

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 675**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2011 PCT/US2011/032713**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11769680 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2558493**

54 Título: **Anticuerpos para el tratamiento de la infección y enfermedad asociada a Clostridium difficile**

30 Prioridad:

15.04.2010 US 324503 P
10.09.2010 US 381669 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2020

73 Titular/es:

PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

MA, DANGSHE;
NAGASHIMA, KIRSTEN;
KENNEDY, BRIAN;
DONOVAN, GERALD, P.;
KANG, YUN;
OLSON, WILLIAM, C.;
KUMAR, SHANKAR;
TSURUSHITA, NAOYA;
MAROZSAN, ANDRE, J. y
CUPO, ALBERT

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 757 675 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 para el tratamiento de la infección y enfermedad asociada a *Clostridium difficile*

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad bajo el título 35 del Código de los Estados Unidos, párrafo 119 de las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos Nos. 61/324503, presentada el 15 de abril de 2010, y 61/381669, presentada el 10 y 20 de septiembre de 2010.

10

Campo de la invención

Esta invención se refiere en general a composiciones y terapias que pueden usarse para tratar la infección por *Clostridium difficile* (*C. difficile*) y afecciones y patologías de enfermedades asociadas a *C. difficile*, tales como diarrea asociada a *C. diff.* (CDAD), que puede resultar de la infección por la bacteria *C. difficile*. La invención se refiere además a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a epítomos en la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*, a composiciones que comprenden tales anticuerpos, así como a métodos para usar los anticuerpos o las composiciones.

20 Antecedentes de la invención

C. difficile (o *C. diff.*) es una bacteria anaerobia Gram positiva, formadora de esporas, que representa la causa principal de diarrea nosocomial (adquirida en el hospital) y colitis pseudomembranosa. La infección por *C. difficile* se estima en un total de más de 750.000 casos por año en los EE. UU., y es responsable de más muertes que todas las demás infecciones intestinales combinadas (1). En muchos hospitales, *C. difficile* constituye un mayor riesgo para los pacientes que *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) o cualquier otra bacteria (2). Se estima que los costos anuales para el manejo de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (CDAD) superan los 3.200 millones de dólares en los EE. UU. (3). Los brotes recientes de cepas de *C. difficile* con mayor virulencia o resistencia a los antibióticos han provocado fracasos del tratamiento, recaídas más frecuentes y mayores tasas de mortalidad (4).

30

La CDAD se induce típicamente por la alteración de la flora del colon mediante el uso de antibióticos tales como clindamicina, cefalosporinas y fluoroquinolonas. (3,8) Esta perturbación en el microambiente del colon, junto con la exposición a esporas de *C. difficile*, conduce a la colonización. Aproximadamente un tercio de todos los pacientes que se colonizan desarrollan CDAD (9), lo que puede provocar diarrea severa, perforación del colon, colectomía y muerte (10). La CDAD resulta después de la adquisición y proliferación de *C. difficile* en el intestino, donde las bacterias *C. difficile* producen toxina A y toxina B, dos factores de virulencia importantes de CDAD. Las toxinas A y B de *C. difficile* muestran una secuencia considerable y una homología estructural. Ambas tienen un dominio de unión al receptor del terminal C que contiene múltiples secuencias repetitivas, un dominio hidrófobo central y un dominio de glucosiltransferasa del terminal N. El dominio de unión al receptor media la unión de las toxinas a las células epiteliales intestinales a través de receptores del huésped que permanecen mal definidos en humanos. Después de la internalización a través de una vía endosómica, el dominio hidrofóbico central se inserta en la membrana del endosoma. El pH ácido del endosoma desencadena la formación de poros y la translocación de los dominios del terminal amino de las toxinas en el citosol. La glucosilación del objetivo citosólico Rho GTPasas conduce a la interrupción del citoesqueleto y la muerte celular. Las toxinas A y B demuestran diferentes perfiles patológicos con sinergia potencial para causar la enfermedad.

45

Los brotes recientes de una cepa hipervirulenta de *C. difficile* han dado como resultado mayores tasas de enfermedad grave, recaídas más frecuentes y mayor mortalidad. Una cepa hipervirulenta, BI/NAP1/027 tipo toxina III, era históricamente poco común, pero ahora es epidémica. Las cepas hipervirulentas, tales como B1/NAP1/027, producen varias veces más toxina A y toxina B que las cepas no hipervirulentas de *C. difficile*, lo que hace que tales cepas sean más formidables para tratar después de la infección. Dado que la resistencia de las cepas hipervirulentas a los antimicrobianos y antibióticos de uso común es un problema creciente que hace que estas cepas sean más difíciles de tratar y contener, se necesitan enfoques de tratamiento adicionales y terapias más potentes para combatir la hipervirulencia y la recurrencia de la enfermedad asociada con aislados hipervirulentos de *C. difficile*.

55

Los tratamientos antibióticos actuales para la infección por *C. difficile* incluyen el uso de vancomicina y/o metronidazol; sin embargo, estos antibióticos están limitados por tasas de respuesta incompletas y tasas de reinfección y recurrencia crecientes. Desde 2000, se han informado tasas de fracaso sustancialmente más altas para la terapia con metronidazol (23-25). Las altas tasas de recurrencia después del tratamiento con antibióticos pueden ser el resultado de la interrupción continua de la flora colónica normal, dando a *C. difficile* la oportunidad de recuperarse con poca competencia (26-28). El riesgo de recurrencia aumenta en pacientes que ya han tenido una recurrencia, aumentando de aproximadamente el 20% después de un episodio inicial a más del 60% después de dos o más recurrencias (29,30). Este aumento en el riesgo de recurrencia se ha asociado con la incapacidad de montar una respuesta adecuada de anticuerpos antitoxina (31). De hecho, los pacientes con los títulos más altos de antitoxina IgG en suero al final de la terapia antimicrobiana tuvieron un menor riesgo de recurrencia (32). En un estudio separado, los niveles en suero de anticuerpos antitoxina B se correlacionaron con la protección contra CDAD recurrente (33).

65

La prevalencia de la infección por *C. difficile* ha aumentado constantemente, particularmente en los ancianos, que a menudo son frágiles. Aproximadamente un tercio de los pacientes con infección por *C. difficile* tienen recurrencias de su infección, generalmente dentro de los dos meses posteriores a la enfermedad inicial. Las infecciones repetidas tienden a ser más graves que la enfermedad original; a menudo son más fatales. Los adultos mayores y las personas con sistemas inmunes debilitados son particularmente susceptibles a las infecciones recurrentes. Si no se trata de manera oportuna y adecuada, las complicaciones de la infección por *C. difficile* incluyen deshidratación, insuficiencia renal, perforación intestinal, megacolon tóxico, que puede conducir a la ruptura del colon y la muerte.

Aunque en los Estados Unidos, la infección por *C. difficile* es la infección más común adquirida por pacientes hospitalizados, también puede adquirirse fuera de los hospitales en la comunidad. Se estima que 20.000 infecciones con *C. difficile* ocurren en la comunidad cada año en los Estados Unidos. Internacionalmente, la incidencia es muy variable y depende de múltiples factores, incluida la frecuencia con la que se usa la endoscopia para establecer el diagnóstico, los patrones de uso de antimicrobianos y los patrones epidemiológicos.

Por lo tanto, está claro que la enfermedad causada por la infección por *C. difficile* pone en peligro la vida de personas de todas las edades, tanto en entornos nosocomiales como en la comunidad en general. En el mundo de hoy, existe un riesgo siempre presente de infección por *C. difficile* para aquellos que enfrentan hospitalización o que están en atención hospitalaria durante largo tiempo. Debido a que también existe la posibilidad de contraer la infección por *C. difficile* fuera del entorno de un hospital, la posibilidad de que los niños pequeños y los bebés contraigan la enfermedad es grande. Además, existe la posibilidad de que los regímenes antibióticos actuales utilizados para tratar *C. difficile* estén por debajo de un nivel óptimo. Los pacientes que presentan enfermedad asociada a *C. difficile* requieren atención hospitalaria extensa y una estadía hospitalaria de larga duración. Los costos asociados con el alto grado de atención hospitalaria y tratamiento de apoyo necesarios para los pacientes con enfermedad asociada a *C. difficile* son grandes e involucran recursos costosos, tales como un mayor número de personal médico y de enfermería, pruebas y monitoreo de laboratorio, medicamentos concomitantes y medidas de apoyo adicionales.

En consecuencia, existe la necesidad de medicamentos, fármacos y tratamientos más efectivos que se dirijan a las enfermedades potencialmente mortales causadas por *C. difficile* y, en particular, a las potentes toxinas producidas por *C. difficile*, para un beneficio profiláctico y terapéutico. Existe una necesidad médica insatisfecha de tratamientos exitosos y duraderos para la enfermedad asociada a *C. difficile* que ofrecen un menor potencial para desarrollar resistencia y un mayor potencial para una respuesta exitosa del paciente y resolución de la enfermedad, lo que lleva a la erradicación de la enfermedad.

Los documentos WO2006/121422, US2005/287150 y el artículo titulado "Human monoclonal antibodies directed Against toxins A and B prevent Clostridium difficile-induced mortality in hamsters"; INFECTION AND IMMUNITY, American Society for Microbiology, Estados Unidos, vol. 74, N° 11, noviembre 1 de 2006, páginas 6339 - 6347, todos describen el anticuerpo 3D8 antitoxina A y el anticuerpo 124 antitoxina B que se usan como agentes de comparación en la solicitud en cuestión.

Sumario de la invención

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona, al menos en parte, nuevos reactivos de anticuerpos y composiciones que comprenden anticuerpos antitoxina A y/o toxina B de *C. difficile*. Los reactivos y las composiciones pueden ser beneficiosos para tratar el número cada vez más frecuente de sujetos afectados con infección y enfermedad asociada a *C. difficile*, proporcionando una mejor calidad de vida, resolviendo la CDAD y la infección por *C. difficile* y ayudando a la supervivencia de estos individuos infectados.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En otro aspecto más, se proporciona un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se define en las reivindicaciones.

En una realización, el anticuerpo anti-toxina A de *C. difficile* aislado o el fragmento de unión al antígeno neutraliza la toxicidad *in vivo* de la toxina A de *C. difficile*. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno neutraliza la toxicidad *in vivo* de la toxina A de *C. difficile* en una cantidad de 0,1 µg a 1000 µg, o 1 µg/kg a 100.000 µg/kg. En otra realización, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno neutraliza la toxicidad *in vivo* de la toxina A de *C. difficile* en una cantidad seleccionada de 0,5 µg-1000 µg, o de 5 µg-250 µg, o de 10 mg/kg-50 mg/kg. En una realización, el anticuerpo monoclonal, o su fragmento de unión a antígeno, está en forma quimérica o humanizada.

En otra realización, el anticuerpo anti-toxina B de *C. difficile* o el fragmento de unión al antígeno neutraliza la toxicidad *in vivo* de la toxina B de *C. difficile*. En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo neutraliza la toxicidad *in vivo* de la toxina B de *C. difficile* en una cantidad seleccionada de 0,5 µg-1000 µg, 0,5 µg, 5 µg, 40 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 1000 µg, o de 10 mg/kg-50 mg/kg. En una realización, el anticuerpo monoclonal, o su fragmento de unión a antígeno, está en forma quimérica o humanizada.

- 5 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, cuando se administra a un sujeto infectado con *C. difficile* en combinación con un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une y/o neutraliza específicamente la toxina B de *C. difficile*, trata CDAD y/o aumenta la capacidad de supervivencia del sujeto. Los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B o fragmentos de los mismos pueden administrarse simultáneamente. Alternativamente, los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B o fragmentos de los mismos se administran en diferentes momentos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B o fragmentos de los mismos pueden administrarse secuencialmente.
- 10 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-toxina A de *C. difficile* o anti-toxina B de *C. difficile* o su fragmento de unión a antígeno como se define en el presente documento, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está en forma de, o está comprometido en, un anticuerpo biespecífico o bifuncional.
- 15 En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se define en el presente documento, y un portador, excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 En una realización, cada mAb está presente en la composición en la misma cantidad. En una realización, cada mAb está presente en la composición en una relación 1:1, en peso, entre sí. En una realización, cada mAb está presente en la composición en diferentes cantidades. En una realización, cada mAb está presente en la composición en proporciones diferentes a 1:1, en peso, entre sí, en donde las proporciones son como se proporcionan en el presente documento. En una realización, la composición comprende además un agente terapéutico adicional. En una realización, el agente terapéutico adicional es un antibiótico, antibacteriano, acteriocida, bacteriostático o una combinación de los mismos. En una realización, el agente terapéutico adicional es metronidazol, vancomicina, fidaxomicina o una combinación de los mismos.
- 25 Otro aspecto proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una composición, como se define en el presente documento para uso en el tratamiento de un sujeto con infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*. En una realización, las composiciones incluyen uno o más anticuerpos de la invención, preferiblemente en forma humanizada. En una realización, las composiciones contienen al menos un anticuerpo anti-toxina A proporcionado en este documento en forma humanizada, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y al menos un anticuerpo anti-toxina B de la invención en forma humanizada, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En diversas realizaciones, uno o más reactivos, fármacos, compuestos o ingredientes terapéuticos adicionales pueden incluirse en las composiciones. En una realización, las composiciones incluyen además un portador, diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, las composiciones se administran en una cantidad eficaz para tratar la infección por *C. difficile* o la enfermedad asociada a *C. difficile*, por ejemplo, diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD). En una realización, se administran dos composiciones al sujeto en una cantidad eficaz para tratar la infección por *C. difficile* o la enfermedad asociada a *C. difficile*. En una realización, las dos composiciones se administran al mismo tiempo. En una realización, las dos composiciones se administran en momentos diferentes.
- 30 Otro aspecto proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en el presente documento para inhibir o neutralizar la toxicidad para una célula por la toxina A y la toxina B de *C. difficile*.
- 35 En una realización, el anticuerpo anti-toxina A y el anticuerpo anti-toxina B están en forma humanizada. En una realización, el anticuerpo anti-toxina A y el anticuerpo anti-toxina B están en forma quimérica. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se administran al mismo tiempo. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se administran en diferentes momentos. La célula puede estar presente en un sujeto y los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden administrarse al sujeto en una cantidad eficaz para inhibir o neutralizar la toxina A y la toxina B de *C. difficile*.
- 40 Otro aspecto proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en el presente documento, para neutralizar toxinas producidas por una cepa hipervirulenta de *C. difficile*. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos quiméricos. En realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se administran al mismo tiempo o en momentos diferentes. En una realización, las toxinas de la cepa hipervirulenta son la toxina A y la toxina B. En una realización, la cepa hipervirulenta de *C. difficile* es una o más de BI/NAP1/027, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, Montreal 5, o Montreal 7.1. En una realización, el anticuerpo anti-toxina A o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una actividad neutralizante contra la toxina A producida por cepas hipervirulentas de *C. difficile* de acuerdo con lo determinado por un valor de EC_{50} de $2,6^{-12}$ M a $7,7^{-11}$ M o de $7,7^{-12}$ M a $4,8^{-8}$ M. En una realización, el anticuerpo anti-toxina B o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una actividad neutralizante contra la toxina B producida por cepas hipervirulentas de *C. difficile* de acuerdo con lo determinado por un valor de EC_{50} de $1,1^{-11}$ M a $6,5^{-10}$ M.
- 55 En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende (i) un anticuerpo anti-toxina A de *C. difficile* o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en este documento y (ii) un anticuerpo anti-toxina B de *C.*
- 60
- 65

difficile o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento, para uso en el tratamiento de un sujeto que es asintomático, pero que está en riesgo de contraer o que es susceptible de contraer infección por *C. difficile*, enfermedad asociada a *C. difficile*, o diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD). En una realización, el sujeto está hospitalizado.

En diversas realizaciones dirigidas a cualquiera de los anticuerpos monoclonales humanizados anteriores de la invención, la región CH del anticuerpo monoclonal se selecciona de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE o IgM. En una realización, la región CH es IgG1. En una realización, la región CL se selecciona del isotipo κ o λ . En una realización, la región CL es del isotipo κ . En otras realizaciones, las CDR, es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3, de los anticuerpos humanizados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en este documento, están abarcadas para unirse y/o neutralizar la toxina A y/o la toxina B o *C. difficile* en productos y métodos de acuerdo con la invención.

Estos y otros aspectos de la invención se describirán con más detalle en relación con la descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C demuestran la especificidad de mAb anti-toxina de *C. difficile* de la invención para la toxina A y/o la toxina B mediante ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con toxina A (círculos rellenos) o toxina B (cuadrados sin relleno) durante la noche a 4 °C. Después de lavar y bloquear las placas, se valoró el mAb murino PA-38 (A), PA-39 (B) o PA-41 (C) y se añadió a las placas. La unión del anticuerpo monoclonal se detectó con IgG-Fc anti-ratón de cabra conjugado con HRP. Se midió la OD en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices).

Las Figuras 2A-2D proporcionan resultados de ensayos de caracterización de unión de Biacore usando mAb murinos PA-38, PA-39, PA-41 y PA-50. La especificidad de unión se determinó usando un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare). Los mAb (PA-38 (2A), PA-39 (2B), PA-50 (2C), PA-41 (2D) o mAb no específico como control) se inmovilizaron covalentemente en la superficie del chip sensor CM5 (GE Healthcare) a aproximadamente 10.000 unidades de resonancia (RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el acoplamiento de aminas. Los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en PBS. La toxina A o la toxina B purificadas (List Biological Laboratories) a 30 nM se pasó sobre el control (mAb no específico) y las células de flujo de prueba a una velocidad de flujo de 5 μ L/min con una fase de asociación (600 s para PA-38, PA-39 y PA-41; y 300 s para PA-50) y una fase de disociación (300 s para PA-38, PA-39 y PA-41; y 600 s para PA-50). Los gráficos se presentan en RU a lo largo del tiempo.

Las Figuras 3A-3E y 3F-3H muestran los resultados de la cinética de unión anticuerpo-toxina de acuerdo con lo determinado por Biacore. Para las Figuras 3A-3E, los mAb murinos se capturaron usando un chip sensor CM5 preparado con el kit de captura de anticuerpos de ratón de Biacore. Luego se pasó la toxina a través de las celdas de flujo a concentraciones variables (0,4 -100 nM, escalamiento doble) a una velocidad de flujo de 30 μ L/min. Todas las concentraciones de mAb se probaron por duplicado y la superficie del chip se regeneró después de cada proceso utilizando las condiciones especificadas en el kit. Los cambios en RU se registraron y analizaron utilizando el modelo de unión 1:1 con el Software Bia Evaluation (Langmuir) que calculó la K_D del mAb para la toxina. Figura 3A: unión de PA-38 a la toxina A; Figura 3B: unión de PA-50 a la toxina A; Figura 3C: unión de PA-39 a la toxina A; Figura 3D: unión de PA-39 a la toxina B; y Figura 3E: unión de PA-41 a la toxina B. Para las Figuras 3F-3H, como anteriormente, los mAb murinos, es decir, mPA-50, mPA-41 o mPA-39, se unieron covalentemente a un chip sensor CM5 por el método de acoplamiento de amina. La toxina A (línea designada "(rojo)") o la toxina B (línea designada "(azul)") a 30 nM se pasó sobre las celdas de flujo de prueba (mPA-50, mPA-41 o mPA-39) a una velocidad de flujo de 5 μ L/min. Los resultados muestran que mPA-50 se une selectivamente a la toxina A (Figura 3F), y mPA-41 se une selectivamente a la toxina B (Figura 3G). El mPA-39 se une preferentemente a la toxina A, pero también demuestra reactividad cruzada con la toxina B (Figura 3H).

