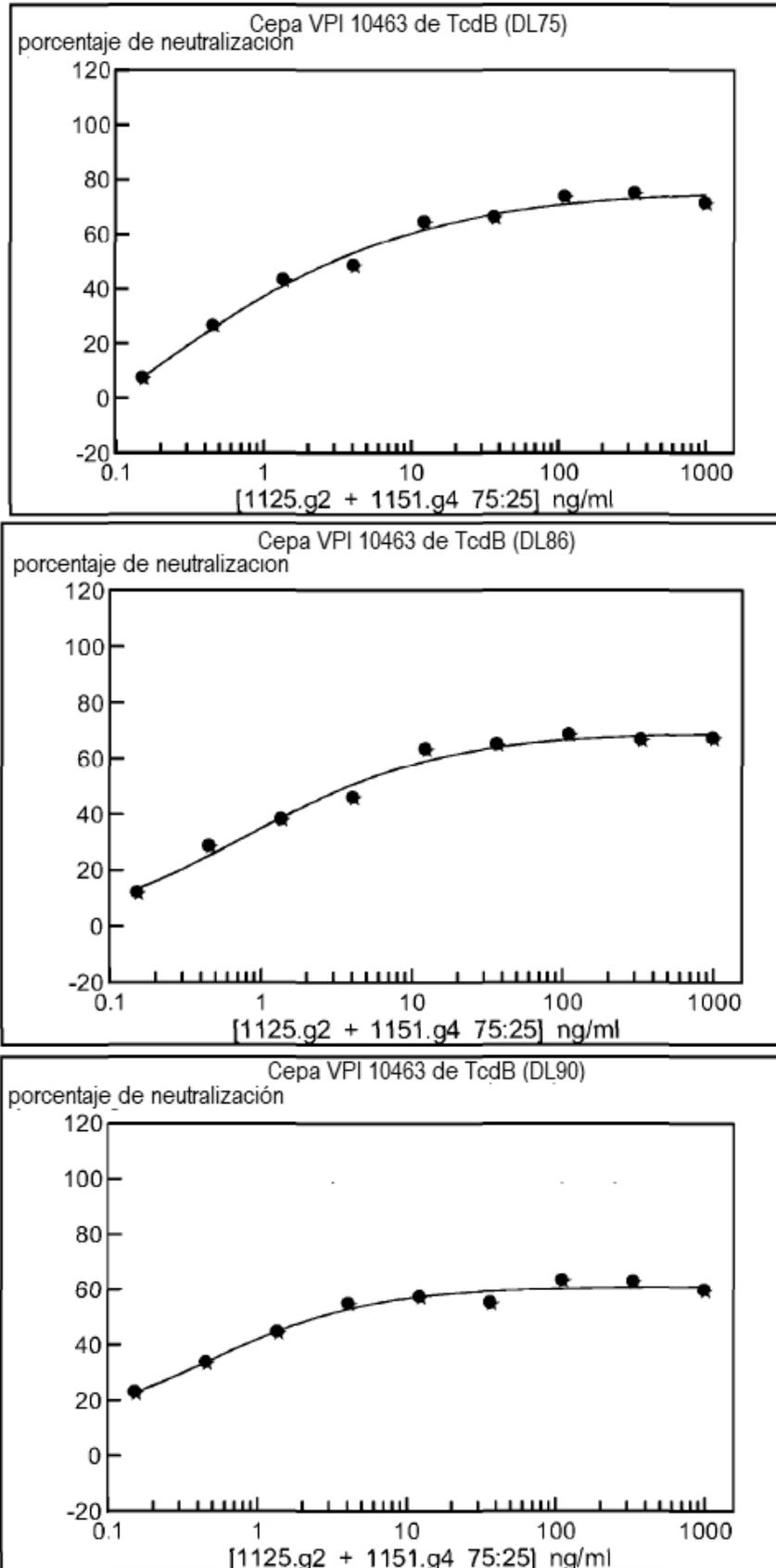


Figura 60 Secuencia de aminoácidos para TcdA SEQ ID NO: 171

```

MSLISKEELI KLAYSIRPRE NEYKTILTNL DEYNKLTNN NENKYLQLKK LNESIDVFMN
KYKTSSRNRA LSNLKKDILK EVILIKNSNT SPVEKNLHFV WIGGEVSDIA LEYIKQWADI
NAEYNIKLWY DSEAFVNTL KKAIVESSTT EALQLLEEEI QNPQFDNMKF YKKRMEFIYD
RQKREFINYK SQINKPTVPT IDDIKSHLV SEYNRDETVL ESYRTNSLRK INSNHGIDIR
ANSLFTEQEL LNIYSQELLN RGNLAAASDI VRLALKNFG GYLDVDMPLP GIHSDLFKTI
SRPSSIGLDR WEMIKLEAIM KYKKYINNYT SENFDKLDQO LKDNFKLIIE SKSEKSEIFS
KLENLNVSDL EIKIAFALGS VINQALISKQ GSYLTNLVIE QVKNRYQFLN QHLNPAIESD
NNFTDTTKIF HDSLFNSATA ENSMFLTKIA PYLQVGFMP E ARSTISLSGP GAYASAYYDF
INLQENTIEK TLKASDLIEF KFPENNSQL TEQEINSLWS FDQASAKYQF EKYVRDYTGG
SLSEDNGVDF NKNTALDKNY LLNKNIPSNN VEEAGSKNYV HYIIQLQGDD ISYEATCNLF
SKNPKNSSII QRNMNESAKS YFLSDDGESI LELNKYRIPE RLKNKEKVKV TFIGHGKDEF
NTSEFARLSV DSLSNEISSF LDTIKLDISP KNVEVNLGK NMFSYDFNVE ETYPGKLLLS
IMDKITSTLP DVNKNSITIG ANQYEVIRINS EGRKELLAHS GKWINKEEAI MSDLSSKEYI
FFDSIDNKLK AKSKNIPGLA SISEDIKTLL LDASVSPDTK FILNNLKLNI ESSIGDYIYY
EKLEPVKNII HNSIDDLIDE FNLENVSD E LYELKLNLL DEKYLISFED ISKNNSTYSV
RFINKSNGES VYVETEKEIF SKYSEHITKE ISTIKNSIIT DVNGNLLDNI QLDHTSQVNT
LNAAFFIQSL IDYSSNKDVL NDLSTSVKVO LYAQLFSTGL NTIYDSIQLV NLISNAVNDT

INVLPTITEG IPIVSTILDG INLGAAIKEL LDEHDPLLKK ELEAKVGVLA INMSLSIAAT
VASIVGIGAE VTIFLLPIAG ISAGIPSLVN NELILHDKAT SVVNYFNHLS ESKKYGPLKT
EDDKILVPID DLVISEIDFN NNSIKLGTGN ILAMEGGSGH TVTGNIDHFF SSPSISSHIP
SLSIYSAIGI ETENLDFSCK IMMLPNAPSR VFWWETGAVP GLRSLNDGT RLLDSIRDLY
PGKFYWRPYA FFDYAITTLK PVYEDTNIKI KLDKDRNEFI MPTITTNEIR NKLSYSFDGA
GGTYSLLLSS YPISTNINLS KDDLWIFNID NEVREISIEN GTIKKGKLIK DVLSKIDINK
NKLIIGNQTI DFSGDIDNKD RYIFLTCELD DKISLIIIEIN LVAKSYSLLL SGDKNYLISN
LSNTIEKINT LGLDSKNIA YNYTDESNNKY FGAISKTSQK SIIHYKKDSK NILEFYNDST
LEFNSKDFIA EDINVFMKDD INTITGKYV DNNTDKSIDF SISLVSKNQV KVNGLYLNES
VYSSYLDFVK NSDGHHTSN FMNLFLDNIS FWKLFQFENI NFVIDKYFTL VGKTNLGYVE
FICDNNKNID IYFGWKTSK SKSTIFSCNG RNVVVEPIYN PDTGEDISTS LDFSYPELYG
IDRYINKVLI APDLYTSLIN INTNYSNEY YPEIIVLNPN TFHKKVNINL DSSSFYEKWS
TEGSDFILVR YLEESNKKIL QKIRIKGILS NTQSFNKMSI DFKDIKKLSL GYIMSNFKSF
NSENELDRDH LGFKIIDNKT YYYDEDSKLV KGLININNSL FYFDPIEFNL VTGWQTINGK
KYYFDINTGA ALTSYKIING KHFFYNNDGV MQLGVFKGPD GFEYFAPANT QNNNIEGQAI