La Figura 4 demuestra la actividad de neutralización *in vitro* de la actividad de la toxina A usando mAb murino purificado PA-39 en células CHO-K1. Para las mediciones de citotoxicidad, la toxina A se incubó con concentraciones variables de PA-39 durante 1 hora a 37 °C (Ejemplo 3A). Las mezclas de mAb-toxina se añadieron luego a células CHO-K1 sembradas en placas de 96 pozos a razón de 2.000 células/pozo y se incubaron durante 72 horas. La supervivencia celular se comparó en cultivos tratados y no tratados y se calculó la concentración de los mAb requeridos para la neutralización del 50% de la citotoxicidad (EC_{50}). La viabilidad celular se determinó mediante CellTiter-Blue; los datos sin procesar se normalizaron a los pozos de control no tratados. Los valores se graficaron usando Prism y las curvas se calcularon usando un modelo sigmoidal de respuesta a la dosis (pendiente variable). La curva se usó luego para determinar la EC_{50} de mAb. Los puntos de datos representan el promedio de tres pozos en la misma placa.

La Figura 5 demuestra la actividad de neutralización *in vitro* de la actividad de toxina B usando mAb murino purificado PA-41 en células CHO-K1. Para las mediciones de citotoxicidad, la toxina B se incubó con concentraciones variables de PA-41 durante 1 hora a 37 °C (Ejemplo 3B). Las mezclas de mAb-toxina se añadieron luego a células CHO-K1 sembradas en placas de 96 pozos a razón de 2.000 células/pozo y se incubaron durante 72 horas. La supervivencia celular se comparó en cultivos tratados y no tratados y se calculó la concentración de los mAb requeridos para la neutralización del 50% de la citotoxicidad (EC_{50}). La viabilidad celular se determinó mediante CellTiter-Blue; los datos

sin procesar se normalizaron a los pozos de control no tratados. Los valores se graficaron usando Prism y las curvas se calcularon usando un modelo sigmoideal de respuesta a la dosis (pendiente variable). La curva se usó luego para determinar la EC₅₀ de mAb. Los puntos de datos representan el promedio de tres pozos en la misma placa.

5 La Figura 6 demuestra la actividad de neutralización *in vitro* de la actividad de la toxina A usando los mAb murinos purificados PA-38 y PA-50 en células T-84. (Ejemplo 3C). Se sembraron células T-84 (15.000 células/pozo) en placas de 96 pozos y se trataron con una combinación de mAb valorados (PA-38 (■) o PA-50 (▲)) y la toxina A (60 ng/mL). Después de la incubación (72 horas), se comparó la supervivencia celular en cultivos tratados y no tratados y se calculó la concentración de los mAb requeridos para la neutralización del 50% de la citotoxicidad (EC₅₀). La viabilidad celular se determinó mediante CellTiter-Blue; los datos sin procesar se normalizaron a los pozos de control no tratados. Los valores se graficaron usando Prism y las curvas se calcularon usando un modelo sigmoideal de respuesta a la dosis (pendiente variable). La curva se usó luego para determinar la EC₅₀ de mAb. Los puntos de datos representan el promedio de tres pozos en la misma placa.

15 La Figura 7 demuestra los resultados de las pruebas de los mAb murinos PA-38 (■) o PA-50 (▲) por su capacidad para bloquear o prevenir la hemaglutinación inducida por la toxina A de los glóbulos rojos de conejo (RBC). La toxina A (2 µg/mL) se combinó con varias diluciones de PA-38 o PA-50 y la mezcla se añadió a placas que contenían 50 µL de eritrocitos de conejo. Las placas se incubaron a 4 °C durante 4 horas. La hemaglutinación se cuantificó como intensidad de color usando el análisis de matriz de puntos de ImageQuant 400 (GE Healthcare). Los datos se representaron como % de control, y el 100% no representa hemaglutinación. Los puntos de datos representan el promedio de tres pozos analizados en la misma placa.

25 La Figura 8 demuestra la actividad de los mAb anti-toxina de *C. difficile* de la invención para prevenir la ruptura de una monocapa de células Caco-2 por la toxina A. Se sembraron células Caco-2 (25.000 células/pozo) en la cámara superior de una placa de Ensayo Caco-2 Multiscreen de 96 pozos (Millipore). Después de una incubación de 10-14 días, se confirmó la formación de una monocapa apretada midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) utilizando un voltímetro de epitelio (World Precision Instruments). Después de que se estableció y determinó la integridad de la monocapa, se agregaron toxina A (25 ng/mL) y los mAb murinos diluidos en serie (PA-38 (■) o PA-50 (▲)) a la cámara superior de la placa de ensayo. Las placas se incubaron durante 18-24 horas, y el valor se midió de TEER usando el voltímetro. La integridad de la monocapa se comparó en pozos no tratados y tratados con toxinas. Los datos de inhibición se ajustaron a una curva de regresión no lineal de respuesta sigmoideal a la dosis utilizando el software GraphPad Prism para determinar la concentración de mAb requerida para la inhibición del 50% de la toxina (EC₅₀).

35 Las Figuras 9A-9C demuestran la capacidad de los mAbs anti-toxina A PA-38 (9A) y PA-50 (9B) para neutralizar la actividad de la toxina A *in vivo*. Se inyectaron (ip) ratones hembra Swiss Webster (6-8 semanas de edad, 5 ratones/grupo) con mAb murino PA-38 o mAb murino PA-50 en las cantidades indicadas, o con PBS (200 µL) el día 0. La actividad de neutralización de un anticuerpo monoclonal comparador anti-toxina A, denominado en el presente documento CDA-1, se evaluó en las cantidades de anticuerpo indicadas (9C). El mAb comparador CDA-1 anti-toxina A se produjo sintetizando ácidos nucleicos (DNA2.0) que codifican regiones variables de cadena pesada y ligera de 3D8 (documentos WO2006/121422 y US2005/0287150), que se clonaron en vectores de expresión de IgG1 humana de longitud completa (pCON-gamma1 y pCON-kappa). El mAb comparador CDA-1 se expresó y produjo en células CHO-KSV1 y se purificó como se describe en la sección de Ejemplos en el presente documento. Los ratones fueron inyectados con 100 ng de toxina A (200 µL) en el día 1 y monitoreados diariamente durante las primeras 72 horas y luego semanalmente. Los resultados muestran que los mAb PA-38 y PA-50 pueden inhibir completamente la toxicidad asociada a la toxina A después de una dosis única de 2 µg de mAb/animal, mientras que el mAb comparador CDA-1 (5 µg/animal) falló para inhibir completamente la toxicidad asociada a la toxina A de *C. difficile*.

50 La Figura 10 demuestra la capacidad del mAb PA-41 para neutralizar la actividad de la toxina B *in vivo*. Se inyectaron (ip) ratones hembra Swiss Webster (6-8 semanas de edad, 5 ratones/grupo) con mAb murino PA-41 en las cantidades indicadas o con PBS (200 µL) el día 0. Luego se inyectó a los ratones con 100 ng de toxina B (200 µL) en el día 1 y se monitorizaron diariamente durante las primeras 72 horas y semanalmente a partir de entonces. Los resultados de este experimento muestran que el mAb PA-41 inhibe completamente la toxicidad asociada a la toxina B de *C. difficile* después de una dosis única de 5 µg de mAb/animal. Se realizó un experimento similar usando un anticuerpo monoclonal comparador anti-toxina B, denominado en el presente documento como el mAb comparador CDB-1. El mAb comparador CDB-1 anti-toxina B se produjo sintetizando ácidos nucleicos (DNA2.0) que codifican regiones variables de cadena pesada y ligera de 124 (documentos WO2006/121422 y US2005/0287150), que se clonaron en vectores de expresión de IgG1 humana de longitud completa (pCON-gamma1 y pCON-kappa). El mAb comparador CDB-1 se expresó y produjo en células CHO-KSV1 y se purificó como se describe en la sección de Ejemplos en el presente documento. Los resultados de estos experimentos no mostraron actividad de neutralización de la toxina B por parte del mAb comparador CDB-1, incluso en una cantidad de 250 µg.

60 La Figura 11 demuestra la capacidad de una combinación de mAb murinos PA-38 y PA-41 (PA-38 + PA-41) de la invención para neutralizar la actividad de la toxina A y la toxina B *in vivo*. Se inyectaron (ip) ratones hembra Swiss Webster (6-8 semanas de edad, 5 ratones/grupo) con la combinación de mAb PA-38 + PA-41 o con PBS (200 µL) el día 0. Luego se inyectaron los ratones con 100 ng de una combinación de toxina A y toxina B (200 µL) en el día 1 y se monitorizaron diariamente durante las primeras 72 horas y semanalmente a partir de entonces. Los gráficos para

toxina, PA-38 sola (círculos sin relleno) y PA-41 solo (diamantes rellenos) se superponen en el gráfico. Los resultados muestran que ni el mAb PA-38 (círculos sin relleno) ni el mAb PA-41 (diamantes rellenos) solos fueron suficientes para inhibir los efectos de ambas toxinas y no protegieron a los animales contra la infección por *C. difficile*. En contraste, la combinación de PA-38 y PA-41 (PA-38 + PA-41) a 50 µg cada uno (triángulos sin relleno e invertidos) pudo proteger a los animales infectados y prevenir la muerte relacionada con toxinas en 4 de cada 5 animales de prueba. La combinación de PA-38 y PA-41 (PA-38 + PA-41) a 5 µg cada uno (círculos rellenos) proporcionó cierta protección contra la toxicidad de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* en animales de prueba infectados.

Las Figuras 12A y 12B demuestran resultados farmacocinéticos (PK) en hámsteres para los mAb murinos PA-38 y PA-41. Los hámsteres fueron dosificados ip con 2 mg/kg (○) o 10 mg/kg (■) de mAb PA-38 (12A) o PA41 (12B). Los animales se desangraron a intervalos establecidos y el suero se analizó usando un ELISA con placas recubiertas de toxina e IgG anti-ratón de cabra, conjugado con HRP para la detección. Las curvas resultantes ilustran la respuesta dependiente de la dosis en las cohortes de 2 mg/kg y 10 mg/kg para cada anticuerpo. El análisis de WinNonLin se realizó en cada curva. Ambos anticuerpos monoclonales tienen una vida media terminal de más de 6 días.

La Figura 13 ilustra los resultados de supervivencia del estudio con hámsteres descrito en el ejemplo 5B. En este estudio, los hámsteres fueron tratados con clindamicina, inoculados con *C. difficile* (■ control infectado, Grupo 3) y luego tratados con vancomicina (◆ 20 mg/kg, Grupo 4), una combinación de mAb murinos PA-38 + PA-41 (△ 50, 50 mg/kg, Grupo 6), o una combinación de los mAb PA-39 + PA-41 (○ 50, 40 mg/kg, Grupo 7). Todos los animales en el control no infectado (Grupo 1) y el control tratado con Ab policlonales de cabra (grupo 5) sobrevivieron. Los animales tratados con una combinación de los mAb anti-toxina A y anti-toxina B de la invención sobrevivieron y estuvieron protegidos contra la toxicidad de *C. difficile* durante la duración del estudio.

La Figura 14 muestra el peso corporal medio (en gramos) de hámsteres del estudio descrito en el ejemplo 5B. Los grupos de tratamiento de animales son los siguientes: control no infectado (◆, Grupo 1); control tratado con vancomicina (■, Grupo 4); Grupo tratado con combinación de mAb murino PA-38 + PA-41 (x, Grupo 6), o grupo tratado con combinación de mAb murino PA-39 + PA-41 (●, Grupo 7). Los animales en el grupo de control infectado (Grupo 3) no sobrevivieron durante 5 días; por lo tanto, no se pudo realizar una medición del peso corporal después de la infección para el Grupo 3.

Las Figuras 15A-15D representan resultados de necropsia postmortem del estudio con hámsteres descrito en el Ejemplo 5B. Se evaluaron animales representativos de cada uno de los grupos relevantes del estudio: (A) Grupo 1, control no infectado; (B) Grupo 3, control infectado; (C) Grupo 6, grupo tratado con combinación de mAb murino PA-38 + PA-41; y (D) Grupo 7, grupo tratado con combinación de mAb murino PA-39 + PA-41. Las flechas indican el ciego de cada hámster. El ciego estaba notablemente rojo e inflamado en el grupo de control infectado 3 (B). Por el contrario, la ceca de los hámsteres en el Grupo 6 (C) y el Grupo 7 (D) fueron similares a la ceca en los animales de control sanos y no infectados del Grupo 1 (A).

Figuras 16A y 16B-1 y B-2. La Figura 16A ilustra los resultados de supervivencia del estudio con hámsteres descrito en el ejemplo 5C. En este estudio, los hámsteres fueron tratados con clindamicina, inoculados con *C. difficile* (■ control infectado, Grupo 1), y luego diferentes grupos de animales fueron tratados con vancomicina (◆ 20 mg/kg, Grupo 2), la combinación de mAb murinos PA-39 + PA-41 (▲ 50 + 50 mg/kg, Grupo 3), mAb murino PA-41 solo (○ 50 mg/kg, Grupo 4), mAb murino PA-38 solo (∇ 50 mg/kg, Grupo 5), mAb murino PA-39 solo (□ 50 mg/kg, Grupo 6), o mAb murino PA-50 solo (◇ 50 mg/kg, Grupo 7). Todos los animales en el control no infectado (Grupo 1) sobrevivieron durante el curso del estudio. La Figura 16B-1 ilustra los resultados de supervivencia animal del estudio con hámsteres descrito en el Ejemplo 5E. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se muestran para animales tratados con clindamicina y luego inoculados con *C. difficile* (■, control infectado, Grupo 2); tratados con vancomicina (◇, 20 mg/kg, Grupo 3); tratados con una combinación 1:1 de mAb PA-50 + PA-41 humanizados ((hPA-50 + hPA-41), △, 50 + 50 mg/kg, Grupo 4); tratados con una combinación 1:1 de mAb PA-50 + PA-41 humanizados ((hPA-50 + hPA-41), ○, 20 + 20 mg/kg, Grupo 5); tratados con una combinación 1:1 de los mAb comparadores CDA-1 + CDB-1 ((CDA-1 + CDB-1), V, 50 + 50 mg/kg, Grupo 6); o tratados con una combinación 1:1 de los mAb comparadores CDA-1 + CDB-1 ((CDA-1 + CDB-1), □, 20 + 20 mg/kg, Grupo 7). La Figura 16B-2 ilustra los resultados del cambio de peso del estudio con hámsteres descrito en el Ejemplo 5E. Media de los pesos corporales (±SD) de los animales a lo largo del tiempo en los diferentes grupos de tratamiento descritos para la Figura 16B-1 en comparación con los animales de control no infectados.

Las Figuras 17A-17C muestran el tratamiento con caspasa 1 de la toxina B de *C. difficile*. (A): toxina B de *C. difficile* de longitud completa y sus dominios. (B): Análisis SDS-PAGE (reductor) con 3-8% de tris acetato de toxina B (TcdB) y la toxina B tratada con caspasa 1. Se observaron cuatro fragmentos de toxina: 193, 167, 103 y 63 kDa. (C): Los posibles fragmentos generados después del tratamiento con caspasa 1 de la toxina B.

Las Figuras 18A-18C muestran la detección con SDS-PAGE (A) y transferencia Western (B, C) de fragmentos de toxina B de *C. difficile* utilizando mAb anti-toxina B. (A): análisis SDS-PAGE de fragmentos de la toxina B generados por el tratamiento con caspasa 1 (igual que la Figura 17B); (B): detección por transferencia Western de fragmentos de

toxina B usando mAb PA-41. (C) Detección por transferencia Western de fragmentos de toxina B usando mAb murino PA-39.

Las Figuras 19A-19E muestran la caracterización de mAb murinos anti-toxina de *C. difficile* por unión de Biacore. Se evaluó la unión competitiva de los mAb anti-toxina. (A): mAb PA-41 se une a un solo epítipo en la toxina B. (B): el mAb PA-39 se une a un solo epítipo en la toxina A. (C): los mAb PA-39 y PA-41 se unen a diferentes epítopos en la toxina B. La unión del mAb PA-41 a la toxina B es epítópicamente diferente de la unión del anticuerpo comparador anti-toxina B CDB-1 a la toxina B. (D): mPA-41 inmovilizado en el chip CM5 captura la toxina B, pero no es capaz de unirse a mA-41 adicional, lo que indica que solo hay un epítipo de unión de mPA-41. La adición del mAb comparador CDB-1 produjo una señal aumentada, lo que demuestra que mPA-41 y el mAb comparador CDB-1 se unen a diferentes epítopos en la toxina B. (E): el análisis de transferencia Western utilizando toxina B, tratada o no tratada con caspasa 1, demuestra que mPA-41 y mAb comparador CDB-1 tienen diferentes patrones de unión y se unen a diferentes epítopos en la toxina B.

Las Figuras 20A-20C muestran que la toxina A de *C. difficile* se escinde utilizando enteroquinasa (EK). (A): la toxina A de *C. difficile* de longitud completa y sus dominios. (B): el análisis de SDS-PAGE (reductor) con 3-8% de tris acetato de toxina A (TcdA) y toxina A tratada con EK (C): los posibles fragmentos generados después del tratamiento con EK de la toxina A a 25 °C durante 48 horas.

Las Figuras 21A-21C muestran la tinción con azul de Coomassie (SDS-PAGE), (A) y la detección por transferencia Western (B, C) de fragmentos de toxina A de *C. difficile* utilizando mAb murinos anti-toxina A. (A): el análisis SDS-PAGE de fragmentos de toxina A generados por tratamiento con EK (igual que en la Figura 20B). (B): detección por transferencia Western de fragmentos de toxina A utilizando mAb PA-50. (C): detección de transferencia Western de fragmentos de toxina A usando mAb PA-39. En las Figuras 21B y 21C, la banda de kDa es de 158 kDa y puede considerarse que es de 158-160 kDa.

Figuras 22A-1 y A-2-22F. Las Figuras 22A-1 y A-2-22D muestran la caracterización de la unión de mAb anti-toxina A murina a la toxina A de *C. difficile* usando un ensayo de unión Biacore. Figura 22A-1: se observó que el mAb PA-50 se unía a múltiples sitios en la toxina A. Figura 22A-2: el mAb PA-50 se inmovilizó en el chip sensor y luego se puso en contacto secuencialmente con la toxina A purificada, PA-50 adicional y mAb comparador CDA-1 (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150). Figura 22B: toxina A capturada por el mAb comparador CDA-1 en el chip Biacore que une además CDA-1 adicional y mAb PA-50, mostrando las diferencias en los epítopos de toxina A unidos por los anticuerpos. Figura 22C: el epítipo de unión a mAb PA-39 en la toxina A es diferente del epítipo de unión al mAb comparador CDA-1 en la toxina A. Figura 22D: se realizó la unión competitiva de los mAb murinos PA-50 y PA-39 a la toxina A usando Biacore. El mAb PA-50 inmovilizado en el chip CM5 captura la toxina A, que puede unir mPA-50 adicional y también mPA-39, lo que demuestra que hay múltiples copias del epítipo mPA-50 en la toxina A y que mPA-50 y mPA-39 se unen a epítopos dispares en la toxina A. Figuras. 22E y 22F: los resultados de Biacore se confirmaron mediante análisis de transferencia Western utilizando toxina A que no se trató o se trató con la enzima enteroquinasa (EK). (E): mPA-39 y el mAb comparador CDA-1 muestran diferentes patrones de unión a la toxina A tratada con EK (Carril: TcdA/EK), lo que indica diferentes dominios de unión y epítopos en la toxina A. (F): mPA-50 y el mAb comparador CDA-1 se unen al mismo dominio de toxina A, pero a diferentes epítopos.