VYQSKFLTLN GKKYYFDNNS KAVTGWRIIN NEKYYFNPNN AIAAVGLQVI DNNKYYFNPD
TAIISKGWQT VNGSRYYFDT DTAFENGYK TIDGKHFFYD SDCVVKIGVF STSNGFEYFA
PANTYNNNIE GQAIYVQSKF LTLNGKKYYF DNNSKAVTGL QTIDSKKYYF NTNTAEAAATG

```

WQTIDGKKYY FNTNTAEAAT GWQTIDGKKY YFNTNTAIAS TGYTIINGKH FYFNTDGIMQ  
 IGVEKGPNGF EYFAPANTDA NNIEGQAILY QNEFLTLNCK KYYFGSDSKA VTGWRIINNK  
 KYFNPNNAI AAHLCTINN DKYYFSYDGI LQNGYITIER NNFYFDANNE SKMVTGVFKG  
 PNGFEYFAPA NTHNNNIEGQ AIVYQNKFLT LNGKKYYFDN DSKAVTGWQT IDGKKYYFNL  
 NTAEAATGWQ TIDGKKYYFN LNTAEAATGW QTIDGKKYYF NTNTFIASSTG YTSINGKHFY  
 FNTDGIMQIG VFKGPNNGFEY FAPANTDANN IEGQAILYQN KFLTLNCKKY YFGSDSKAVT  
 GLRTIDGKKY YFNTNTAVAV TGWQTINGKK YYFNTNTSIA STGYTIISGK HFYFNTDGIM  
 QIGVFKGPDG FEYFAPANTD ANNIEGQAIR YQNRFLYLHD NIYYFGMNSK AATGWVTIDG  
 NRYFEPNTA MGANGYKTID NKNFYFRNGL PQIGVFKGSN GFEYFAPANT DANNIEGQAI  
 RYQNRFLHLI GKIIYFGMNS KAVTGWQTIN GKVYFMPDT AMAAAGGLFE IDGVIYFFGV  
 DGVKAPGIYG

**Figura 61** Secuencia de aminoácidos para TcdB SEQ ID NO: 172

MSLVNRKQLE KMANVRFRTO EDEYVAILDA LEEYHNMSSEN TVVEKYLKLE DINSLTDIYI  
 DTYKKSCRNK ALKKFKEYLV TEVLELKNNN LTPVEKNLHF VWICCGINDT AINYINQWKD  
 VNSDYNVNVF YDSNAFLINT LKKTVESAI NDTLESFREN LNDPRFDYNK FFRKRMEIYY  
 DKQKNFINYY KAQREENPEL IIDDIVKTYL SNEYSKEIDE LNTYIEESLN KITQNSGNDV  
 RNFEEPKNGE SFNLYEQELV ERWNLAAASD ILRISALKEI GGMYLVDVDM PGIQPDLPES  
 IEKPSSVTVD FWEMTKLEAI MKYKEYIPEY TSEHFDMLDE EVQSSFESVL ASKSDKSEIF  
 SSLGDMEASP LEVKIAFNSK GIINQGLISV KDSYCSNLIV KQIENRYKIL NNSLNPATSE  
 DNDFNNTTNT FIDSIMAEAN ADNGRFMMEL GKYLVRGFFP DVKTTINLSG PEAYAAAYQD  
 LLMFKEGSMN IHLIEADLRN FEISKTNISQ STEQEMASLW SFDDARAKAQ FEYKRNIFE  
 GSLGEDDNDL FSQNIIVVDKE YLLEKISSLA RSSERGIHY IVQLQGDKIS YEAAACNLFAK  
 TPYDSVLFQK NIEDSEIAYY YNPGDGEIQE IDKYKIPSII SDRPKIKLTF IGHCKDEFNT  
 DIFAGFDVDS LSTEIEAAID LAKEDISPKS IEINLLGCNM FSYSINVEET YPGKLLLVK  
 DKISELMPSI SQDSIIIVSAN QYEVRLINSE RRELLDHSCE WINKEESIIEK DISKEYISF  
 NPKENKITVK SKNLPELSTL LQEIRNNSNS SDIELEEKVM LTECEINVIS NIDTQIVEER  
 IEEAKNLTSD SINYIKDEFK LIESISDALC DLKQONELED SHFISFEDIS ETDEGFSIRF  
 INKETGESIF VETEKTIFFSE YANHITTEIS KIKGTIFDTV NGKLVKKVNL DTTHEVNTLN  
 AAFFIQSLIE YNSSKESLSN LSVAMKVQVY AQLFSTGLNT ITDAAKVVEL VSTALDETID  
 LLPTLSEGLP IIATIIDGVS LGAAIKELSE TSDPLLRQEI EAKIGIMAVN LTTATTAITT  
 SSLGIASGFS ILLVPLAGIS AGIPSLVNE LVLRDKATKV VDYFKHVSIV ETEGVFTLLD