Las Figuras 23A y 23B demuestran la actividad neutralizante de PA-41 *in vitro* contra un panel diverso de veinte aislados clínicos toxigénicos de *C. difficile*, que incluyen 6 aislados BI/NAP1/027, 3 cepas de referencia (VPI 10463, ATCC 43596 y 630), 2 aislados negativos para toxina A positivo para toxina B (toxA-/toxB+), 3 aislados de paciente ambulatorio y otros 6 aislados clínicos comunes. La Figura 23A muestra la actividad neutralizante de mAb murino PA-41 en células CHO-K1 contra sobrenadantes generados a partir de diferentes cultivos de aislados clínicos de *C. difficile* como se presenta en el Ejemplo 8, Tabla 6. El mAb purificado PA-41 se diluyó en serie y luego se mezcló con un sobrenadante con factor de dilución predefinido que puede causar 90% de muerte celular. Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y luego se añadieron a células CHO-K1. Las células se incubaron durante 72 horas, y la viabilidad celular se midió usando Cell-Titer Blue. La Figura 23B ilustra la actividad neutralizante del mAb humanizado hPA-41, así como la del mAb comparador CDB-1 contra las 2 cepas de referencia de *C. difficile* (VPI 10463 y ATCC 43596) y 6 cepas BI/027/027 de *C. difficile* (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 y Montreal 7.1). La actividad de neutralización del mAb hPA-41 (cuadrados rellenos) y mAb comparador CDB-1 (triángulos rellenos) en células CHO-K1 contra sobrenadantes de cepas de referencia (VPI 10483 y ATCC 43596) y se muestran las cepas BI/NAP1/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 y Montreal 7.1).

Las Figuras 24A y 24B demuestran la actividad neutralizante de mAb PA-50 *in vitro* contra aislados clínicos toxigénicos de *C. difficile* descritos para las Figuras. 23A y B. La Figura 24A muestra la actividad de neutralización de mAb murino PA-50 en células T-84 contra los sobrenadantes generados a partir de diferentes cultivos de aislados clínicos de *C. difficile* como se presenta en el Ejemplo 8, Tabla 6. El mAb purificado PA-50 se diluyó en serie y luego se mezcló con un sobrenadante con factor de dilución predefinido que puede causar más del 90% de muerte celular. Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y luego se agregaron a las células T-84. Las células se incubaron durante 72 horas, y la viabilidad celular se midió usando Cell-Titer Blue. La Figura 24B muestra los resultados de experimentos similares realizados utilizando mAb humanizado hPA-50 y el mAb comparador CDA-1 en células T-84. Se muestra la actividad de neutralización de hPA-50 (cuadrados rellenos) y el comparador CDA-1 (triángulos rellenos) en células T-84 contra

los sobrenadantes generados a partir de seis cepas BI/NAP1/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 y Montreal 7.1). Para la Figura 24A: *: N/A: No aplicable; no se produjo toxina A a partir de las cepas de toxina A/toxina B+ F1470, 8864, CCL13820 y CCL14402; " : el título de la toxina A fue muy bajo; no hubo citotoxicidad medible en T-84 usando sobrenadante; ^: No aplicable; no se produjo toxina A a partir de las cepas de toxina A/toxina B+ o la concentración era demasiado baja.

Las Figuras 25A-25D demuestran la neutralización de las toxinas producidas por diversas cepas de *C. difficile*. Las Figuras 25A y 25B muestran actividad neutralizante de mAb murino PA-39 en células T-84 contra sobrenadantes generados a partir de diferentes cultivos aislados clínicos de *C. difficile* como se presenta en el Ejemplo 8, Tabla 6. El mAb PA-39 (sobrenadante de hibridoma) se diluyó en serie y se muestra el factor de dilución de cada sobrenadante. La Figura 25B muestra los resultados de experimentos similares realizados usando mAb murino PA-39 y el mAb comparador CDA-1 en células T-84. Se muestra la actividad de neutralización de PA-39 (cuadrados rellenos) y el mAb comparador CDA-1 (triángulos rellenos) en células T-84 contra los sobrenadantes generados a partir de seis cepas BI/NAP1/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 y Montreal 7.1). Para la Figura 25A: *: N/A: No aplicable; no se produjo toxina A a partir de las cepas de toxina A/toxina B+ F1470, 8864, CCL13820 y CCL14402; " : el título de toxina A era muy bajo; no había citotoxicidad medible en T-84 usando sobrenadante; ^: No aplicable; no se produjo toxina A a partir de cepas de toxina A/toxina B+ o la concentración era demasiado baja. En la Figura 25C, el mAb anti-toxina A humanizado PA-50 y el mAb comparador anti-toxina A CDA-1 se probaron para neutralizar la citotoxicidad de los sobrenadantes de cultivo de *C. difficile* contra células T-84 (Ejemplo 8, Tabla 7). En la Figura 25D, el mAb anti-toxina B humanizado PA-41 y el mAb comparador anti-toxina A CDB-1 se probaron para neutralizar la citotoxicidad de los sobrenadantes de cultivo de *C. difficile* contra células T-84 (Ejemplo 8, Tabla 7).

La Figura 26 muestra que el mAb quimérico PA-41 (mAb cPA-41) neutraliza efectivamente la toxicidad de la toxina B de *C. difficile* en CHO-K1 en comparación con el mAb murino homólogo PA-41. Se generaron dos mAb PA-41 quiméricos; uno que tenía un sitio de glicosilación eliminado en la región VL, designado como cPA-41 (NG), y otro que no tenía un sitio de eliminación de glicosilación, designado como cPA-41 (G) en la Figura. Tanto cPA-41 (NG) como cPA-41 (G) mostraron niveles de neutralización similares para la toxina B (2 pg/mL, TechLab) en células CHO-K1, y ambos mAb quiméricos neutralizaron la toxina B a un nivel similar a aquel del mAb murino (mPA-41).

La Figura 27 muestra que el mAb quimérico PA-39 (cPA-39) neutraliza efectivamente la toxicidad de la toxina A de *C. difficile* (1 µg/mL, Listlab) en células CHO-K1 en comparación con el mAb murino PA-39 (mPA-39) progenitor.

La Figura 28 muestra que el mAb quimérico PA-50 (cPA-50) neutraliza efectivamente la toxicidad de la toxina A de *C. difficile* (60 ng/mL, TechLab) en células T-84 en comparación con el mAb murino PA-50 (mPA-50) progenitor.

La Figura 29 muestra la actividad de neutralización *in vitro* de los mAb murino PA-41 (mPA-41) y humanizado PA-41 (hPA-41) contra la toxina B de *C. difficile*. El porcentaje de supervivencia celular en comparación con los controles se midió usando CellTiter Blue. El mAb hPA-41 neutraliza eficazmente la toxicidad de la toxina B (2 pg/mL, TechLab) en células CHO-K1 con una EC₅₀ de 6 pM y fue prácticamente equipotente que el anticuerpo monoclonal murino progenitor (mPA-41).

La Figura 30 muestra la actividad de neutralización *in vitro* de mAb murino PA-39 (mPA-39) y humanizado PA-39 (hPA-39) contra la toxina A de *C. difficile*. El mAb hPA-39 neutraliza efectivamente la toxicidad de la toxina A (20 ng/mL, TechLab) en células CHO-K1 con una EC₅₀ de 50 pM y fue prácticamente equipotente que el anticuerpo monoclonal murino progenitor (mPA-39).

Las Figuras 31A-31H muestran los resultados de la actividad de neutralización *in vitro* y los estudios de mecanismo de acción (MOA) utilizando los mAbs descritos. Los ensayos con base en células usando células CHO-K1 y células T-84 se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 1, 3 y 7. La Figura 31A muestra que el mAb humanizado PA-50 (hPA-50) neutralizó efectivamente la toxicidad de la toxina A (60 ng/mL, TechLab) en células T-84 en comparación con el mAb murino PA-50 progenitor (mPA-50). Las Figuras 31B-D muestran las actividades de neutralización de los mAbs anti-toxina A PA-39 y PA-50 en comparación con la del mAb comparador anti-toxina A CDA-1. Los valores de EC₅₀ y del porcentaje de inhibición máximo son como se presentan en la Tabla A del Ejemplo 7C. Las Figuras 31E y F muestran la actividad de neutralización de mAb anti-toxina B PA-41 en comparación con la de mAb comparador anti-toxina B CDB-1. Los valores de EC₅₀ y del porcentaje de inhibición máximo son los presentados en la Tabla B del Ejemplo 7C. Las Figuras 31G y H muestran un método ELISA y resultados para evaluar la capacidad de los mAb anti-toxina A para bloquear la internalización de la toxina A en las células y para evaluar las actividades de estos mAb en la prevención de la internalización de la toxina A en relación con el control de anticuerpos policlonales anti-toxina A de cabra y sin control de anticuerpos.

Las Figuras 32A y 32B representan las secuencias de aminoácidos de las regiones VH humanizadas de PA-39 (hPA-39), SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números sobre las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. Las ubicaciones de las CDR están subrayadas.

Las Figuras 33A y 33B representan las secuencias de aminoácidos de las regiones VL humanizadas de PA-39 (hPA-39), SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números sobre las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. Las ubicaciones de los CDR están subrayadas.

5 Las Figuras 34A y 34B representan las secuencias de aminoácidos de las regiones VH humanizadas de PA-50 (hPA-50), SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números sobre las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. Las ubicaciones de las CDR están subrayadas.

10 La Figura 35 representa la secuencia de aminoácidos de la región VL humanizada de PA-50, SEQ ID NO: 7. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números sobre las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. Las ubicaciones de las CDR están subrayadas.

15 Las Figuras 36A y 36B representan las secuencias de aminoácidos de las regiones VH humanizadas de PA-41 (hPA-41), SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números sobre las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. Las ubicaciones de las CDR están subrayadas.

20 La Figura 37 representa la secuencia de aminoácidos de la región VL humanizada de PA-41, SEQ ID NO: 10. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números sobre las secuencias indican las ubicaciones de acuerdo con Kabat et al. Las ubicaciones de las CDR están subrayadas.

25 Las Figuras 38A y 38B muestran la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos codificada de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina A de *C. difficile*. La Figura 38A representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina A como se establece en la SEQ ID NO: 16, que está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 17. La Figura 38B representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado como se establece en la SEQ ID NO: 14, que está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 15.

30 Las Figuras 39A y 39B muestran la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos codificada de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina A de *C. difficile*. La Figura 39A representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina A como se establece en la SEQ ID NO: 20, que está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 21. La Figura 39B representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina A como se establece en la SEQ ID NO: 18, que está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 19.

40 Las Figuras 40A y 40B muestran la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos codificada de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina B de *C. difficile*. La Figura 40A representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina B como se establece en SEQ ID NO: 24, que está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 25. La Figura 40B representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-toxina B humanizado como se establece en la SEQ ID NO: 22, que está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 23.

45 Las Figuras 41A-41C demuestran la actividad de neutralización *in vitro* contra la toxina A o toxina B de *C. difficile* de fragmentos Fab de mAb murinos en comparación con la potencia de los anticuerpos completos homólogos. (A): actividad de neutralización de mAb murino PA-39 y PA-39 Fab en células CHO-K1; toxina A (TechLab, 60 ng/mL); (B): actividad de neutralización de mAb murino PA-41 y PA-41 Fab en células CHO-K1; toxina B (TechLab, 2 pg/mL); (C): actividad de neutralización de mAb murino PA-50 y PA-50 Fab en células T-84; toxina A (TechLab, 60 ng/mL).

50 Las Figuras 42A y 42B muestran los perfiles de concentración de anticuerpos resultantes del estudio farmacocinético (PK) descrito en el Ejemplo 13 en el presente documento. La Figura 42A representa los resultados de PK (concentración de anticuerpos en suero en µg/mL) durante 29 días de animales que reciben una dosis única de mAb anti-toxina A purificado, humanizado PA-50, a una concentración de 1 mg/kg (A) o 5 mg/kg (■) el día 0. La Figura 42B muestra los resultados de PK (concentración de anticuerpos en suero en µg/mL) durante 29 días de animales que recibieron una dosis única de mAb anti-toxina B purificado, humanizado PA-41 a una concentración de 1 mg/kg (▲) o 5 mg/kg (■) el día 0.

60 Descripción detallada de la invención

65 La presente invención abarca anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que proporcionan terapias y tratamientos no antibióticos que bloquean los efectos patogénicos de la infección por *C. difficile* y, preferiblemente, proporcionan tiempo para que el colon sane y/o la microflora normal del tracto gastrointestinal, por ejemplo, colon, intestino, etc., se restablezca. Los anticuerpos monoclonales como se describen en el presente documento, sus fragmentos de unión a antígenos, tales como formas humanizadas o quiméricas de los mismos, proporcionan terapias

y medicamentos no antibióticos tanto para tratar la enfermedad activa como para prevenir la enfermedad recurrente a fin de permitir a los pacientes que padecen infección por *C. difficile* y CDAD para resolver su enfermedad sin recaída a otra enfermedad o a una enfermedad o síntomas más graves. En una realización, los anticuerpos de la invención tienen actividad terapéutica contra la enfermedad activa causada por, o asociada con, infección de sujetos por *C. difficile*. En una realización, los anticuerpos de la invención resuelven la enfermedad activa causada por, o asociada con, infección de sujetos por *C. difficile*. En una realización, los anticuerpos de la invención tienen efectos terapéuticos al disminuir la duración y/o la gravedad de la enfermedad activa causada por, o asociada con, infección por *C. difficile* en un sujeto. En una realización, los anticuerpos de la invención o porciones o fragmentos de los mismos pueden proporcionarse en combinación con agentes terapéuticos antibióticos.

Se han generado anticuerpos monoclonales (mAb) contra las toxinas A y B de *C. difficile* como se describe en el presente documento. Los mAb anti-toxina exhiben una potente actividad tanto en ensayos *in vitro* como en modelos animales preclínicos de infección por *C. difficile in vivo*. Más específicamente, los mAb de la invención protegen de manera potente y duradera a los hámsteres de la mortalidad en un modelo de hámster relevante y estricto de infección por *C. difficile*.

Los anticuerpos proporcionan enfoques no antibióticos para el tratamiento de CDAD y pueden permitir la interrupción de antibióticos y bloquear los efectos patogénicos de las toxinas de *C. difficile*, proporcionando así tiempo para que el colon sane y la microflora intestinal normal se restablezca. Los mAb tal como se describen en el presente documento pueden proporcionar un beneficio terapéutico por su capacidad para neutralizar las toxinas de *C. difficile* y pueden emplearse en estrategias pasivas o activas para tratar pacientes con múltiples recurrencias de *C. difficile*. En particular, los mAb pueden utilizarse para prevenir la recurrencia de la infección, para tratar formas graves y activas de enfermedad, y para tratar pacientes con múltiples recaídas de enfermedades asociadas a *C. difficile*. Los mAb como se describe en el presente documento pueden proporcionar un medio eficaz para neutralizar las toxinas A y B de *C. difficile* para prevenir, bloquear o inhibir la recurrencia de la infección y/o formas graves y activas de la enfermedad y recaídas múltiples.

Como se usa en el presente documento, "toxina A" y "toxina B" se refieren a las enterotoxinas citotóxicas producidas por el microorganismo *C. difficile*. Las toxinas A y B son los principales determinantes de virulencia de *C. difficile*, y las cepas sin toxinas no son patógenas. Las toxinas A y B se transcriben de un locus de patogenicidad que incluye los genes de la toxina, *tcdA* (toxina A) y *tcdB* (toxina B), y tres genes reguladores, uno de los cuales (*tcdC*) codifica un supuesto regulador negativo de la transcripción de toxina. La proteína *TcdC* parece inhibir la transcripción de toxinas durante la fase temprana de crecimiento exponencial del ciclo de vida bacteriano. Para la toxina B, se ha descrito un sitio de escisión autocatalítica entre leucina⁵⁴³ y glicina⁵⁴⁴. La escisión resulta de la activación de un dominio de aspartil proteasa por el fosfato de inositol citosólico del huésped y libera el dominio de glucosiltransferasa activa.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*, composiciones que contienen uno o más de dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, vectores que contienen secuencias de ácido nucleico que codifica los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos y métodos para usar los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para el tratamiento o prevención de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*.

Debe entenderse que cuando se hace referencia en el presente documento al término "anticuerpos" o "inmunoglobulinas" al describir la presente invención y sus diversos aspectos y realizaciones, este término también se entiende generalmente que abarca fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos o inmunoglobulinas, para evitar la repetición excesiva de la frase asociada "fragmentos de unión a antígeno" cada vez que se menciona el término "anticuerpos" o "inmunoglobulinas". Por lo tanto, la presente invención abarca no solo los anticuerpos dirigidos contra la toxina A y la toxina B de *C. difficile*, es decir, los antígenos de toxina A y toxina B, sino también fragmentos de dichos anticuerpos que se unen a los antígenos de toxina A y toxina B de *C. difficile*, como se describe adicionalmente en este documento. En realizaciones, tales fragmentos de unión a antígeno son capaces de neutralizar la toxicidad de la toxina A y/o la toxina B de una manera similar a la del anticuerpo intacto.

Los anticuerpos abarcados por la invención incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a la toxina A de *C. difficile* y que inhiben de manera competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión específica a la toxina A de *C. difficile* de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9692, PTA-9694 o PTA-9888. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a la toxina A de *C. difficile* y que se unen específicamente a un epítipo en la toxina A de *C. difficile* definido por la unión de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9692, PTA-9694 o PTA-9888. En algunas realizaciones, el epítipo reside en el dominio de unión al receptor del terminal C de *tcdA*. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos inhiben de forma competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión de PA-50 a *tcdA*. En otras realizaciones, el epítipo reside en el dominio de translocación de *tcdA*. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos inhiben de manera competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión de PA-39 a *tcdA*. Tales anticuerpos aislados pueden comprender anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos

químicos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a antígeno o porciones de los mismos.

Los experimentos que emplean proteólisis enzimática (enteroquinasa) de toxina A para evaluar la especificidad de anticuerpos monoclonales anti-toxina A de *C. difficile* de la invención se realizaron como se describe en el Ejemplo 6. El epítipo en la toxina A que es reconocido y unido por el mAb PA-39 se encuentra dentro de una región que es distinta del dominio de unión al receptor de la toxina A, es decir, fuera del dominio de unión al receptor de la toxina A, y eso es distinto de un epítipo unido por un anticuerpo anti-toxina A humano que se informa que se une a un dominio de unión al receptor del terminal C de la toxina A (7). Como se describe en los Ejemplos 6 y 7 de este documento y se muestra en las Figuras 22 y 31, los ensayos de Biacore respaldan un único sitio de unión en la toxina A para PA-39. La detección de transferencia Western de la toxina A digerida enzimáticamente demuestra que PA-39 se une a una región en la toxina A que está separada de las regiones unidas por PA-50 y el mAb comparador CDA-1. La actividad *in vitro* de PA-39 en el ensayo de potencia de la toxina muestra cambios tanto en la EC₅₀ como en el porcentaje máximo de inhibición a medida que se agrega más toxina A al cultivo, lo que indica un mecanismo de inhibición competitivo mixto para la PA-39. La detección por ELISA de la toxina A después de la protección mediante un exceso de 100 veces de PA-39 confirmó que la inhibición de la toxina por PA-39 se produce al prevenir la internalización de la toxina y los efectos adversos de la toxina citocelular, por ejemplo, la citotoxicidad.

Además, como se describe en los Ejemplos 6 y 7 de este documento y se muestra en las Figuras 22 y 31, los ensayos de Biacore soportan al menos dos sitios de unión en la toxina A para PA-50. La detección de Transferencia Western de la toxina A digerida enzimáticamente demuestra que PA-50 se une a una región en la toxina A similar a la unida por el mAb comparador CDA-1. La actividad *in vitro* de PA-50 en el ensayo de potencia de toxina muestra un cambio en EC₅₀ a medida que se agrega más toxina A al cultivo, lo que indica un mecanismo de inhibición competitivo por PA-50. La detección por ELISA de la toxina A después de la protección por un exceso de 100 veces de PA-50 confirmó que la inhibición de la toxina por PA-50 se produce al prevenir la internalización de la toxina y la citotoxicidad posterior.

Los anticuerpos de la invención también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a la toxina B de *C. difficile* y que inhiben de manera competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión específica a la toxina B de *C. difficile* de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 o PTA-9692. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a la toxina B de *C. difficile* y que se unen específicamente a un epítipo en la toxina B de *C. difficile* definido por la unión de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 o PTA-9692. En algunas realizaciones, el epítipo reside en el dominio enzimático del terminal N de tcdB. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos inhiben de manera competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión de PA-41 a tcdB. En otras realizaciones, el epítipo reside en el dominio de translocación, por ejemplo, los aminoácidos 850-1330 de tcdB. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos inhiben competitivamente, o compiten de forma cruzada, por la unión de PA-39 a tcdB.

Los experimentos que emplean proteólisis enzimática (caspasa 1) de toxina B para evaluar la especificidad de anticuerpos monoclonales anti-toxina B de *C. difficile* de la invención se realizaron como se describe en el Ejemplo 6. Se demostró que el mAb PA-41 (PTA-9693) reconoce fragmentos de aproximadamente 103 kDa y 63 kDa, que derivan del dominio enzimático del terminal N de la toxina B. El análisis de secuencia del terminal N de los principales fragmentos digeridos confirmaron este análisis. Se demostró que el mAb PA-41 se une a un epítipo único dentro del dominio enzimático del terminal N de la toxina B, distinto del dominio de unión al receptor del terminal C de la toxina B unida por un anticuerpo humano anti-toxina B (7). Como se describe en los Ejemplos 6 y 7 de este documento y se muestra en las Figuras 19 y 31E y F, los ensayos de Biacore apoyan un único sitio de unión en la toxina B para PA-41. La detección de la transferencia Western de la toxina B digerida enzimáticamente muestra que PA-41 se une a una región diferente en la toxina B que es diferente de la unida por el mAb comparador CDB-1. La actividad *in vitro* de PA-41 en el ensayo de potencia de la toxina muestra cambios tanto en la EC₅₀ como en el porcentaje máximo de inhibición a medida que se agrega más toxina B al cultivo, lo que indica un mecanismo mixto competitivo de inhibición de la PA-41.

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas que se depositaron y recibieron las siguientes designaciones de depósito de patente: PTA-9692 (para PA-39), PTA-9693 (para PA-41), PTA-9694 (para PA-50) y PTA-9888 (para PA-38). Estos hibridomas se depositaron de conformidad con los requisitos del Tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para fines de procedimiento de patentes con la American Type Culture Collection ("ATCC"), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 EE. UU., como Autoridad de Depósito Internacional, el 6 de enero de 2009 (para PTA-9692, PTA-9693, PTA-9694) y el 24 de marzo de 2009 (para PTA-9888) y se les dieron las designaciones de depósitos de patentes anteriormente designadas. Tal como se usa en el presente documento, tanto los hibridomas depositados como los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas pueden referirse a las mismas designaciones de depósito ATCC o a los números encontrados dentro de las designaciones de depósito ATCC. Por ejemplo, PTA-9888 o 9888 pueden usarse para referirse al hibridoma depositado o al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma. Por consiguiente, los nombres de los anticuerpos monoclonales descritos en este documento pueden usarse indistintamente con los nombres de los hibridomas que los producen. Será claro para un experto en la técnica cuando el nombre se refiera al anticuerpo o al hibridoma que produce el anticuerpo. Los fragmentos de unión a antígeno

proporcionados en el presente documento incluyen los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos depositados mencionados anteriormente.

Los anticuerpos de la invención exhiben una serie de características beneficiosas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-toxina A neutralizan o inhiben la toxicidad de la toxina A tanto *in vitro* como *in vivo*. En estudios de neutralización *in vitro* utilizando células IMR-90, PA-39 humanizado y la PA-41 humanizado demostraron potencias de neutralización (es decir, valores de EC₅₀) de 46 pM contra la toxina A en las células y 5 pM contra la toxina B, respectivamente, en estas células. Cuando se compara con los valores reportados en la literatura para la neutralización por anticuerpos monoclonales anti-toxina A y anti-toxina B humanos (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150; Babcock et al., Infect. Immun., 2006), (7) el valor de neutralización de la EC₅₀ de 46 pM de hPA-39 parecía ser más alto que el reportado para el mAb anti-toxina A humano, y el valor de neutralización de la EC₅₀ de 5 pM de hPA-41 parecía ser más alto que el reportado para mAb anti-toxina B humano. En consecuencia, en los estudios descritos en este documento, los anticuerpos monoclonales anti-toxina A de *C. difficile* y anti-toxina B de *C. difficile* humanizados de la invención, en particular las formas humanizadas de estos anticuerpos monoclonales, muestran características aumentadas de neutralización anti-toxina en comparación con las de otros anticuerpos anti-toxina que se han informado.

En una realización, un anticuerpo anti-toxina A de la invención neutraliza o inhibe la toxicidad *in vivo* de la toxina A de *C. difficile* a una dosis efectiva. En otra realización, los anticuerpos anti-toxina B neutralizan o inhiben la toxicidad *in vivo* de la toxina B. En una realización, se proporciona una dosis efectiva de uno o más anticuerpos anti-toxina A de la invención a un sujeto infectado con *C. difficile*. En una realización, se proporciona una dosis efectiva de uno o más anticuerpos anti-toxina A de la invención en combinación con una dosis efectiva de uno o más anticuerpos anti-toxina B de la invención a un sujeto infectado con *C. difficile*. En una realización, un anticuerpo anti-toxina A de la invención en una combinación 1:1 con un anticuerpo anti-toxina B de la invención se proporciona como una dosis eficaz a un sujeto infectado con *C. difficile*. En una realización, una dosis eficaz de un anticuerpo anti-toxina A y un anticuerpo anti-toxina B de la invención puede ser, por ejemplo, una combinación 1/2:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, etc., de los anticuerpos proporcionados a un sujeto infectado con *C. difficile*. En una realización, los anticuerpos son humanizados. En una realización, los anticuerpos están incluidos en una composición. De manera ilustrativa, una dosis efectiva de los anticuerpos anti-toxina A y/o anti-toxina B puede variar de 0,1 µg a 1000 miligramos (mg). Los anticuerpos anti-toxina A y los anticuerpos anti-toxina B o sus fragmentos de unión a antígeno pueden administrarse a un sujeto en una cantidad de, por ejemplo, 0,1 mg/kg -150 mg/kg; en una cantidad de 0,5 mg/kg -75 mg/kg; en una cantidad de 1 mg/kg-100 mg/kg; en una cantidad de 1 mg/kg -50 mg/kg; en una cantidad de 2 mg/kg -40 mg/kg; en una cantidad de 2 mg/kg-50 mg/kg; en una cantidad de 5 mg/kg -50 mg/kg; en una cantidad de 5 mg/kg -25 mg/kg; en una cantidad de 10 mg/kg -40 mg/kg; en una cantidad de 10 mg/kg -50 mg/kg; en una cantidad de 10 mg/kg -25 mg/kg; o en una cantidad de 15 mg/kg -50 mg/kg. En una realización, las cantidades mencionadas anteriormente pueden comprender las proporciones variables de anticuerpo anti-toxina A y anticuerpo anti-toxina B proporcionadas en combinación.

Como se usa en el presente documento, "neutralizar" se refiere a la reducción, inhibición, bloqueo, mejora o eliminación del efecto o efectos adversos de la toxina o toxinas a los que se unen específicamente el anticuerpo o anticuerpos. La neutralización del efecto o efectos adversos de la toxina o toxinas incluye 1) retrasar, reducir, inhibir o prevenir la aparición o progresión de la infección por *C. difficile* o diarrea o enfermedad asociada a *C. difficile*, 2) aumentar la supervivencia de un sujeto en comparación con la supervivencia media de sujetos que no han sido tratados con el anticuerpo o anticuerpos y que tienen una infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*, 3) eliminación de uno o más síntomas o efectos adversos o reducción de la gravedad de uno o más síntomas o efectos adversos asociados con la infección por *C. difficile* o la diarrea o enfermedad asociada a *C. difficile*, 4) permitir la repoblación de la microflora normal del tracto gastrointestinal de sujetos que están o han sido infectados con *C. difficile*, 5) prevenir la recurrencia de la infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile* en sujetos que han sido afectados por infección con *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*, 6) efectuar una tasa de curación de al menos 50% 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% en sujetos que tienen infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*, y/o 7) prevenir la muerte debido a CDAD u otros eventos adversos asociados con la infección por *C. difficile*.

Los anticuerpos anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* de la invención se pueden usar para tratar una serie de especies de sujetos, incluyendo el hombre (humanos) y otros animales no humanos (mamíferos). Los sujetos tratables de acuerdo con la invención incluyen seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, vacas, cabras, ovejas, cerdos, caballos y similares. Los sujetos humanos también pueden denominarse pacientes o individuos en este documento. En particular, los sujetos incluyen un paciente humano que tiene una infección por *C. difficile* o una enfermedad asociada a *C. difficile*. Tales pacientes humanos incluyen aquellos que son ancianos o inmunocomprometidos.

De acuerdo con la invención, los anticuerpos anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* pueden resolver la enfermedad por *C. difficile* y aumentar la supervivencia de un sujeto. En una realización, uno o más anticuerpos anti-toxina A y/o uno o más anticuerpos anti-toxina B, cuando se administran a un sujeto, mejora o mejoran la supervivencia del sujeto en comparación con la supervivencia media de los sujetos que no han sido tratados con el anticuerpo o anticuerpos y que tienen infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*.

En algunas realizaciones, la dosis o cantidad de uno o más anticuerpos anti-toxina A o anti-toxina B puede variar, por ejemplo, de 0,2 µg a 250 µg, o de 2 µg -50, µg o de 5 µg - 50 µg, por ejemplo, con base en estudios de ratones *in vivo*. En algunas realizaciones, la dosis o cantidad de uno o más anticuerpos anti-toxina A o anti-toxina B, y en particular una combinación de un anticuerpo anti-toxina A y un anticuerpo anti-toxina B, pueden variar, por ejemplo, de 2 mg./kg -40 mg/kg, 2 mg/kg -50 mg/kg, 5 mg/kg -40 mg/kg, 5 mg/kg -50 mg/kg, 10 mg/kg -40 mg/kg, o 10 mg/kg -50 mg/kg, por ejemplo, con base en estudios de hámsteres *in vivo*.

Como otro ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden efectuar una cura o tasa de supervivencia de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99%. Como otro ejemplo, los anticuerpos pueden lograr una cura o tasa de supervivencia del 100%. En una realización, uno o más anticuerpos anti-toxina A, cuando se administran a un sujeto, junto con uno o más anticuerpos anti-toxina B, producen una tasa de curación o supervivencia del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%. Como se usa en el presente documento, "tasa de curación" se refiere al porcentaje de sujetos que un médico determinaría que ya no tiene la infección o enfermedad de una población de sujetos con la infección o enfermedad a los que se les administró uno o más anticuerpos, o una o más composiciones de los mismos, de la invención. "Tasa de supervivencia", como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de sujetos que sobreviven durante un período de tiempo deseado entre una población de sujetos a los que se les administró uno o más anticuerpos, o una o más composiciones de los mismos, de la invención. Ejemplos de tales períodos de tiempo deseados se proporcionan en otra parte del presente documento.

Los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B proporcionados por la invención pueden permitir la restauración de la flora intestinal normal en un sujeto infectado con *C. difficile*. De esta manera, dichos anticuerpos pueden resolver la enfermedad en pacientes sometidos a tratamiento. Los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B de la invención también pueden demostrar una farmacocinética beneficiosa *in vivo*. Los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B de la invención también pueden proporcionar terapia prolongada o duradera para un sujeto que ha sido infectado con *C. difficile*. Como se usa en el presente documento, "de larga duración" se refiere a la terapia que da como resultado una ausencia de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile* un mes o más después de la interrupción del tratamiento. Preferiblemente, la terapia da como resultado una ausencia de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile* durante dos o más meses. En algunas realizaciones, la terapia con los mAb de la invención da como resultado el tratamiento o la depresión de la infección activa por *C. difficile* y la reducción o disminución de la robustez de la infección. En otras realizaciones, la terapia proporcionada por la invención da como resultado una ausencia de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile* en un sujeto durante 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En otras realizaciones, la terapia proporcionada por la invención da como resultado una ausencia de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile* en un sujeto durante más de 6 meses. Los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B de la invención pueden prevenir la recurrencia de infección por *C. difficile* y/o enfermedad asociada a *C. difficile*.

La naturaleza recurrente de CDAD se ve exacerbada por la aparición de cepas BI/NAP1/027 hipervirulentas que se ha encontrado que son resistentes a dos de los antibióticos más nuevos de último recurso, levofloxacina y moxifloxacina. Dichas cepas han desencadenado brotes de frecuencia creciente en los Estados Unidos, Canadá y Europa occidental. Las cepas hipervirulentas comprenden un grupo de aislados estrechamente relacionados caracterizados como campo pulsado norteamericano tipo 1 (NAP1), análisis de enzimas de restricción tipo "BI" y Ribotipo 027 por PCR conocidos colectivamente como BI/NAP1/027 (5). La hipervirulencia de las cepas BI/NAP1/027 se ha atribuido al menos en parte al aumento de la producción de toxinas A y B, dos factores virulentos de CDAD (6). Los aislados de BI/NAP1/027 producen niveles de toxinas A y B 16-23 veces mayores que otras cepas (6). La aparente aptitud de estas cepas crea la amenaza de propagación mundial que compromete el potencial del tratamiento con antibióticos para otras enfermedades, además de aumentar las tasas de recurrencia y la gravedad de la CDAD. Aunque se están desarrollando antibióticos para el tratamiento de la CDAD, tal como la nitazoxanida, la rifaximina, ramoplanina y la fidaxomicina, se han informado aislados clínicos de *C. difficile* que son resistentes a la rifaximina. En un ensayo de fase 3 recientemente completado (91), la fidaxomicina redujo significativamente la tasa general de recurrencia de CDAD en comparación con la vancomicina, pero no para las cepas BI/NAP1/027. Los brotes de cepas BI/NAP1/027 hipervirulentas han provocado aumentos en la permanencia en los hospitales, fracasos del tratamiento, frecuencias de recaídas y tasas de mortalidad (3). Los nuevos mAb desarrollados y descritos en este documento proporcionan nuevas terapias para combatir la creciente incidencia y gravedad de la CDAD.

En una realización, los mAb de la invención se emplean en el tratamiento de infección causada por diversas cepas de *C. difficile*. En una realización, las cepas de *C. difficile* son altamente infecciosas y sus toxinas son neutralizadas por los mAb de la invención. En una realización, las toxinas de las cepas hipervirulentas de *C. difficile*, que incluyen BI/NAP1/027, son neutralizadas por los mAb de la invención. En una realización, los mAb de la invención proporcionan efectos terapéuticos en la neutralización de toxinas de una amplia gama de aislados clínicos toxigénicos, incluidas cepas de pacientes externos. Preferiblemente, los mAb neutralizan las toxinas de los aislados hipervirulentos, tales como BI/NAP1/027, y al menos el 90% o más de otros aislados clínicamente relevantes de *C. difficile*. En particular y como se ilustra en el Ejemplo 8 de la presente invención, se ha demostrado que los mAb de la invención neutralizan significativamente la toxicidad/actividad de diecinueve aislados clínicos diferentes de *C. difficile*, incluyendo BI/NAP1/027 y otras cepas hipervirulentas de *C. difficile*, por ejemplo, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, Montreal 5 y Montreal 7.1. De acuerdo con la invención, se proporcionan anticuerpos que neutralizan la toxina A y la toxina B de

5 cepas hipervirulentas de *C. difficile*, por ejemplo, sin limitación, de acuerdo con lo determinado por un valor de EC₅₀ que varía de 7,7⁻¹² M hasta 4,8⁻⁸ M para los mAb anti-toxina A y un valor de EC₅₀ que varía de 1,1⁻¹¹ M hasta 6,5⁻¹⁰ M para un mAb anti-toxina B. Además, los mAb de la invención se proporcionan para su uso en la neutralización de cepas hipervirulentas de *C. difficile*, incluidos los aislados derivados de hospitales y no hospitalarios, como tratamiento para la infección por *C. difficile* y enfermedades relacionadas con ellas.

10 En otras realizaciones y mediante ejemplos no limitantes, los mAb de la invención exhiben un valor de neutralización de EC₅₀ en el intervalo de 93 pM a 30 nM, o una EC₅₀ de 46 pM, para neutralizar la toxina A y un valor de EC₅₀ en el intervalo de 4 pM-9,5 pM, o un valor de EC₅₀ de 5 pM, para neutralizar la toxina B dependiendo del ensayo con base en células *in vitro* empleado. Como se describe en el Ejemplo 3 del presente documento, en un ensayo que comprende células CHO-K1 en las que se usaron 8 µg/mL de toxina A, los mAb anti-toxina A de la invención exhibieron un valor de EC₅₀ de 93 pM. En un ensayo que comprende células CHO-K1 en las que se usaron 8 pg/mL de toxina B, el mAb anti-toxina B de la invención exhibió un valor de EC₅₀ de 9,2 pM. En un ensayo que comprende células T-84 en las que se usaron 240 ng/mL de toxina A, los mAb anti-toxina A de la invención exhibieron valores de EC₅₀ de 146 pM y 175 pM. En un ensayo basado en células Caco-2, los mAb anti-toxina A de la invención neutralizaron la toxicidad de la toxina A a niveles de EC₅₀ de 196 pM y 485 pM. En el ensayo de hemaglutinación de glóbulos rojos en el que se usaron 8 µg/mL de toxina A, los mAb anti-toxina A de la invención tenían un valor de neutralización de EC₅₀ de 1,8 nM y 30 nM para prevenir la hemaglutinación de RBC.

20 Los anticuerpos de la invención pueden tener cualquiera de, una combinación de, o todas, las características mencionadas anteriormente.