DKIMMPQDDL VISEIDFNNN SIVLGKCEIW RMEGGSGHTV TDDIDHFFSA PSITYREPHL  
 SIYDVLEVQK EELDLSKDLM VLPNAPNRVF AWETGWTPGL RSLENDGTKL LDRIRDNYEG  
 EFWRYFAFI ADALITTLKP RYEDTNIRIN LDSNTRSFIV PIITTEYIRE KLSYSFYGSG  
 GTYALSLSQY NMGINIELSE SDVWIIDVDN VVRDVTIESD KIKKGDLEIG ILSTLSIEEN  
 KIILNSHEIN FSCEVNGSNG FVSLTFSILE GINAIIEVDL LSKSYKLLIS GELKILMLNS  
  
 NHIQQKIDYI GFNSELQKNI PYSFVDSECK ENGFINGSTK EGLFVSELPD VVLISKVYMD  
 DSKPSFGYYS NNLKDVKVIT KDNVNILTGY YLKDDIKISL SLTLQDEKTI KLNSVHLDSE  
 GVAEILKFMN RKGNTNTSDS IMSFLESMNI KSIFVNFLQS NIKFILDANF IISGTTSIGQ  
 FEFICDENDN IQPYFIKFNT LETNYTLYVG NRQNMIVEPN YDLDDSGDIS STVINFSQKY  
 LYGIDSCVNK VVISPNIYTD EINITPVYET NNTYPEVIVL DANYINEKIN VNINDLSIRY  
 VWSNDGNDFI LMSTSEENKV SQVKIRFVNV FKDKTLANKL SFNFSDKQDV PVSEIILSFT  
 PSYYEDGLIG YDLGLVSLYN EKFYINNFGM MVSGLIYIND SLYYFKPPVN NLITGFVTVG  
 DDKYYFNPIN GGAASIGETI IDDKNYFFNQ SGVLQTVFVS TEDGFKYFAP ANTLDENLEG  
 EADFTGKLI IDENIYYFDD NYRGAVEWKE LDGEMHYFSP ETGKAFKGLN QIGDYKYYFN  
 SDGVMQKGFV SINDNKHYFD DSGVMKVGYT EIDGKHFYFA ENGEMQIGVF NTEDGFKYFA  
 HHNEDLGNEE GEEISYSGIL NFNNKIYYFD DSFTAVVGWK DLEDGSKYYF DEDTAEAYIG  
 LSLINDGQYY FNDDGIMQVG FVTINDKVYF FSDSGIIESG VQNIDDNYFY IDDNGIVQIG  
 VFDTSDGYKY FAPANTVNDN IYQAVEYSG LVRVGEDVYY FGETYTIETG WIYDMENESD  
 KYYFNPETKK ACKGINLIDD IKYYFDEKGI MRTGLISFEN NNYYFNENGE MQFGYINIED  
 KMFYFGEDCV MQIGVENTPD GFKYFAHQNT LDENFEGESI NYTGWLDLDE KRYYFTDEYI  
 AATGSVIIDG EEEYFDPDTA QLVISE

Figura 62 Datos de monocapa de Caco-2 (resistencia eléctrica transepitelial)- TcdA