25 Como se describe en los Ejemplos de la presente invención, los mAb de la invención demuestran una potencia neutralizante de toxinas superior tanto *in vitro* como *in vivo* en los mejores modelos preclínicos disponibles de CDAD. Además, los mAb de la invención demuestran una neutralización excepcionalmente amplia y potente de toxinas de numerosas cepas BI/NAP1/027. Además, estos mAb han demostrado una protección completa y duradera contra la mortalidad en un modelo de CDAD de hámster altamente estricto. Estos resultados apoyan la capacidad de los mAb de la invención para bloquear de manera eficiente y efectiva los efectos patogénicos de las toxinas de *C. difficile* de una manera que permita que el colon sane, la microflora intestinal normal se restablezca y la enfermedad CDAD y/o infección por *C. difficile* se resuelva.

35 En una realización, los anticuerpos contra la toxina A incluyen aquellos que inhiben de forma competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión específica a la toxina A de *C. difficile* de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo los números de acceso de la ATCC PTA-9692, PTA-9694 o PTA-9888. Los anticuerpos preferidos contra la toxina B incluyen aquellos que inhiben de forma competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión específica a la toxina B de *C. difficile* de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 o PTA-9692. En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen aquellos que inhiben de forma competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión específica a la toxina A de *C. difficile* de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9692, PTA-9694, o PTA-9888, e inhiben de forma competitiva, o compiten de forma cruzada, por la unión específica a la toxina B de *C. difficile* de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 o PTA-9692. Todas las realizaciones abarcan además formas humanizadas de los anticuerpos descritos anteriormente con los números de acceso de la ATCC PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888 o PTA-9693.

45 Para determinar la inhibición competitiva, o la competencia cruzada de unión, se pueden emplear una variedad de ensayos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, los ensayos de competencia cruzada se pueden usar para determinar si un anticuerpo inhibe competitivamente la unión a la toxina A y/o la toxina B por otro anticuerpo. Dichos métodos pueden ser métodos basados en células que emplean citometría de flujo o análisis de unión en fase sólida. También se pueden utilizar otros ensayos que evalúan la capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada cruza por la unión a la toxina A y/o la toxina B en fase sólida o en fase de solución. Los ejemplos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluidos en la invención incluyen aquellos que inhiben competitivamente la unión específica en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 %, 95% o 99%. La inhibición se puede evaluar a varias relaciones molares o relaciones de masa; por ejemplo, se pueden realizar experimentos de unión competitiva con un exceso molar de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces, 10 veces o más del primer anticuerpo sobre el segundo anticuerpo.

60 Otros anticuerpos abarcados por la invención incluyen aquellos que se unen específicamente a un epítipo en la toxina A de *C. difficile* definida por la unión de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9692, PTA-9694 o PTA-9888. Todavía otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno abarcados por la invención incluyen aquellos que se unen específicamente a un epítipo en la toxina B de *C. difficile* definido por la unión de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 o PTA-9692. Aún otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno abarcados por la invención incluyen aquellos que se unen específicamente a un epítipo en la toxina A de *C. difficile* definido por la unión de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9692, PTA-9694 o PTA-9888 y se unen

específicamente a un epítipo en la toxina B de *C. difficile* definido por la unión de un anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 o PTA- 9692.

Para determinar un epítipo, se pueden usar métodos de mapeo estándar de epítopos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos (péptidos) de la toxina (preferiblemente péptidos sintéticos) que se unen a un anticuerpo pueden usarse para determinar si un anticuerpo candidato o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo. Para epítopos lineales, se sintetizan péptidos superpuestos de una longitud definida (por ejemplo, 8 o más aminoácidos). Los péptidos preferiblemente se compensan con 1 aminoácido, de modo que se prepara una serie de péptidos que cubren cada fragmento de 8 aminoácidos de la secuencia de toxina. Se pueden preparar menos péptidos usando compensaciones más grandes, por ejemplo, 2 o 3 aminoácidos. Además, se pueden sintetizar péptidos más largos (por ejemplo, 9, 10 u 11 mers). La unión de péptidos a anticuerpos se puede determinar usando metodologías estándar que incluyen resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore) y ensayos de ELISA. Para el examen de epítopos conformacionales, pueden usarse los anticuerpos proporcionados en el presente documento, en algunas realizaciones, uniendo fragmentos de péptidos más grandes. Se han descrito y pueden usarse otros métodos que usan espectrometría de masas para definir epítopos conformacionales (véase, por ejemplo, Baerga-Ortiz et al., Protein Science 11: 1300-1308, 2002 y referencias citadas en el mismo). Aún se proporcionan otros métodos para la determinación de epítopos en trabajos de referencia de laboratorio estándar, tales como la Unidad 6.8 ("Phage Display Selection and Analysis of B-cell Epitopes") y la Unidad 9.8 ("Identification of Antigenic Determinants Using Synthetic Peptide Combinatorial Libraries") de Current Protocols in Immunology, Coligan et al., eds., John Wiley & Sons. Los epítopos se pueden confirmar introduciendo una o más mutaciones o supresiones puntuales en un epítipo conocido, y luego probando la unión con uno o más anticuerpos para determinar qué mutaciones reducen la unión de los anticuerpos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno proporcionados por la invención pueden unirse específicamente a la toxina A y/o la toxina B con afinidad sub-nanomolar. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden tener afinidades de unión de aproximadamente 1×10^{-9} M o menos, aproximadamente 1×10^{-10} M o menos, o aproximadamente 1×10^{-11} M o menos. En una realización particular, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 5×10^{-10} M.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden tener una constante de asociación ($K_{\text{asociación}}$) a la toxina A o la toxina B de al menos $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; o al menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, medido por resonancia de plasmón superficial. Los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno pueden tener una constante de disociación ($K_{\text{disociación}}$) de la toxina A o la toxina B de a lo sumo 10^{-3} s^{-1} ; a lo sumo 10^{-4} s^{-1} ; a lo sumo 10^{-5} s^{-1} ; o a lo sumo 10^{-6} s^{-1} , medido por resonancia de plasmón superficial. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden tener una constante de disociación (K_{D}) para la toxina A o la toxina B de a lo sumo 10^{-7} M; a lo sumo 10^{-8} M; a lo sumo 10^{-9} M; a lo sumo 10^{-10} M; a lo sumo 10^{-11} M; a lo sumo 10^{-12} M; o a lo sumo 10^{-13} M.

Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" incluyen glicoproteínas que comprenden al menos dos polipéptidos de cadena pesada (H) y dos polipéptidos de cadena ligera (L) interconectados por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o V_{H}) y una región constante de cadena pesada (C_{H}). La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_{L}) y una región constante de la cadena ligera (C_{L}). La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, C_{L} . Las regiones V_{H} y V_{L} se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_{H} y V_{L} está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Juntas, las regiones variables de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera contienen o forman un dominio de unión que interactúa con/se une a un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

La invención proporciona además otras formas de anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos o multiméricos, diacuerpos, etc., como se describe adicionalmente en el presente documento.

El término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo como se usa en el presente documento, se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, toxina A, toxina B, toxina A y toxina B, etc.) o a regiones epitópicas de un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. En una realización, los fragmentos de anticuerpo monoclonal funcionan de manera similar a los anticuerpos monoclonales homólogos intactos. En una realización, los fragmentos de anticuerpo monoclonal reaccionan de forma cruzada con los anticuerpos monoclonales homólogos intactos. En una realización, los fragmentos de anticuerpo monoclonal pueden usarse indistintamente con los anticuerpos monoclonales homólogos intactos. Los ejemplos de

fragmentos de unión incluidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546) que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véanse, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar incluidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando procedimientos convencionales, tales como los procedimientos de fragmentación proteolítica, como se describe en J. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 98-118 (NY Academic Press 1983), así como por otras técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. Los fragmentos se seleccionan en busca de actividad o utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

En una realización, los fragmentos Fab de mAb de la invención se generaron y probaron para determinar su actividad de neutralización en ensayos con base en células, como se describe en el Ejemplo 10 de la presente invención. Por lo tanto, los fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab, de los mAb de la invención también se pueden utilizar para unir y neutralizar la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la toxina A está sustancialmente libre de anticuerpos que específicamente se unen a antígenos distintos de la toxina A). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de la toxina A o la toxina B, generalmente tiene reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras cepas de *C. difficile*. Además, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de la toxina A también puede unirse específicamente a la toxina B, y un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de la toxina B también puede unirse específicamente a la toxina A. Sin embargo, en algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de la toxina A tampoco se une específicamente a la toxina B. En otras realizaciones más, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de toxina B tampoco se une específicamente a la toxina A. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. Los anticuerpos que están sustancialmente libres de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas, u otros materiales y/o productos químicos y/o proteínas pueden ser anticuerpos aislados y/o purificados. Los anticuerpos pueden purificarse mediante métodos comúnmente realizados por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de proteína A y similares. Como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado o afín. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. En una realización, un anticuerpo de la invención puede unirse a un epítipo lineal del antígeno objetivo, por ejemplo, toxina A y/o toxina B. En una realización, un anticuerpo de la invención puede unirse a un epítipo conformacional del antígeno objetivo, por ejemplo, toxina A y/o toxina B.

Los anticuerpos aislados de la invención abarcan diversos isotipos de cadena pesada y ligera de anticuerpo (inmunoglobulina), tales como las clases de cadena pesada o isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE, y subtipos de los mismos, por ejemplo, IgG2a, IgG2b; y los isotipos de cadena ligera κ y λ , y sus subtipos. En una realización, los anticuerpos aislados son del isotipo IgG2a o IgG1 κ . Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1 o $\lambda 1$) que está codificada por genes de la región constante de cadena pesada y ligera. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden ser de longitud completa o pueden incluir solo un fragmento de unión a antígeno, tal como el dominio constante y/o variable del anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, o IgE, o pueden consistir de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$ y un fragmento Fv.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser policlonales, monoclonales o una mezcla de anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos se pueden producir mediante una variedad de técnicas bien conocidas en el arte. Los procedimientos para generar anticuerpos policlonales son bien conocidos. Como un ejemplo no limitante, los anticuerpos policlonales se generan administrando proteína de la toxina A y/o la toxina B por vía subcutánea a conejos blancos de Nueva Zelanda que primero se han desangrado para obtener suero previamente inmune. La toxina A y/o la toxina B pueden inyectarse en un volumen total de 100 μ L por sitio en seis sitios diferentes, típicamente con uno o más adyuvantes. Los conejos se sangran dos semanas después de la primera inyección y se refuerzan periódicamente con el mismo antígeno tres veces cada seis semanas. Se recoge una muestra de suero 10 días después de cada refuerzo. Los anticuerpos policlonales se recuperan del suero, preferiblemente por cromatografía de afinidad usando la toxina A y/o la toxina B para capturar el anticuerpo. Este y otros procedimientos

para generar anticuerpos policlonales se describen en Harlow, E. y Lane, D., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

La producción de anticuerpos monoclonales se puede efectuar mediante técnicas que también son bien conocidas en el arte. El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad y afinidad de unión por un epítipo particular de un antígeno o inmunógeno dado. El proceso de producción de anticuerpos monoclonales implica la obtención de células somáticas inmunes con el potencial de producir anticuerpos, en particular linfocitos B, que han sido inmunizados previamente con el antígeno de interés, *in vivo* o *in vitro* o ambos, y que son adecuados para la fusión con una línea de mieloma de células B. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando células inmunes y células de mieloma de diferentes especies, tales como células de murino y humanas y líneas celulares, o por ejemplo, en cepas de ratones que han sido modificadas genéticamente para albergar un sistema inmunitario humano, tal como se describe más adelante.

Aunque los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la toxina A y la toxina B se han producido típicamente inmunizando animales con toxoides (formas inactivas de la toxina A y la toxina B) y/o con fragmentos inactivos de estas toxinas, se generaron mAb de la presente invención diseñando y empleando una nueva estrategia de inmunización. De acuerdo con la invención, los mAb descritos en el presente documento y depositados se produjeron inmunizando animales con toxoide, seguido de refuerzo de los animales con la forma activa (no toxoide) de toxina A y/o toxina B (véase el Ejemplo 1 en este documento). El refuerzo con la forma activa de la toxina A o la toxina B sirvió para identificar aquellos animales inmunizados que habían desarrollado anticuerpos protectores únicos en virtud del nuevo esquema de inmunización. Sin desear limitarse a la teoría, el régimen de refuerzo de la toxina A y/o la toxina B activas fue más altamente inmunogénico en los animales receptores. Los animales que toleraron el aumento de las dosis de refuerzo de la toxina A o la toxina B activas, que generalmente son letales para los animales no modificados, produjeron anticuerpos neutralizantes altamente efectivos, que protegieron a estos animales y contribuyeron a su supervivencia a pesar de haber recibido la toxina activa. La producción de hibridomas de los animales que montaron una respuesta inmune efectiva contra la toxina A o la toxina B produjo anticuerpos monoclonales anti-toxina A y anti-toxina B altamente potentes, que proporcionan un alto nivel de protección tanto *in vitro* como *in vivo*. En la producción de anticuerpos, incluidos los anticuerpos policlonales y monoclonales, se pueden emplear adyuvantes. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes que son adecuados para su uso incluyen adyuvante de Freund incompleto, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, Ribí (es decir, lípido A monofosforilado, dimicolato de trehalosa, esqueleto de pared celular de *Mycobacterium* y Tween® 80, con 2% de escualeno), saponinas, Quil A, o alumbre. Una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) puede prepararse mediante la conjugación de toxinas (o fragmentos, derivados inactivos o análogos de las mismas) a lípidos, tales como, por ejemplo, tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina.

En otras realizaciones, se pueden utilizar métodos de inmunización adicionales para generar anticuerpos monoclonales dirigidos contra la toxina A y/o la toxina B. Por ejemplo, la inmunización *in vivo* de animales (por ejemplo, ratones) se puede llevar a cabo con el tipo y la cantidad deseados de proteína o polipéptido, por ejemplo, toxoide o toxina. Dichas inmunizaciones se repiten según sea necesario a intervalos de hasta varias semanas para obtener un título suficiente de anticuerpos. Una vez inmunizados, los animales pueden usarse como fuente de linfocitos productores de anticuerpos. Después del último refuerzo de antígeno, los animales se sacrifican y se extraen las células del bazo. Los linfocitos de ratón producen un mayor porcentaje de fusiones estables con las líneas de mieloma de ratón descritas en este documento. De estas, la cepa de ratón BALB/c es adecuada. Sin embargo, otras cepas de ratón, conejo, hámster, oveja, cabra y rana también pueden usarse como huéspedes para preparar células productoras de anticuerpos. Véase, Goding (en *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, segunda edición., Páginas. 60-61, Orlando, Florida, Academic Press, 1986). En particular, se pueden usar cepas de ratón que tienen genes de inmunoglobulina humana insertados en el genoma (y que no pueden producir inmunoglobulinas de ratón). Los ejemplos incluyen las cepas de ratón HumAb producidas por Medarex (ahora Bristol Myers Squibb) /GenPharm International, y las cepas Xenomouse producidas por Abgenix. Dichos ratones producen moléculas de inmunoglobulina totalmente humanas en respuesta a la inmunización.

Las células productoras de anticuerpos que se encuentran en la etapa de plasmablastos en división se fusionan preferentemente. Las células somáticas se pueden obtener, por ejemplo, de los ganglios linfáticos, bazo y sangre periférica de animales cebados con antígeno, y las células linfáticas de elección dependen en gran medida de su utilidad empírica en el sistema de fusión particular. Los linfocitos secretores de anticuerpos se fusionan luego con células de mieloma de células B (de ratón) o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular, produciendo así una línea celular inmortal que secreta inmunoglobulinas. Las células fusionadas resultantes, o hibridomas, se cultivan, y las colonias resultantes se seleccionan para la producción de los anticuerpos monoclonales deseados. Las colonias que producen dichos anticuerpos se clonan, subclonan y crecen *in vivo* (tales como ascitis) o *in vitro* para producir grandes cantidades de anticuerpos. Se pueden encontrar descripciones de la metodología y tecnología del hibridoma en Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975) o Harlow, E. y Lane, D., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Como alternativa, las células somáticas humanas capaces de producir anticuerpos, específicamente linfocitos B, son adecuadas para la fusión con líneas celulares de mieloma. Si bien se pueden utilizar linfocitos B de bazo obtenidos a través de una biopsia, amígdalas o ganglios linfáticos de un individuo, se prefieren los linfocitos B de sangre periférica

(PBL) más fácilmente accesibles. Además, las células B humanas pueden ser inmortalizadas directamente por el virus de Epstein-Barr (Cole et al., 1995, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, tales como la transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Las líneas celulares de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión que producen hibridomas preferiblemente no producen anticuerpos, tienen una alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que los hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de los hibridomas deseados. Los ejemplos de tales líneas celulares de mieloma que pueden usarse para la producción de líneas celulares fusionadas incluyen P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4.1, Sp2/0-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul, derivadas de ratones; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210 derivados de ratas; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, derivadas de humanos (Goding, en Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., páginas 65-66, Orlando, Florida, Academic Press, 1986; Campbell, en Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden y Von Knippenberg, eds. Pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984).

La fusión con células de mieloma de mamífero u otros compañeros de fusión capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular se efectúa mediante técnicas estándar y bien conocidas, por ejemplo, usando polietilenglicol ("PEG") u otros agentes de fusión (véase Milstein y Kohler, Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976)).

En otras realizaciones, los anticuerpos pueden ser anticuerpos recombinantes. El término "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina de otras especies, anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos recombinante, combinatoria, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina u otras secuencias de ADN.

En aún otras realizaciones, los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que combina regiones variables o hipervariables de inmunoglobulina (Ig) murina con una región constante de Ig humana o regiones marco constantes y variables. En algunas realizaciones, el anticuerpo quimérico comprende la región variable de cualquiera de los anticuerpos depositados proporcionados en el presente documento y una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana es una región constante de IgG humana, tal como una región constante de IgG1 humana. Los anticuerpos quiméricos se pueden producir mediante el método proporcionado a continuación en los Ejemplos o mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que retiene sustancialmente solo las CDR de unión a antígeno del anticuerpo original, por ejemplo, anticuerpo monoclonal murino, en asociación con regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Waldmann, 1991, Science 252: 1657). Se espera que tales anticuerpos quiméricos o humanizados, que retienen la especificidad de unión del anticuerpo murino, pero que tienen regiones constantes/marco de Ig humana, tengan inmunogenicidad reducida cuando se administran *in vivo*. Por lo tanto, los anticuerpos quiméricos y humanizados retienen preferiblemente las actividades neutralizantes de toxinas de los anticuerpos monoclonales proporcionados y son adecuados para la dosificación repetida (por ejemplo, en humanos). Un experto habitual en la técnica puede usar métodos conocidos (por ejemplo, ensayos con base en células *in vitro*) para comparar la actividad de los anticuerpos humanizados con los anticuerpos monoclonales depositados proporcionados en este documento y para determinar si los anticuerpos humanizados tratan y/o previenen la recaída de una infección establecida por *C. difficile*. Un experto habitual en la técnica también puede usar los métodos descritos en este documento, incluido el modelo de hámster de infección por *C. difficile* que se describe a continuación.

Las secuencias de los mAb humanizados pueden diseñarse mediante el siguiente método ilustrativo, no limitante. Primero, se identifican los residuos de aminoácidos marco importantes para la estructura de la CDR. Paralelamente, las secuencias de V_H y V_L humanas que tienen una alta homología con las V_H y V_L murinas, respectivamente, se seleccionan entre las secuencias conocidas de inmunoglobulina humana (línea germinal). Las secuencias de CDR del mAb murino, junto con los residuos de aminoácidos marco importantes para mantener la estructura de las CDR, se injertan en las secuencias marco humanas seleccionadas. Además, los residuos de aminoácidos del marco humano que se encuentran atípicos en el subgrupo de la región V correspondiente se sustituyen con los residuos típicos para reducir la inmunogenicidad potencial del mAb humanizado resultante. Estas regiones V_H y V_L humanizadas se clonan en los vectores de expresión, por ejemplo, pCON Gamma y pCON kappa (Lonza Biologies, Berkshire, Reino Unido), respectivamente. Estos vectores codifican la región o regiones constantes de los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Las células 293T pueden transfectarse transitoriamente con estos vectores de expresión usando el sistema Effectene (Qiagen, Valencia, CA). Los sobrenadantes celulares que contienen mAb quimérico secretado pueden recogerse después de la transfección, por ejemplo, después de tres días, y purificarse usando cromatografía de proteína A. Se pueden usar otros vectores de expresión y células huésped para producir de forma recombinante los anticuerpos descritos, tal como lo entienden los expertos en la materia.

Otros métodos para humanizar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos proporcionados en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno humanizados de acuerdo con los métodos proporcionados en estas patentes también se proporcionan en el presente documento.

5 En una realización, un mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* (hmAb) de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina, o un fragmento de la misma, que se compone de (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1 y una región CH humana, por ejemplo, una región C de IgG1, y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. En una realización, un mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina, o un fragmento de la misma, que está compuesta por (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2 y una región CH humana, por ejemplo, una región C, de IgG1 y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. En una realización, un mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina que está compuesta de (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1 y un región CH humana, por ejemplo, una región C de IgG1, y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. En una realización, un mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina que está compuesta de (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2 y un región CH humana, por ejemplo, una región C de IgG1, y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. Tales mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile* abarcan un mAb hPA-39 de la invención.

10 En una realización, un mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina que está compuesta de (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5 y un región CH humana, por ejemplo, una región C de IgG1, y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 7 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. En una realización, un mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina que está compuesta de (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 6 y un región CH humana, por ejemplo, una región C de IgG1, y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 7 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. Tales mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile* abarcan un mAb hPA-50 de la invención.

15 En una realización, un mAb humanizados anti-toxina B de *C. difficile* de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina que está compuesta de (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 8 y una región CH humana, por ejemplo, una región C de IgG1, y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. En una realización, un mAb humanizado anti-toxina B de *C. difficile* de la invención abarca una proteína de inmunoglobulina que está compuesta de (i) dos polipéptidos de cadena pesada (H), en donde cada cadena H contiene una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9 y un región CH humana, por ejemplo, una región C de IgG1, y (ii) dos polipéptidos de cadena ligera (L), en donde cada cadena L contiene una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 10 y una región CL humana, por ejemplo, una región C de cadena κ. Tales mAb humanizados anti-toxina B de *C. difficile* abarcan un mAb hPA-41 de la invención.

20 Las regiones C de cadena L y de cadena H de los anticuerpos humanizados de la invención descritos anteriormente pueden comprender la región C de la cadena L κ humana (C_L) y la región C de cadena H de IgG1 humana (C_H) que tienen secuencias contenidas en el GenBank acceso No NW_001838785 y en el GenBank acceso No. MW_001838121, respectivamente. En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados comprenden una región C de cadena H humana seleccionada de los isotipos IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgG4.

25 En una realización ilustrativa, la invención abarca un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo, generado contra la toxina A de *C. difficile*, en el que el anticuerpo está compuesto por dos polipéptidos de cadena pesada, cada cadena pesada que contiene una región VH y una región CH humana y dos polipéptidos de cadena ligera, cada cadena ligera contiene una región VL y una región CL humana. La secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la

secuencia de aminoácidos consecutiva del polipéptido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 se establece en la SEQ ID NO: 15, (Figura 38B); la secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos consecutiva del polipéptido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 se establece en la SEQ ID NO: 17 (Figura 38A).

5 En una realización ilustrativa, la invención abarca un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo, generado contra la toxina A de *C. difficile*, en el que el anticuerpo está compuesto por dos polipéptidos de cadena pesada, cada cadena pesada que contiene una región VH y una región CH humana y dos polipéptidos de cadena ligera, cada cadena ligera contiene una región VL y una región CL humana. La secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos consecutiva del polipéptido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 18 se establece en la SEQ ID NO: 19, (Figura 39B); la secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos consecutiva del polipéptido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 20 se establece en la SEQ ID NO: 21 (Figura 39A).

15 En una realización ilustrativa, la invención abarca un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo, generado contra la toxina B de *C. difficile*, en el que el anticuerpo está compuesto por dos polipéptidos de cadena pesada, cada cadena pesada que contiene una región VH y una región CH humana y dos polipéptidos de cadena ligera, cada cadena ligera contiene una región VL y una región CL humana. La secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos consecutiva del polipéptido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 22 se establece en la SEQ ID NO: 23 (Figura 40B); la secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos consecutiva del polipéptido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 24 se establece en la SEQ ID NO: 25 (Figura 40A).

20 La invención también abarca porciones o fragmentos de los anticuerpos humanizados anti-toxina A y anti-toxina B de *C. difficile* anteriormente descritos. Dichas porciones o fragmentos incluyen las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones V de los polipéptidos de la cadena H y L, como pueden determinar convencionalmente los expertos en la materia; fragmentos F(ab), fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fc, fragmentos Fd y similares. En una realización, porciones o fragmentos de los anticuerpos humanizados que contienen regiones V, o porciones funcionales de los mismos, se unirán óptimamente a la toxina respectiva y neutralizarán la actividad de la toxina. En una realización, tales porciones funcionales o fragmentos de los anticuerpos humanizados neutralizan óptimamente la actividad de la toxina a un nivel similar, si no mejor, que el del anticuerpo humanizado completo.

30 De acuerdo con la invención, se proporcionan mAb humanizados molecularmente clonados dirigidos contra las toxinas A o B de *C. difficile*. Tales mAb humanizados se aislaron y caracterizaron como se describe en el Ejemplo 9, secciones D y E a continuación. En una realización, la región constante de cadena ligera (CL) de cada uno de los anticuerpos humanizados es de la clase kappa (κ). En una realización, la región constante de cadena pesada (CH) de cada uno de los anticuerpos humanizados es del isotipo IgG1. En otras realizaciones, la región CH de los anticuerpos humanizados es del isotipo IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgA o IgM. Se encontró que los mAb humanizados que contienen regiones variables (V) únicas se unen y neutralizan la actividad de la toxina A o la toxina B de *C. difficile*. Las regiones VL y VH de los mAb humanizados pueden formar parte de una inmunoglobulina completa (Ig) o molécula de anticuerpo, o pueden usarse como porciones o fragmentos del anticuerpo, en particular, porciones o fragmentos que tienen actividad de unión y/o neutralización. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, F(ab)₂ y F(ab')₂ o F(ab')₂. Las realizaciones de la invención están dirigidas a mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile*, o fragmentos de los mismos, que tienen actividad contra la toxina A de *C. difficile*, en donde la región V de la cadena L se selecciona de uno o más de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 7. En una realización, la invención se dirige a las CDR, a saber, CDR1, CDR2 y/o CDR3, en las regiones VH y VL de los anticuerpos descritos. Las realizaciones de la invención están dirigidas a mAb humanizado anti-toxina B de *C. difficile*, o fragmentos de los mismos, que tienen actividad contra la toxina B de *C. difficile*, en donde la región V de la cadena L se establece en la SEQ ID NO: 10. Las realizaciones de la invención están dirigidas a los mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile*, o fragmentos de los mismos, que tienen actividad contra la toxina A de *C. difficile*, en donde la región V de la cadena H se selecciona de uno o más de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6. Las realizaciones de la invención están dirigidas a mAb humanizados anti-toxina B de *C. difficile*, o fragmentos de los mismos, que tienen actividad contra la toxina B de *C. difficile*, en donde la región V de la cadena H se selecciona de uno o más de la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En una realización, la invención se dirige a las CDR, a saber, CDR1, CDR2 y/o CDR3, en las regiones VH y VL de los anticuerpos descritos.

55 En otras realizaciones, la invención abarca ácidos nucleicos que codifican porciones de unión a antígeno, CDR o regiones variables (V) de los anticuerpos anti-toxina A y/o anti-toxina B de *C. difficile* de la invención. En diversas realizaciones, las porciones, CDR o regiones V se derivan de PA-38, PA-39, PA-41 o PA-50, o versiones humanizadas de las mismas, como se describe en el presente documento. En realizaciones adicionales, la invención abarca las secuencias de aminoácidos de las porciones de unión a antígeno, CDR o regiones V que están codificadas por los ácidos nucleicos respectivos.

60 De acuerdo con otra realización, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden modificar para que tengan la forma de un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo bifuncional, un anticuerpo multiespecífico o un anticuerpo heterofuncional. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de anticuerpos biespecíficos y heteroespecíficos y procedimientos para fabricar tales anticuerpos en varias publicaciones ilustrativas, por ejemplo, los documentos UA20090060910, WO2009/058383, WO2009/030734, WO2007/093630, USP 6.071.517, WO2008/024188,

UA20070071675, USP 7.442.778, USP 7.235.641, USP 5.932.448 y USP 5.292.668. El término "anticuerpo biespecífico" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes y que se une o interactúa con (a) la toxina A de *C. difficile* y (b) la toxina B de *C. difficile*. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende PA-39 o PA-50 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos y PA-41, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una forma quimérica o humanizada de PA-39 o PA-50, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos y PA-41, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Por consiguiente, un anticuerpo biespecífico que comprende PA-39 y PA-41, o formas quiméricas o humanizadas de los mismos, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, se uniría a la toxina A y a la toxina B de *C. difficile*. De manera similar, un anticuerpo biespecífico que comprende PA-50 y PA-41, o formas quiméricas o humanizadas de los mismos, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, se unirían tanto a la toxina A como a la toxina B de *C. difficile*. El término "anticuerpo multiespecífico" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido o complejo de proteína o péptido, que tenga más de dos especificidades de unión diferentes y que se una o interactúe con (a) la toxina A de *C. difficile*, (b) la toxina B de *C. difficile*, y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, la invención incluye, pero no se limita a, anticuerpos biespecíficos, trispecíficos, tetraespecíficos y otros anticuerpos multiespecíficos. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos se humanizan.

El término "anticuerpos biespecíficos" incluye además diacuerpos. Los diacuerpos proporcionan anticuerpos terapéuticos que tienen doble especificidad y que son capaces de atacar múltiples epítopos diferentes con una sola molécula. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena de polipéptidos, pero usan un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poijak, RJ, et al., (1994) Structure 2: 1121-1123). Las dos regiones de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico están químicamente unidas o son expresadas por una célula modificada genéticamente para producir el anticuerpo biespecífico. (Véase en general, Fanger et al., 1995 Drug News & Perspec. 8 (3): 133-137). En una realización, se puede administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo biespecífico a un sujeto con infección por *C. difficile* y/o una enfermedad asociada a *C. difficile*, y el anticuerpo biespecífico neutraliza la toxicidad de la toxina A y la toxina B en el sujeto.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos. El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones de Ig variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas (denominado en el presente documento "anticuerpos humanizados"). Los anticuerpos humanos dirigidos contra la toxina A y/o la toxina B pueden generarse usando ratones transgénicos genéticamente modificados y criados para expresar componentes del sistema inmune humano en lugar del sistema del ratón.

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos también pueden prepararse inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y las referencias citadas allí. Estos animales han sido modificados genéticamente de modo que exista una supresión funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican aún más para contener todo o una parte del locus del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana de tal manera que la inmunización de estos animales da como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (por ejemplo, ratones XenoMouse (Abgenix), HumAb (Medarex/GenPharm)), los anticuerpos monoclonales se preparan de acuerdo con la tecnología estándar de hibridoma. Estos anticuerpos monoclonales tienen secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) cuando se administran a humanos.

Los expertos en la materia apreciarán que en este documento también se proporcionan los ácidos nucleicos y polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. También se apreciará que en el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos y polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por lo tanto, la invención proporciona vectores y plásmidos modificados para contener y/o expresar ácidos nucleicos y polinucleótidos que codifican anticuerpos. Como se usa en el presente documento, una "región de codificación" se refiere a una región de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptidos; la región de codificación puede incluir una región que codifica una porción de una proteína que luego se escinde, tal como un péptido señal. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos pueden incluir secuencias que codifican o que son péptidos señal. La invención abarca cada una de estas secuencias con, o sin, la porción de la secuencia que codifica o es un péptido señal.

- Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden clonarse usando el siguiente método, así como otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Como ejemplo no limitativo, el ARN total se genera a partir de células de hibridoma, y el ADNc se transcribe inversamente usando un cebador oligo-dT. La RNasa H puede usarse para eliminar el ARN para producir ADNc monocatenario. La purificación de la columna de centrifugación se puede usar para eliminar nucleótidos libres. Luego, se puede agregar una cola de poli-dG en 3' con transferasa terminal. La amplificación por PCR se puede realizar usando un cebador oligo-dC más un cebador degenerado a la región constante. Aproximadamente, se pueden realizar 40 ciclos para una amplificación robusta de la cadena pesada. Se puede realizar entonces la secuenciación directa de los productos de PCR.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está codificado por una molécula de ácido nucleico que es altamente homóloga a las moléculas de ácido nucleico anteriores. La molécula de ácido nucleico homóloga puede comprender una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 90% idéntica a la secuencia de nucleótidos proporcionada en este documento. La molécula de ácido nucleico homóloga puede comprender una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 95% idéntica, al menos aproximadamente 97% idéntica, al menos aproximadamente 98% idéntica o al menos aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos proporcionada en este documento. La homología se puede calcular utilizando varias herramientas de software disponibles públicamente, bien conocidas por un experto en la materia. Los ejemplos de herramientas incluyen el sistema BLAST disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) en los Institutos Nacionales de Salud.
- Un método para identificar secuencias de nucleótidos altamente homólogas es mediante hibridación de ácido nucleico. También se proporcionan en el presente documento anticuerpos que tienen las propiedades de unión a toxina A y/o toxina B y otras propiedades funcionales descritas en este documento, que están codificadas por moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones de alta rigurosidad con las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. La identificación de secuencias relacionadas también se puede lograr usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas de amplificación adecuadas para la clonación de secuencias de ácido nucleico relacionadas. Para tales técnicas, los cebadores de PCR se seleccionan típicamente para amplificar porciones de una secuencia de ácido nucleico de interés, tal como una CDR.
- El término "condiciones de alta rigurosidad" como se usa en el presente documento se refiere a parámetros con los que la técnica está familiarizada. Los parámetros de hibridación de ácido nucleico se pueden encontrar en referencias que compilan dichos métodos, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., Eds., segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Un ejemplo no limitante de condiciones de alta rigurosidad es la hibridación a 65 °C en tampón de hibridación (3,5X SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, Albúmina sérica bovina al 0,02%, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM) SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,015 M, pH 7; SDS es dodecil sulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminotetraacético. Después de la hibridación, se lava una membrana sobre la cual se transfiere el ácido nucleico, por ejemplo, en 2X SSC a temperatura ambiente y luego a 0,1 - 0,5X SSC/0,1X SDS a temperaturas de hasta 68 °C.
- En el presente documento se proporcionan vectores (por ejemplo, vectores de expresión) o plásmidos que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas, además de otras secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, ORI, promotor, potenciador, secuencias de terminación, requeridas para la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos. Los vectores se pueden usar para transformar o transfectar células huésped para producir los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con la especificidad de unión y/o características de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. En una realización, los vectores pueden comprender una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de la misma de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno proporcionados. En otra realización, los vectores pueden comprender las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera o una porción de la misma. En una realización adicional, los vectores de la invención pueden comprender una secuencia para una cadena pesada o una porción de la misma y una secuencia de una cadena ligera o una porción de la misma. En una realización adicional, se proporcionan plásmidos que producen los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento.
- Se proporcionan también versiones modificadas de los anticuerpos de la invención. Las modificaciones a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se realizan típicamente en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y pueden incluir supresiones, mutaciones puntuales, truncamientos, sustituciones de aminoácidos y adiciones de aminoácidos o fracciones que no son aminoácidos. Alternativamente, se pueden hacer modificaciones directamente al polipéptido, tal como por escisión, adición de una molécula enlazadora, adición de una fracción detectable, tal como biotina, adición de un ácido graso y similares. Las modificaciones también abarcan proteínas de fusión que comprenden todo o parte del anticuerpo o la secuencia de aminoácidos del fragmento de unión al antígeno. Las modificaciones incluyen además el acoplamiento o la unión del anticuerpo a otro agente, tal como un agente citotóxico, fármaco o terapéutico.
- Los polipéptidos modificados incluyen polipéptidos que se modifican específicamente para alterar una característica del polipéptido no relacionada con su actividad fisiológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden sustituirse o

eliminarse para evitar enlaces disulfuro no deseados. De manera similar, ciertos aminoácidos se pueden cambiar para mejorar la expresión de un polipéptido eliminando la proteólisis por proteasas en un sistema de expresión (por ejemplo, residuos de aminoácidos dibásicos en sistemas de expresión de levadura en los que está presente la actividad de la proteasa KEX2). Además, se pueden cambiar uno o más aminoácidos, particularmente en la región constante de Ig, para evitar la degradación proteolítica del anticuerpo por enzimas que siguen ciertas vías de administración, por ejemplo, administración oral, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/071877, publicado el 6 de julio de 2006.

Las modificaciones se preparan convenientemente alterando una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Las mutaciones de un ácido nucleico que codifica un polipéptido conservan preferiblemente el marco de lectura de aminoácidos de la secuencia de codificación, y preferiblemente no crean regiones en el ácido nucleico que puedan hibridarse para formar estructuras secundarias, tales como horquillas o bucles, que pueden ser perjudiciales para la expresión del polipéptido modificado.

Se pueden realizar modificaciones en cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos seleccionando una sustitución de aminoácidos, o mediante mutagénesis aleatoria de un sitio seleccionado en un ácido nucleico que codifica el polipéptido. Los polipéptidos modificados pueden entonces expresarse y probarse para una o más actividades para determinar qué mutación proporciona un polipéptido modificado con las propiedades deseadas. Se pueden realizar mutaciones adicionales en polipéptidos modificados (o en polipéptidos no modificados) que no mencionan la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que proporcionan codones preferidos para la traducción en un huésped particular. Los codones preferidos para la traducción de un ácido nucleico en, por ejemplo, *E. coli*, son bien conocidos por los expertos en la materia. Todavía se pueden hacer otras mutaciones en las secuencias no codificantes de una secuencia o clon de ADNc para mejorar la expresión del polipéptido. La actividad de los polipéptidos modificados se puede probar clonando el gen que codifica el polipéptido modificado en un vector de expresión, introduciendo el vector en una célula huésped apropiada, expresando el polipéptido modificado y probando la capacidad funcional de los polipéptidos como se describe en este documento. Los procedimientos anteriores son bien conocidos por un experto en la materia.