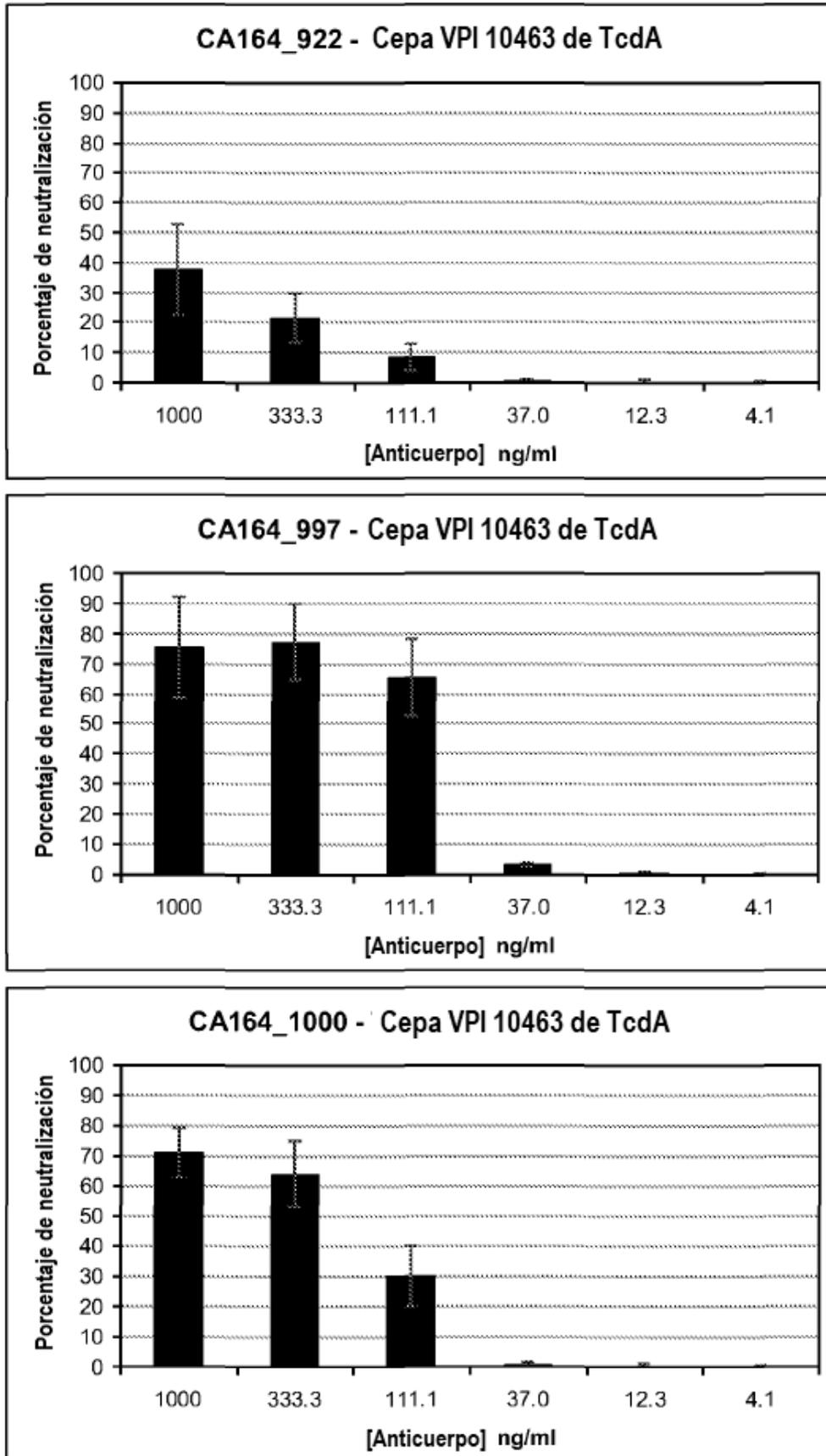


Figura 62A

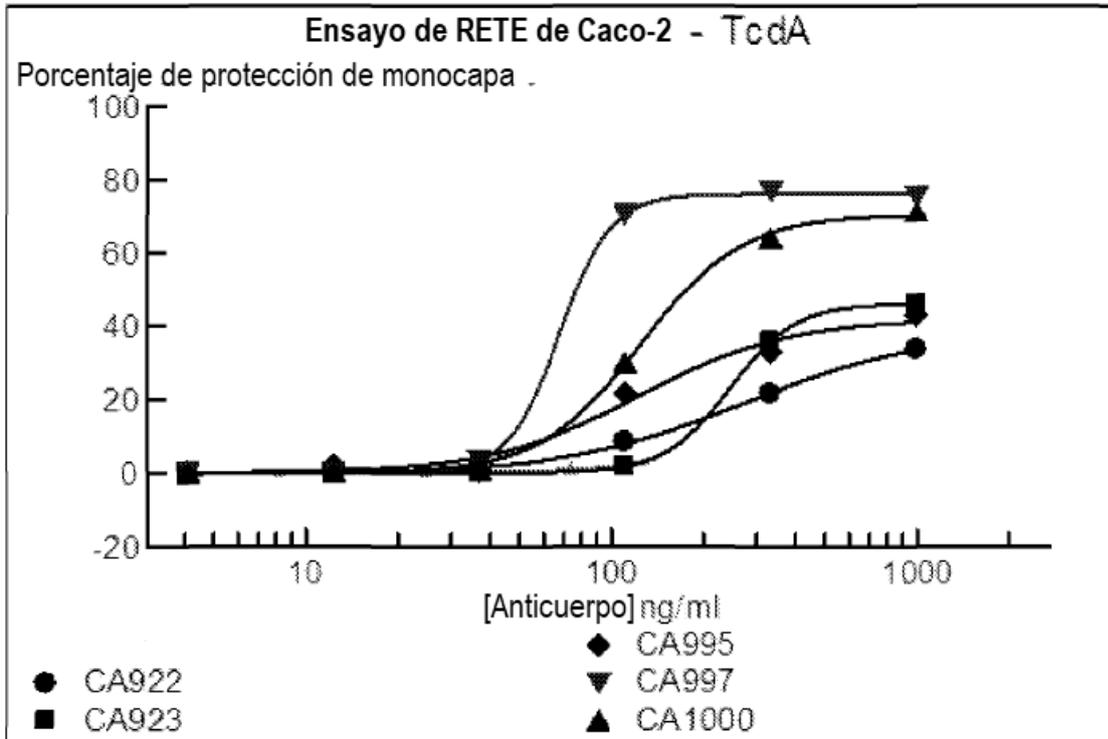
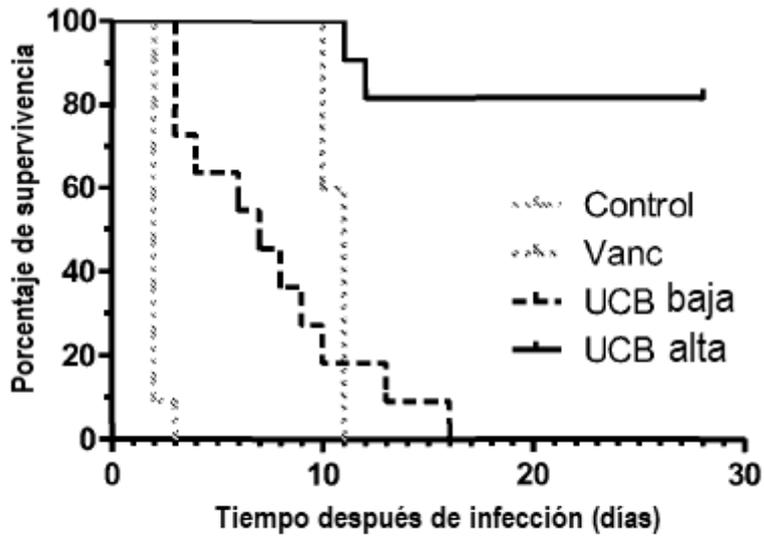


Figura 63

Supervivencia de hámsteres después de exposición a *Clostridium difficile*.