El experto en la materia también se dará cuenta de que se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos en polipéptidos para proporcionar polipéptidos funcionalmente equivalentes. Como se usa en el presente documento, una "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Los polipéptidos modificados se pueden preparar de acuerdo con métodos para alterar una secuencia de polipéptidos como es conocido por un experto en la técnica, tal como se puede encontrar en referencias que compilan dichos métodos, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., Eds., Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes ejemplos de grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos en polipéptidos típicamente se realizan mediante la alteración de un ácido nucleico que codifica un polipéptido. Dichas sustituciones pueden realizarse mediante una variedad de métodos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar por mutación dirigida por PCR, mutagénesis dirigida al sitio o por síntesis química de un gen que codifica un polipéptido. Cuando las sustituciones de aminoácidos se realizan a un pequeño fragmento de un polipéptido, las sustituciones se pueden realizar sintetizando directamente el péptido. La actividad de fragmentos funcionalmente equivalentes de polipéptidos se puede probar clonando el gen que codifica el polipéptido alterado en un vector de expresión bacteriano o de mamífero, introduciendo el vector en una célula huésped apropiada, expresando el polipéptido alterado y probando la capacidad funcional de los polipéptidos tal como se describe en este documento.

Un anticuerpo anti-toxina, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención puede derivarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Además, un anticuerpo o una porción de anticuerpo se puede unir funcionalmente, por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente, etc., a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo, un agente detectable, un agente citotóxico, un agente terapéutico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación con otra molécula, por ejemplo, una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina.

Una proteína o anticuerpo derivado se puede producir mediante entrecruzamiento o el acoplamiento de dos o más proteínas o anticuerpos del mismo tipo o diferentes. Los agentes de entrecruzamiento o de acoplamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo), y disponibles comercialmente (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Un anticuerpo anti-toxina o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede conjugarse con otra entidad molecular, tal como un marcador. Los agentes o marcadores detectables con los que una proteína puede derivarse o marcarse incluyen compuestos fluorescentes, enzimas, grupos prostéticos (por ejemplo, estreptavidina/biotina y avidina/biotina), materiales quimioluminiscentes, materiales bioluminiscentes, entidades químicas y materiales radiactivos. Los

ejemplos de compuestos fluorescentes detectables incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina y ficoeritrina. Una proteína o anticuerpo también puede derivarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa, etc. Tales proteínas o anticuerpos derivados enzimáticamente se vuelven detectables tras la adición de un sustrato específico de la enzima para producir un producto de reacción detectable. Las proteínas derivadas con un grupo prostético, como la biotina, se pueden detectar por medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

Las proteínas y anticuerpos marcados pueden usarse como agentes o reactivos de diagnóstico y/o experimentales para aislar un antígeno conocido o predeterminado mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación, o para detectar un antígeno conocido o predeterminado para determinar niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para controlar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. En una realización, el antígeno a detectar puede ser una toxina en un lisado celular o en una muestra de paciente.

En una realización particular, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se usan en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos diferentes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, uno o más dirigidos contra la toxina A y uno o más dirigidos contra la toxina B, dos o más dirigidos contra la toxina A, o dos o más dirigidos contra la toxina B, etc.). Las combinaciones de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden combinarse en una terapia única (es decir, administrarse simultáneamente) para lograr un efecto terapéutico deseado. Alternativamente, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden administrarse por separado (es decir, en diferentes momentos). Se deduce, por lo tanto, que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden almacenarse juntos o por separado. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden almacenarse en un medio acuoso o como una forma liofilizada, que puede reconstituirse antes de su uso.

En otra realización, se proporcionan composiciones que comprenden uno o más anticuerpos aislados o un fragmento de unión a antígeno de los mismos. También se proporcionan composiciones que comprenden una combinación de uno o más de los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. También se proporcionan composiciones, cada una de las cuales contiene uno o más de los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, cuyas composiciones están destinadas a usarse en combinación. Dichas composiciones pueden incluir un portador, excipiente, vehículo o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable. El portador, excipiente, vehículo o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable se puede mezclar con el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En una realización, uno o más de sus anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la composición se unen específicamente a la toxina A de *C. difficile* y neutralizan sus efectos tóxicos, mientras que uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a la toxina B de *C. difficile* y neutralizan sus efectos tóxicos. En una realización, se humanizan uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina A de *C. difficile* y neutralizan sus efectos tóxicos y uno o más que se unen específicamente a la toxina B de *C. difficile* y neutralizan sus efectos tóxicos.

En una realización particular, la composición comprende una combinación de un anticuerpo anti-toxina A o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento y un anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento. En dicha composición, el anticuerpo anti-toxina A y el anticuerpo anti-toxina B pueden estar presentes en cantidades o proporciones iguales, por ejemplo, 1:1. Alternativamente, en dicha composición, el anticuerpo anti-toxina A y el anticuerpo anti-toxina B pueden estar presentes en diferentes cantidades o proporciones, tales como 1/2:1; 2:1; 3:1; 4:1, etc. En una realización, los anticuerpos de la composición se humanizan. En una realización, la composición comprende una combinación de mAb PTA-9888, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo, y mAb 9693, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo. En una realización, la composición comprende una combinación de mAb PTA-9694, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo, y mAb 9693, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo. En una realización, la composición comprende una combinación de cualquiera de los siguientes: mAb PTA-9692, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo y mAb 9693, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo; o mAb PTA-9888, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo y mAb 9692, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo; o mAb PTA-9694, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo y mAb 9692, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una forma humanizada del mismo.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se proporciona en el presente documento con al menos otra terapia convencional. Dichos agentes terapéuticos adicionales incluyen la terapéutica antibiótica y la terapéutica no antibiótica. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen la vacuna contra el toxoide de *C. difficile*, ampicilina/amoxicilina, vancomicina, metronidazol, fidaxomicina, linezolid, nitazoxanida, rifaximina,

ramoplanina, difimicina (también llamada PAR-101 u OPT-80), clindamicina, cefalosporinas (tales como cefalosporinas de segunda y tercera generación), fluoroquinolonas (tales como gatifloxacina o moxifloxacina), macrólidos (por ejemplo, eritromicina, claritromicina, azitromicina), penicilinas, aminoglicósidos, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclina, imipenem, y meropenem. Los agentes terapéuticos adicionales también incluyen antibióticos, agentes antibacterianos, bactericidas o bacteriostáticos. En una realización, el agente terapéutico adicional puede ser una molécula pequeña o un compuesto químico de bajo peso molecular, que se dirige a *C. difficile* y/o sus toxinas. En una realización, el agente terapéutico adicional es OPT-80. Los agentes terapéuticos no antibióticos incluyen tolevamer, un polímero aniónico de alto peso molecular que se une a las toxinas A y B a través de mecanismos de carga no específicos.

Como alternativa, se prevé que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se puedan usar en combinación con otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Otros agentes terapéuticos adicionales incluyen inmunoglobulina agrupada normal, inmunoglobulina intravenosa o inmunoglobulinas policlonales anti-toxina A y anti-toxina B en sueros. Otros anticuerpos incluyen mAb humanos dirigidos contra la toxina A o la toxina B de *C. difficile*, como se describe y se informa en la literatura publicada (por ejemplo, los documentos WO/2006/121422; US2005/0287150).

También se incluye en el presente documento, un método que implica el uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención para el tratamiento o la profilaxis, es decir, para tratar, resolver, mejorar, erradicar, prevenir o retrasar la infección por *C. difficile* o una enfermedad asociada con *C. difficile*, patología, o desarrollo o progresión de la misma. La CDAD generalmente se precipita por la alteración de la flora del colon a través del uso de antibióticos como clindamicina, cefalosporinas y fluoroquinolonas. Esta perturbación en el microambiente del colon, junto con la exposición a las esporas de *C. difficile*, conduce a la colonización en individuos afectados. Aproximadamente un tercio de todos los pacientes que se colonizan desarrollan CDAD, lo que puede provocar diarrea severa, perforación del colon, colectomía y muerte. Por lo tanto, se proporcionan métodos mediante los cuales a un sujeto se le administran uno o más anticuerpos de la invención, o una composición como se describe en el presente documento para tratar la infección por *C. difficile* o CDAD.

Como se usa en el presente documento, "tratar" se refiere a cualquier beneficio para un sujeto con infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile* conferida mediante la administración de los anticuerpos o una composición o combinación de composiciones proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo y sin limitación, tal beneficio puede ser la eliminación de uno o más síntomas o efectos adversos, o una reducción o mejora de la gravedad de uno o más síntomas o efectos adversos que resultan de la infección o enfermedad; un retraso, detención o reversión en la progresión de la infección o enfermedad; una recolonización, resurgimiento o repoblación de la microflora normal y natural del tracto gastrointestinal, colon, intestino, etc., o la cura de la infección o enfermedad (es decir, un médico evaluaría al sujeto y determinaría que el sujeto ya no tiene la infección o enfermedad). Los síntomas o efectos adversos asociados con la infección por *C. difficile* incluyen deshidratación, diarrea, calambres, insuficiencia renal, perforación intestinal, megacolon tóxico, que puede provocar la ruptura del colon y la muerte. Las composiciones proporcionadas pueden usarse para reducir, disminuir, mejorar o eliminar cualquiera o todos los síntomas o efectos adversos proporcionados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, una "infección por *C. difficile*" se refiere a una infección que resulta de la presencia de *C. difficile* en la flora intestinal donde no estaba previamente presente o un cambio en la presencia de *C. difficile* en la flora intestinal (por ejemplo, un aumento en la cantidad total de *C. difficile* en relación con una o más bacterias, etc.), lo que da lugar o puede dar lugar a efectos adversos y/o un aumento en el nivel de toxinas A y/o B en el intestino u otros órganos y tejidos que comprenden el tracto gastrointestinal. Típicamente, CDAD resulta de la adquisición y proliferación de *C. difficile* en el intestino. *In vivo*, las toxinas A y B demuestran diferentes perfiles patológicos con sinergia potencial para causar la enfermedad. En conejos y ratones, por ejemplo, la toxina A es una enterotoxina que induce diarrea, mientras que la toxina B no provoca una respuesta fluida en esta especie. Sin embargo, la toxina B es citotóxica en forma más potente *in vitro*. Se han reportado cada vez más cepas negativas para la toxina A, y positivas para la toxina B (A- B+) de *C. difficile*. Las cepas A-/B+ no producen la toxina A debido a la eliminación del dominio repetitivo del gen *tcdA*, pero aún son capaces de causar enfermedad clínica. Por el contrario, hasta la fecha no hay informes de cepas positivas para toxina A, negativas para toxina B (A+/B-) en humanos.

La infección por *C. difficile* se manifiesta comúnmente como diarrea leve a moderada, ocasionalmente con calambres abdominales. En ocasiones se observan pseudomembranas, que son placas adherentes de color blanco amarillento en la mucosa intestinal. En casos raros, los pacientes con infección por *C. difficile* pueden presentar un abdomen agudo y una colitis fulminante potencialmente mortal, que resulta de una interrupción de la flora bacteriana normal del colon, la colonización con *C. difficile* y la liberación de toxinas que causan inflamación y daño de la mucosa. La terapia con antibióticos es el factor clave que altera la flora del colon. Mientras que la flora intestinal normal resiste la colonización y el crecimiento excesivo de *C. difficile*, el uso de antibióticos, que suprime la flora normal, permite que proliferen las bacterias *C. difficile*. *C. difficile* está presente en el 2-3% de los adultos sanos y en el 70% de los bebés sanos. En uno de sus aspectos, los mAb de la presente invención se utilizan para el tratamiento de sujetos que son asintomáticos, pero que son susceptibles o están en riesgo de contraer la infección por *C. difficile* y ser afectados por sus enfermedades asociadas. Dichos sujetos pueden ser hospitalizados o pueden estar fuera de un entorno hospitalario.

El principal factor de riesgo para la enfermedad relacionada con *C. difficile* es la exposición previa a antibióticos. Los antibióticos más comunes implicados en la colitis por *C. difficile* incluyen cefalosporinas (especialmente de segunda y tercera generación), ampicilina/amoxicilina y clindamicina. Los antibióticos menos comúnmente implicados son los macrólidos (es decir, eritromicina, claritromicina, azitromicina) y otras penicilinas. Los compuestos u otros agentes que ocasionalmente se informa que causan la enfermedad incluyen aminoglicósidos, fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol, metronidazol, cloranfenicol, tetraciclina, imipenem y meropenem. Incluso una breve exposición a cualquier antibiótico puede causar colitis por *C. difficile*, particularmente si la flora intestinal normal se ve afectada negativamente o muere. Un curso prolongado de antibióticos, o el uso de dos o más antibióticos, aumenta el riesgo de enfermedad. Se ha demostrado que los antibióticos utilizados tradicionalmente para tratar la colitis por *C. difficile* causan enfermedades. Otros factores de riesgo asociados con la infección por *C. difficile* incluyen edad avanzada (> 65 años); sistema inmunitario debilitado; hospitalización reciente (particularmente compartir una habitación de hospital con un paciente infectado, estadías en unidades de cuidados intensivos y estadías prolongadas en el hospital); vivir en un hogar de ancianos, hospicio u otro centro de atención a largo plazo; cirugía abdominal; enfermedad de colon crónica (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) o cáncer colorrectal); tomar antiácidos recetados o de venta libre que pueden reducir el ácido del estómago y permitir que *C. difficile* pase más fácilmente al intestino; y una infección previa por *C. difficile*. Otros factores asociados con la enfermedad de *C. difficile* incluyen agentes antineoplásicos, principalmente metotrexato, síndrome hemolítico-urémico, neoplasias, isquemia intestinal, insuficiencia renal, enterocolitis necrotizante, enfermedad de Hirschsprung, IBD y procedimientos gastrointestinales no quirúrgicos, incluidos los tubos nasogástricos. Los sujetos a los que se pueden administrar las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen cualquiera de los sujetos descritos que están en riesgo de infección por *C. difficile*.

Mientras que la mayoría de los pacientes con colitis por *C. difficile* se recuperan sin terapia específica, los síntomas pueden ser prolongados y debilitantes. La diarrea asociada a *C. difficile* puede ser una afección grave con una tasa de mortalidad de hasta el 25% en pacientes ancianos que son frágiles. Los informes que se centran en pacientes con enfermedades más graves indican tasas de mortalidad del 10-30%. La infección por *C. difficile* es más común en personas de edad avanzada, y la vejez puede promover la susceptibilidad a la colonización y la enfermedad. Mientras que los bebés y los niños pequeños con frecuencia albergan *C. difficile* y sus toxinas, la infección clínica es poco común. La infección cruzada por *C. difficile* es común en las unidades neonatales, pero los recién nacidos no parecen desarrollar diarrea asociada a *C. difficile*.

En el presente documento se proporcionan varios métodos que usan los anticuerpos humanizados de la invención y/o las composiciones proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, un método para tratar a un sujeto que tiene infección o enfermedad por *C. difficile*, exhibe cualquiera de los síntomas o los efectos adversos proporcionados en el presente documento, o tiene alguna de las enfermedades provistas en el presente documento. En una realización, el método reduce, disminuye o mejora la gravedad de la enfermedad asociada con la infección por *C. difficile* o la enfermedad asociada con *C. difficile* en un sujeto. Como otro ejemplo, se proporciona un método para tratar a un sujeto que padece diarrea asociada a *C. difficile*.

También se proporciona un método para neutralizar la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile* en un sujeto. Como ejemplo, se proporciona un método para neutralizar la toxina A y la toxina B sistémica combinada de *C. difficile*. En una realización, la toxina A y la toxina B sistémica combinada de *C. difficile* se neutralizan administrando tanto un anticuerpo anti-toxina A humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo como un anticuerpo anti-toxina B humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una composición que comprende estos anticuerpos. En otro aspecto, la toxina A y la toxina B sistémicas combinadas de *C. difficile* se neutralizan mediante la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina A y la toxina B, o una composición que comprende el anticuerpo (por ejemplo, en forma humanizada). En algunas realizaciones, los anticuerpos o composiciones humanizados se administran junto con otro agente terapéutico que se dirige a *C. difficile*.

Como otra realización, también se proporciona un método para restaurar la flora gastrointestinal normal en un sujeto infectado con *C. difficile*, para tratar eficazmente la infección causada por *C. difficile* y/o sus toxinas. Como otra realización más, también se proporciona un método para reducir la susceptibilidad de un sujeto a infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*. Como otra realización, se proporciona un método para prevenir la infección por *C. difficile* o la enfermedad asociada a *C. difficile* en un sujeto.

En los métodos mencionados anteriormente, al sujeto se le administra uno o más de los anticuerpos o las composiciones proporcionadas en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo dirigido contra la toxina A de *C. difficile* y una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno dirigido contra la toxina B de *C. difficile*). Las composiciones pueden administrarse al sujeto al mismo tiempo o en momentos diferentes. Las composiciones pueden administrarse al sujeto como una mezcla en una composición que comprende un portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente otro antibiótico, no antibiótico, fármaco o agente terapéutico eficaz contra *C. difficile* y/o sus enterotoxinas.

Un anticuerpo monoclonal humanizado anti-toxina A o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o un anticuerpo monoclonal anti-toxina B humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno del mismo, por separado o juntos, se pueden usar en cualquiera de los métodos descritos de acuerdo con la invención.

Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador fisiológicamente aceptable" incluye todas y cada una de las sales, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para administración oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico, fisiológicamente aceptable que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. Dichas preparaciones pueden contener habitualmente sales, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos, tales como agentes potenciadores inmunes suplementarios, que incluyen adyuvantes, quimioquinas y citoquinas. Cuando se usa en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención.

Una sal retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al., (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, acetato de etilendiamina (EDTA), con o sin un contraión, tal como sodio o calcio, procaína y similares.

Cualquiera de las composiciones de la invención puede combinarse, si se desea, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa uno o más rellenos, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para la administración en un ser humano. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden mezclarse con las moléculas de las composiciones proporcionadas, y entre sí, de tal manera que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tamponantes adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; y parabenos.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B de la invención, o porciones de los mismos, pueden proporcionarse de acuerdo con regímenes de dosificación que pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada, tal como una respuesta terapéutica o profiláctica, en un individuo particular. Ilustrativamente, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, como puede estar indicado por una situación terapéutica particular. Las composiciones parenterales pueden envasarse o prepararse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente discretas proporcionadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador, vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto

activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

5 Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa o no acuosa estéril, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación puede formularse de acuerdo con métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico pueden usarse en la preparación de inyectables. Las formulaciones de portador adecuadas para administración oral, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc. se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

15 Los componentes activos pueden prepararse con vehículos que protegerán los componentes contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

25 El anticuerpo y las composiciones de la invención como agentes terapéuticos pueden administrarse por cualquier vía convencional, incluyendo inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. La ruta de administración puede, como ejemplos no limitantes, ser oral, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intratecal, intracavitaria, retroorbital, vaginal, rectal, por inhalación, aspiración, dérmica, vía supositorio o transdérmica.

30 Los anticuerpos y las composiciones de la invención se administran en cantidades o dosis efectivas. Una "cantidad efectiva" es la cantidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o composición o composiciones como se proporciona en el presente documento que solo, o junto con dosis adicionales, u otro agente o agentes terapéuticos, producen la respuesta deseada, por ejemplo, trata, mejora, erradica, resuelve o previene la infección por *C. difficile*, diarrea o una enfermedad asociada a *C. difficile* en un sujeto. Esto puede implicar solo retrasar la progresión de la infección, diarrea o enfermedad durante un período sostenido, por ejemplo, más de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses o más de tres meses. Sin embargo, tales cantidades efectivas tratan o detienen de manera óptima la progresión de la infección, diarrea o enfermedad de forma permanente. Esto puede ser monitoreado por métodos rutinarios. La respuesta deseada al tratamiento de la enfermedad o afección también puede retrasar el inicio o incluso prevenir el inicio de la infección o enfermedad.