Mezcla de 3 Mab de UCB de alta y baja dosis: CA997.g1 (50 %), CA1125.g2 (25 %) y CA1151.g4 (25 %) frente a controles



P= 0,0001 entre ambos grupos de Mab y entre Mab y control de vehículo

Figura 64 Cambios de peso corporal de hámster

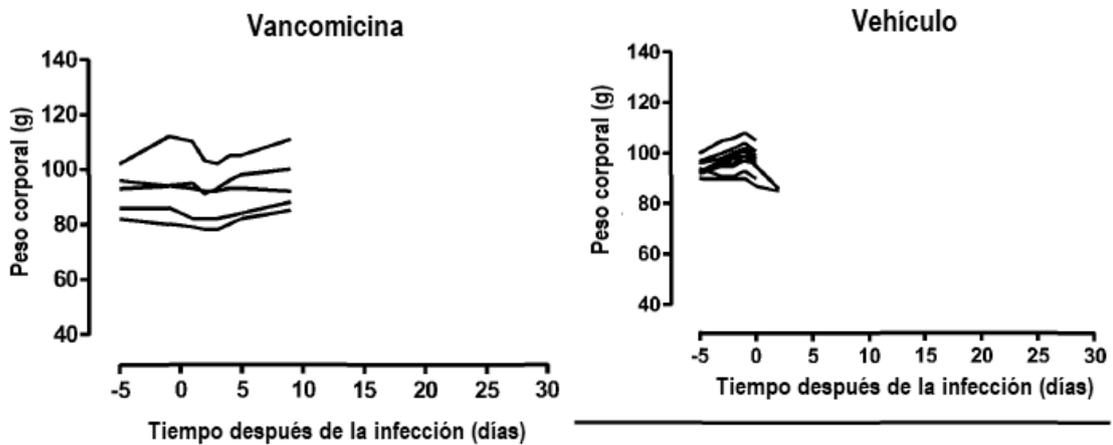


Figura 65

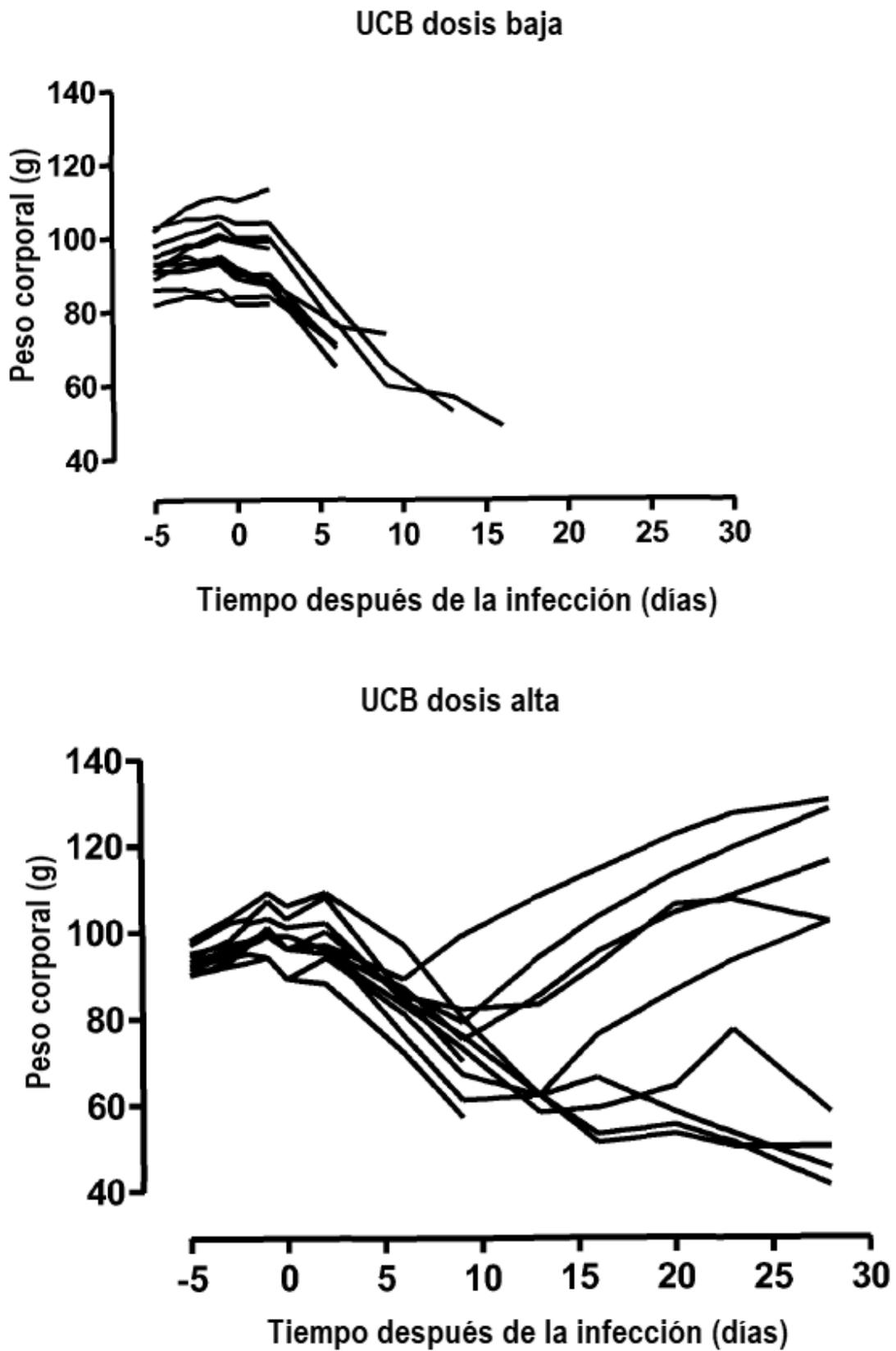


Figura 66

PBS control

UCB dosis alta

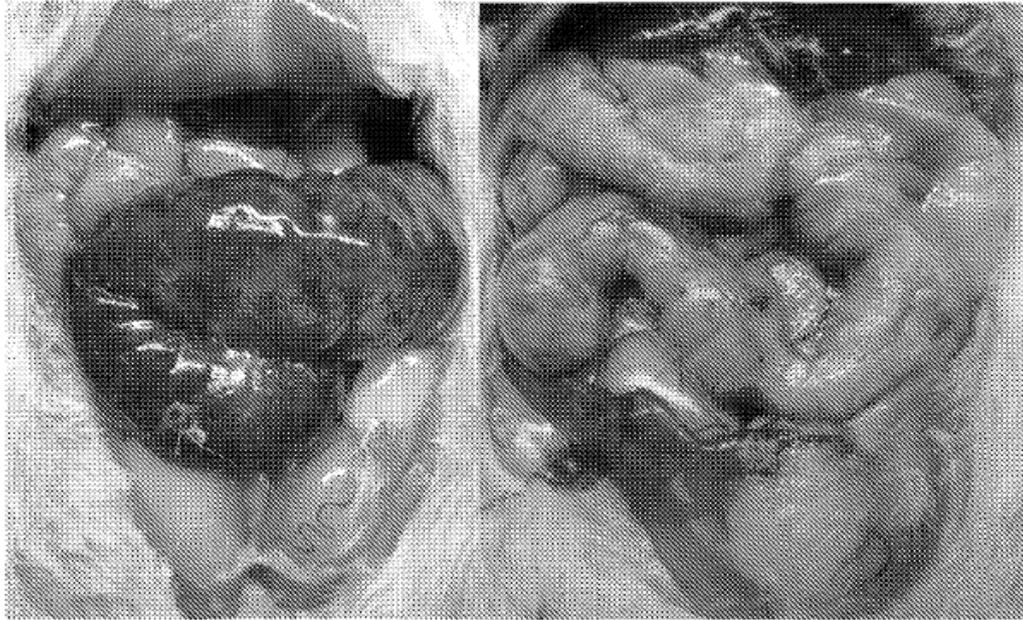


Figura 67 Farmacocinética sérica de una IgG1 humana en ratones y hámsteres

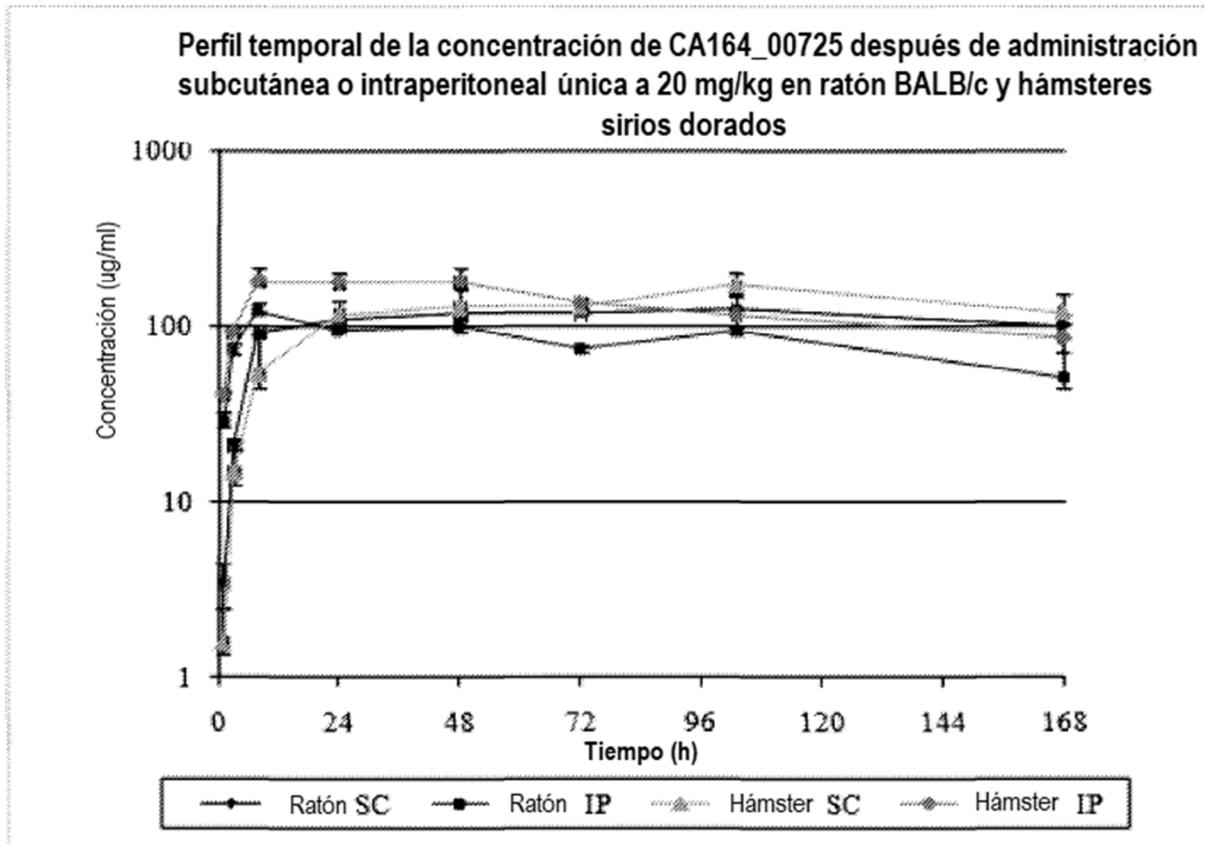


Figura 68 Efecto de la agitación por vórtex sobre las moléculas de IgG1 anti-TcdB en PBS, pH 7,4 (n= 3)

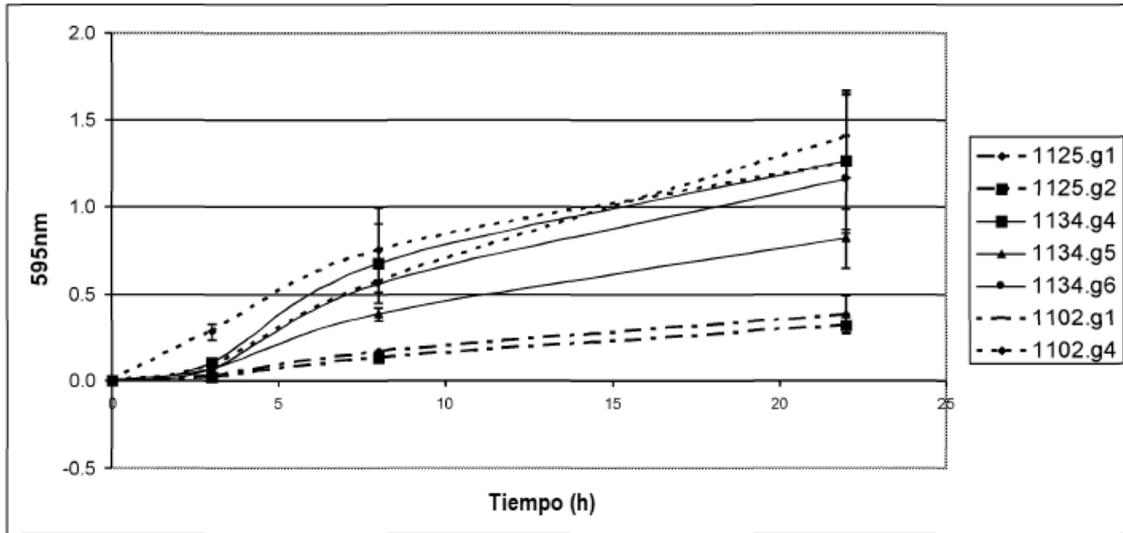


Figura 69 Comparación de la estabilidad de agregación de moléculas de IgG1 anti-TcdA y anti-TcdB en PBS pH 7,4

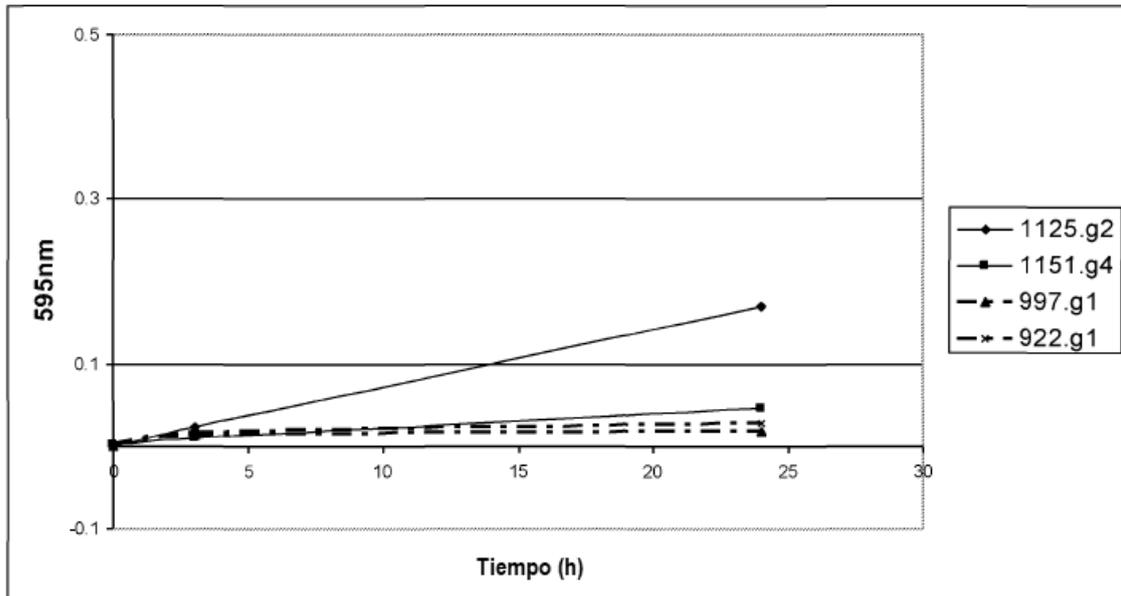


Figura 70 Neutralización contra el ribotipo 003

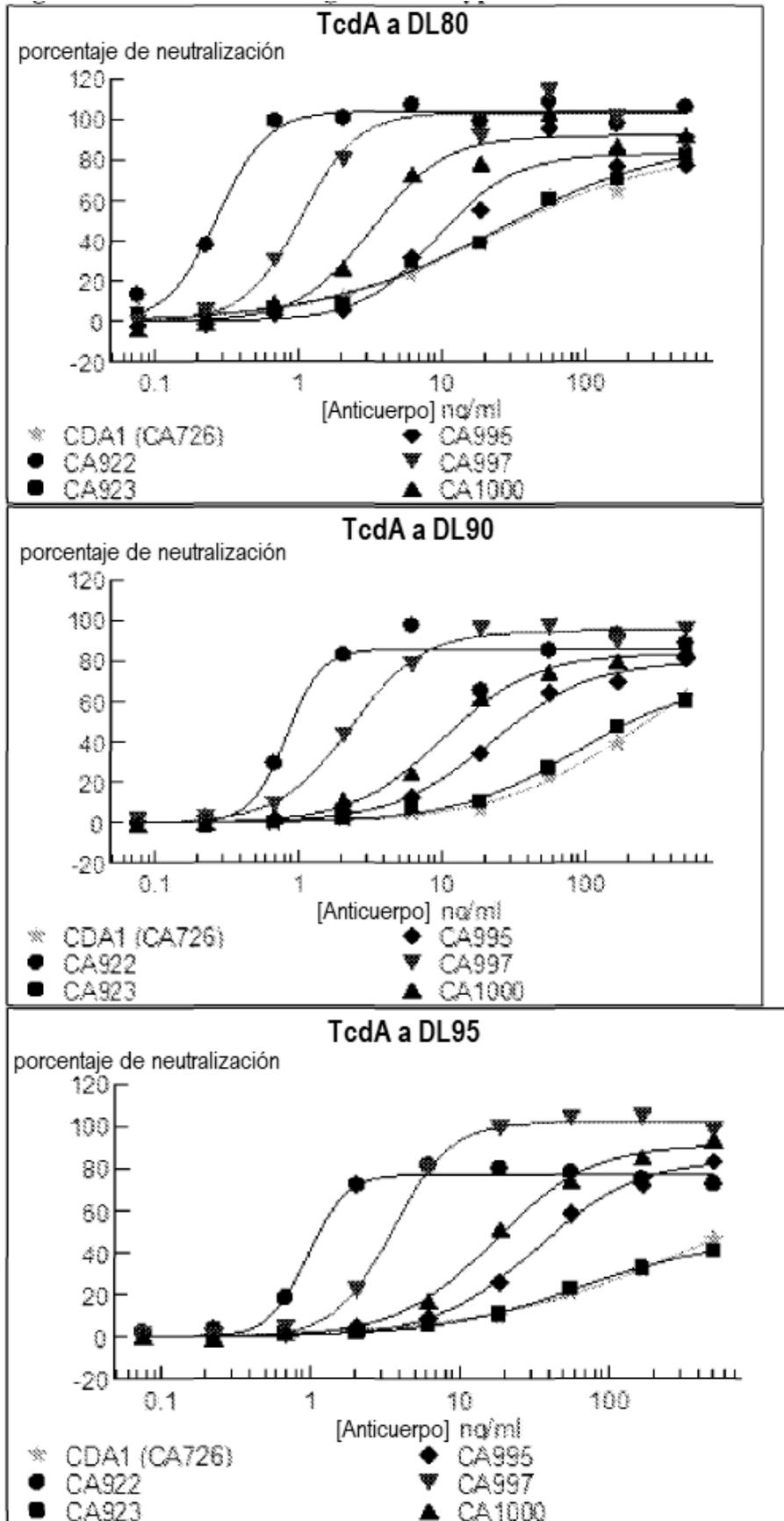


Figura 71 Neutralización contra el ribotipo 003

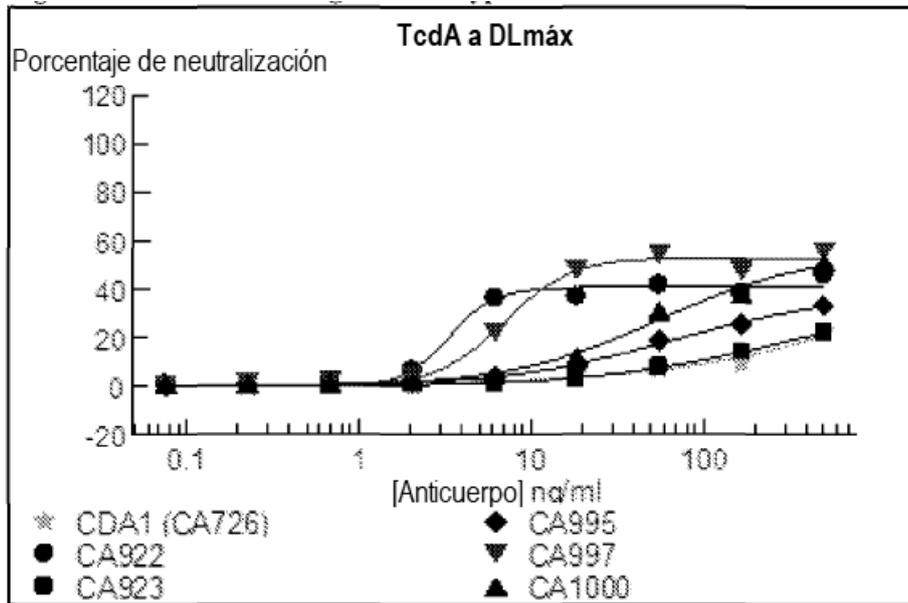


Figura 72 Neutralización contra el ribotipo 027

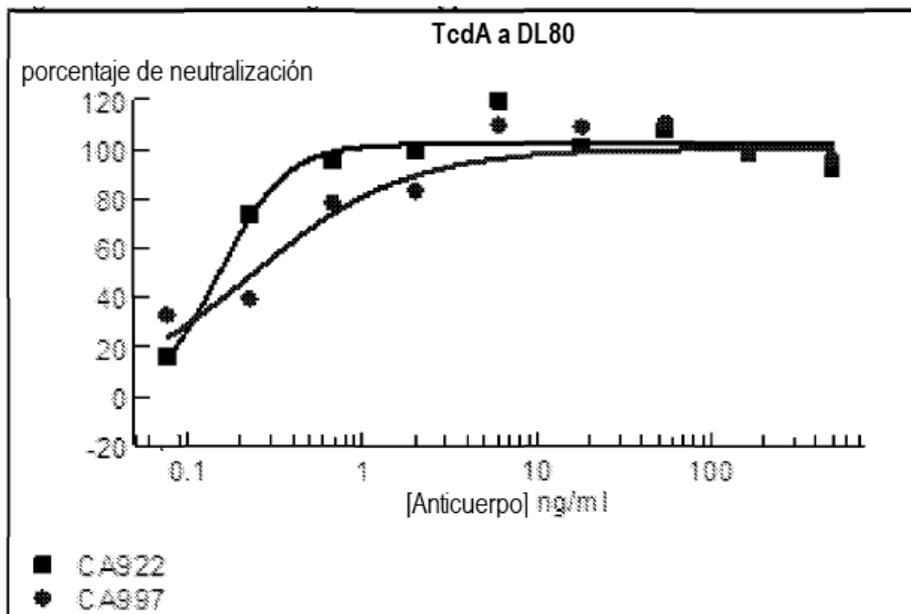


Figura 73 Neutralización contra el ribotipo 078