40 Las cantidades efectivas dependerán, por supuesto, de la infección o enfermedad particular que se esté tratando, la gravedad de la infección o enfermedad, los parámetros individuales del paciente que incluyen edad, estado físico, tamaño y peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), la ruta específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional de la salud. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden abordarse con nada más que pruebas de rutina o experimentación. Generalmente se prefiere que se use una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis más alta segura de acuerdo con un criterio médico sólido. Sin embargo, los expertos en la materia entenderán que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, psicológicas o prácticamente por cualquier otra razón.

50 Las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos anteriores son preferiblemente estériles y contienen una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno proporcionados en el presente documento para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente. La respuesta puede, por ejemplo, medirse determinando los efectos fisiológicos de la composición, tal como la disminución de los síntomas de la enfermedad. Los expertos en la técnica conocerán otros ensayos y pueden emplearse para medir el nivel de la respuesta.

60 Las dosis o cantidades de las composiciones administradas a un sujeto pueden elegirse de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con el modo de administración utilizado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período deseado de tratamiento. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o efectivamente dosis más altas por una ruta de administración diferente y más localizada) en la medida en que la tolerancia del paciente lo permita.

65 En general, las dosis o cantidades pueden variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100.000 µg/kg. Los ejemplos no limitantes de intervalos de dosis que constituyen una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo, porción de anticuerpo o composición de la invención incluyen 0,1 mg/kg-100 mg/kg; 0,1 mg/kg-60 mg/kg; de 0,5 mg/kg-75 mg/kg; 0,5 mg/kg-25 mg/kg; 0,75 mg/kg-40 mg/kg; 1 mg/kg-50 mg/kg; o 1 mg/kg-5 mg/kg. Se

apreciará que para cualquier individuo, paciente o sujeto en particular, las dosis específicas y los regímenes de dosificación deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el juicio del profesional calificado que administra o supervisa la administración de los anticuerpos y/o composiciones. Dichos intervalos de dosis son solo ejemplos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la invención. Según la composición, la dosis puede administrarse de forma continua, tal como mediante una bomba continua, o a intervalos periódicos. Los intervalos de tiempo deseados de múltiples dosis de una composición particular se pueden determinar sin una experimentación excesiva por parte de un experto en la materia. Los expertos en la técnica conocerán otros protocolos para la administración de las composiciones, en los que la cantidad de dosis, el programa de administración, los sitios de administración, el modo de administración y similares varían de lo anterior.

La administración de las composiciones a mamíferos que no sean humanos, por ejemplo, con fines de prueba o con fines terapéuticos veterinarios, se lleva a cabo sustancialmente en las mismas condiciones descritas anteriormente.

También se proporcionan en el presente documento kits que comprenden anticuerpos de la invención o composiciones que comprenden anticuerpos de la invención, e instrucciones de uso. Los kits pueden contener además al menos un reactivo adicional, tal como un agente terapéutico adicional, o uno o más anticuerpos adicionales o fragmentos de unión a antígeno como se proporciona en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a la toxina A cuando el primer anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el kit es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo contra la toxina B, y viceversa).

Los componentes de los kits pueden envasarse en medio acuoso o en forma liofilizada. Cuando los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se usan en los kits en forma de conjugados (por ejemplo, un conjugado de anticuerpos biespecíficos), los componentes de dichos conjugados pueden suministrarse en forma totalmente conjugada, en forma de compuestos intermedios o como fracciones separadas para ser conjugados por el usuario o el kit de acuerdo con las instrucciones de uso proporcionadas.

Un kit puede comprender un portador que está compartimentado para recibir en confinamiento cercano uno o más medios de contenedor, o una serie de medios de contenedor, tales como tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringas o similares. Un primer medio contenedor o serie de medios contenedores puede contener uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Un segundo medio contenedor o serie de medios contenedores puede contener uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en donde los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son diferentes de aquellos en el primer medio contenedor, o algún otro agente terapéutico adicional. Los kits proporcionados en el presente documento pueden incluir además un tercer contenedor que contiene una molécula para unir los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno contenidos en el primer y segundo contenedor.

Como se usa en este documento con respecto a polipéptidos, proteínas o fragmentos de los mismos, "aislado" significa separado de su entorno nativo y presente en cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Aislado, cuando se refiere a una proteína o polipéptido, significa, por ejemplo: (i) producido selectivamente por clonación de expresión o (ii) purificado tal como mediante cromatografía o electroforesis. Las proteínas o polipéptidos aislados pueden ser, pero no necesariamente, sustancialmente puros. El término "sustancialmente puro" significa que las proteínas o polipéptidos están esencialmente libres de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza, o de sistemas *in vivo* en un grado práctico y apropiado para su uso previsto. Los polipéptidos sustancialmente puros se pueden producir mediante técnicas bien conocidas en la materia. Debido a que una proteína aislada puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, la proteína puede comprender solo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, la proteína está aislada porque se ha separado de las sustancias con las que puede estar asociada de forma natural en los sistemas vivos, es decir, aislada de otras proteínas de origen natural.

También se proporcionan métodos para evaluar la eficacia de un agente candidato para el tratamiento de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*. Dichos métodos pueden comprender las etapas de tratar a un sujeto con un agente que aumenta el riesgo de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile* en el sujeto, inocular al sujeto con *C. difficile*, tratar al sujeto con el agente candidato, y evaluar la eficacia del tratamiento con el agente candidato. Como se usa en el presente documento, un "agente que aumenta el riesgo de infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*" es cualquier agente que se cree que promueve la aparición o progresión de la infección por *C. difficile* o enfermedad asociada a *C. difficile*. Tal agente puede ser un agente antibiótico o no antibiótico. Por ejemplo, el agente puede ser cualquiera de los antibióticos descritos en el presente documento. Ilustrativamente, dicho antibiótico puede ser clindamicina, metronidazol, vancomicina, fidaxomicina, nitazoxanida, rifaximina, ramoplanina o una combinación de los mismos.

En estos métodos, el agente candidato puede administrarse al sujeto antes o después de la inoculación con *C. difficile*. El agente candidato puede ser cualquier agente que se cree que tiene el potencial para tratar o prevenir la infección por *C. difficile* o la enfermedad asociada a *C. difficile*. Los agentes candidatos, que pueden ser un antibiótico o no antibiótico, incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*. Estos métodos incluyen cualquiera de los métodos *in vitro* e *in vivo* descritos en los ejemplos a continuación.

El objetivo final del tratamiento de CDAD es discontinuar todos los antibióticos y permitir la restauración de la microflora intestinal normal. De acuerdo con la invención, los mAb anti-toxina A y B descritos en el presente documento pueden proporcionar terapias no antibióticas diseñadas para bloquear los efectos patogénicos de las toxinas de *C. difficile*, permitir la interrupción de los antibióticos y, por lo tanto, proporcionar tiempo para que el colon sane y la microflora intestinal normal se restablezca. Los antibióticos monoclonales de la invención han demostrado una protección completa y duradera (> 37 días) en un modelo estricto de hámster de CDAD. Basado en sus características y propiedades excepcionales, los mAb anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* de la invención proporcionan nuevas opciones de tratamiento y medicamentos para pacientes mal atendidos por las terapias existentes, incluidos aquellos individuos afectados por los casos más graves de enfermedad.

La presente invención abarca además una vacuna o inmunógeno que comprende porciones, fragmentos o péptidos de toxina A y/o toxina B de *C. difficile* que contiene las regiones epitópicas reconocidas y/o unidas por uno o más de los anticuerpos monoclonales PA-39 (Número de acceso de la ATCC PTA-9692), una forma humanizada de PA-39, anticuerpo monoclonal PA-50 (Número de acceso de la ATCC PTA-9694), una forma humanizada de PA-50, anticuerpo monoclonal PA-41 (Número de acceso de la ATCC PTA-9693), una forma humanizada de PA-41, un anticuerpo que compite por la unión de la toxina A con el anticuerpo monoclonal PA-39 o una forma humanizada del mismo, un anticuerpo que compite por la unión de la toxina A con el anticuerpo monoclonal PA-50 o una forma humanizada del mismo, o un anticuerpo que compite por la unión de la toxina B con el anticuerpo monoclonal PA-41 o una forma humanizada del mismo. En una realización, la vacuna o inmunógeno comprende porciones, fragmentos o péptidos de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* que contienen las regiones epitópicas reconocidas y/o unidas por uno o más de los anticuerpos monoclonales PA-39 (Número de acceso de la ATCC PTA-9692), una forma humanizada de PA-39, o un anticuerpo que compite por la unión de la toxina A y la toxina B con el anticuerpo monoclonal PA-39 o una forma humanizada de la misma. En una realización, las porciones, fragmentos o péptidos que contienen epítomos de la toxina A y/o la toxina B de la vacuna o inmunógeno se derivan de la proteína de la toxina A o de la toxina B mediante escisión proteolítica. En una realización, los fragmentos, porciones o péptidos de la toxina A de la vacuna o inmunógeno se producen por escisión proteolítica por enteroquinas. En una realización, los fragmentos, porciones o péptidos de toxina B de la vacuna o inmunógeno se producen mediante escisión proteolítica por caspasa (caspasa 1). En una realización, las porciones o fragmentos de la vacuna o inmunógeno que contienen epítomos son péptidos sintetizados química o de forma recombinante de la proteína de la toxina A o de la toxina B. En una realización, los fragmentos, porciones o péptidos de la vacuna o inmunógeno que contienen una o más regiones epitópicas de toxina A y/o toxina B que son reconocidas y unidas por el anticuerpo se derivan de uno o más del terminal amino de la toxina A; el terminal amino de la toxina B; el terminal carboxilo de la toxina A; el terminal carboxilo de la toxina B; el dominio de unión al receptor de la toxina A; una región fuera del dominio de unión al receptor de la toxina A; la región enzimática del terminal N de la toxina B; el dominio glucosiltransferasa de la toxina A; el dominio glucosiltransferasa de la toxina B; el dominio proteolítico de la toxina A; el dominio proteolítico de la toxina B; el dominio hidrofóbico, formador de poros de la toxina A; o el dominio hidrofóbico, formador de poros de la toxina B.

En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan del extremo terminal amino de la toxina A o la toxina B. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan del terminal carboxilo de la toxina A o la toxina B. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan del dominio glucosiltransferasa de la toxina A o la toxina B. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan del dominio proteolítico de la toxina A o la toxina B. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan de los compuestos hidrofóbicos, dominio formador de poros de la toxina A o la toxina B. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan del dominio de unión al receptor de la toxina A. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan del dominio de unión al receptor de la toxina B. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan de una región fuera del dominio de unión al receptor de la toxina A. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen una o más regiones epitópicas reconocidas y unidas por los anticuerpos se derivan de la región enzimática del terminal N de la toxina B. En una realización, los fragmentos o porciones de la toxina A y/o la toxina B que contienen epítomos tienen un tamaño < 300 kDa. En otras realizaciones, los fragmentos o porciones que contienen epítomos de la toxina A y/o la toxina B son ~158-160 kDa, ~100-105 kDa, por ejemplo, 103 kDa, ~90-95 kDa, por ejemplo, 91 kDa, y/o ~63-68 kDa, por ejemplo, 63 kDa o 68 kDa de tamaño. En otras realizaciones, los fragmentos o porciones de toxina A que contienen epítomos son ~158-160 kDa; ~90-95 kDa, por ejemplo, 91 kDa, y/o ~63-68 kDa, por ejemplo, 68 kDa de tamaño. En otras realizaciones, los fragmentos o porciones de toxina B que contienen epítomos son de ~ 100-105 kDa, por ejemplo, 103 kDa, y/o de ~ 63-68 kDa, por ejemplo, 63 kDa de tamaño.

Tales porciones, fragmentos o péptidos de las toxinas, cuando se administran en forma de una vacuna o inmunógeno a un sujeto infectado con *C. difficile* o afectado con una enfermedad asociada a *C. difficile*, pueden provocar una respuesta humoral en el sujeto, es decir, anticuerpos que tienen especificidades para la toxina A y/o la toxina B, lo que permite al sujeto generar una respuesta inmune contra las toxinas y neutralizar, bloquear, reducir, mejorar, curar o

- tratar la enfermedad, infección asociada a *C. difficile*, o CDAD en el sujeto. En consecuencia, otra realización proporciona un método para neutralizar, bloquear, reducir, mejorar, curar o tratar la infección por *C. difficile* o una enfermedad asociada a *C. difficile* en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la vacuna o inmunógeno descritos anteriormente. En una realización, el sujeto provoca una respuesta humoral a la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*, por lo tanto, neutralizando, bloqueando, reduciendo, mejorando, curando o tratando la enfermedad, infección asociada a *C. difficile* o CDAD en el sujeto. En otra realización, el sujeto provoca una respuesta inmune celular a la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*. En otra realización, el sujeto provoca una respuesta inmune humoral y celular a la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*.
- En otra realización, la invención abarca un método para neutralizar, inhibir o bloquear la actividad de la toxina A y/o la toxina B en o contra una célula susceptible a la infección por *C. difficile*, que comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, en donde el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, neutraliza, inhibe o bloquea la actividad de la toxina A y/o la toxina B en o contra la célula mediante un mecanismo competitivo o un mecanismo competitivo mixto de acción. En una realización, el anticuerpo es uno o más de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En una realización, la célula está en un sujeto y el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra en una cantidad eficaz al sujeto. En una realización, la célula está dentro del tracto gastrointestinal, por ejemplo, una célula epitelial intestinal del sujeto. En una realización, la toxina es la toxina A. En una realización, la toxina es la toxina B. En una realización, la toxina es la toxina A y el mecanismo de acción del anticuerpo es un mecanismo de acción de inhibición competitiva. En una realización, la toxina es la toxina A y el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, es PA-50 (número de acceso de la ATCC PTA-9694), una forma humanizada del mismo, o un anticuerpo, o fragmento del mismo, que compite con PA-50 para neutralizar la actividad de la toxina A. En una realización, la toxina es la toxina A y el mecanismo de acción del anticuerpo es un mecanismo de acción de inhibición competitiva mixta. En una realización, la toxina es la toxina A y el anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, es PA-39 (número de acceso de la ATCC PTA-9692), una forma humanizada del mismo, o un anticuerpo, o fragmento del mismo, que compite con PA-39 para neutralizar la actividad de la toxina A. En una realización, la toxina es la toxina B y el mecanismo de acción del anticuerpo es un mecanismo de acción de inhibición competitiva mixta. En una realización, la toxina es la toxina B y el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es PA-41 (número de acceso de la ATCC PTA-9693), una forma humanizada de la misma, o un anticuerpo, o fragmento de la misma, que compite con PA-41 para neutralizar la actividad de la toxina B.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor competitivo" de la toxina se refiere a un inhibidor de neutralización de la toxina, por ejemplo, un anticuerpo, agente o molécula pequeña o entidad química, que muestra un cambio de EC₅₀ hacia la derecha en la curva de neutralización, sin un cambio en el porcentaje máximo de neutralización a medida que aumenta la concentración de toxina en el cultivo. Por lo tanto, un inhibidor competitivo es capaz típicamente de superar el efecto citotóxico de la toxina mediante la adición de más inhibidor. El término "inhibidor no competitivo" de una toxina se refiere a un inhibidor de neutralización de la toxina que muestra una disminución en el porcentaje máximo de neutralización sin un cambio en la concentración, produciendo una respuesta semi-máxima (EC₅₀) a medida que aumenta la concentración de toxina en el cultivo. Por lo tanto, un inhibidor no competitivo es típicamente incapaz de superar por completo el efecto citotóxico de la toxina mediante la adición de más inhibidor. El término "inhibidor mixto competitivo" de la toxina se refiere a un inhibidor de neutralización de toxina que muestra cierto grado de inhibición competitiva y no competitiva a medida que aumenta la concentración de toxina en el cultivo. Por ejemplo, un inhibidor de toxina competitivo mixto puede unirse a la toxina y ejercer su efecto bloqueando la unión de la toxina a una célula, así como bloqueando otros efectos citotóxicos de la toxina; ejerciendo así un mecanismo de acción mixto competitivo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile*

A. preparación de inmunógenos

Los anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra la toxina A y/o la toxina B de *C. difficile* se generaron inmunizando ratones con el toxoide de la toxina A de *C. difficile* (forma inactiva de la toxina) y con formas activas de la toxina A y/o la toxina B. Los mAb murinos (PA-38: mAb anti-toxina A, ATCC # PTA-9888; PA-39: mAb anti-toxina A y B, ATCC # PTA-9692; PA-41: mAb anti-toxina B ATCC # PTA-9693; y PA-50: mAb anti-toxina A, ATCC # PTA-9694) se generaron inmunizando animales con toxoide A seguido de inmunizaciones con la forma activa de la toxina A y/o la toxina B. El toxoide de la toxina A, la toxina A, la toxina B (List Biological Laboratories Inc., Campbell, CA) y la toxina A (TechLab Inc., Blacksburg, VA) se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las toxinas y el toxoide se derivaron de la cepa VPI 10463, una cepa de referencia comúnmente utilizada de *C. difficile*. Se añadió el adyuvante Quil A (Accurate Chemical, Westbury, NY) al volumen requerido de toxoide o toxina y se mezcló. La mezcla se preparó dentro de los 60 minutos de las inmunizaciones y se almacenó en hielo hasta que estuvo lista para la inmunización. Para el refuerzo final antes de la fusión, la toxina requerida se diluyó en PBS y se almacenó en hielo hasta que se usó para la inmunización.

B. Inmunización y fusión

Treinta ratones BALB/c hembra (Charles River Labs, Wilmington, MA) recibieron dos dosis inmunizantes (para PA-50) o tres dosis inmunizantes (para PA-38, PA-39 y PA-41) de toxoide de la toxina A (10 µg) por vía subcutánea a intervalos de tres semanas antes de recibir inmunizaciones de refuerzo con dosis crecientes de toxina A activa o toxina B activa, también a intervalos de tres semanas. Para PA-38, un ratón recibió una inmunización de refuerzo cada tres semanas para un total de tres refuerzos con toxina A (List Biological Laboratories Inc.), cada refuerzo aumentando la dosis de 500 ng a 2 µg, y un refuerzo final de toxina A (8 µg) tres días antes de la esplenectomía. Para PA-39 y PA-41, dos ratones recibieron tres o cinco inmunizaciones de refuerzo, respectivamente, cada tres semanas con toxina B, cada refuerzo aumentando la dosis de 2 µg a 12,5 µg, y un refuerzo final de toxina B (20 µg) tres días antes de la esplenectomía. Para PA-50, un ratón recibió una inmunización de refuerzo cada tres semanas para un total de cuatro refuerzos con toxina A (TechLab Inc.), cada refuerzo aumentando la dosis de 20 ng a 2,5 µg, y un refuerzo final de toxina A (10 µg) tres días antes de la esplenectomía. Las dosis de inmunización y refuerzo de toxoide y toxina, respectivamente, se administraron junto con adyuvante, por ejemplo, Quil A (10 µg). El refuerzo con la forma activa de la toxina A o la toxina B sirvió para identificar animales que pueden haber desarrollado anticuerpos protectores. Los sueros de los animales inmunizados se diluyeron en serie y se analizaron para neutralizar el efecto citotóxico de la toxina A en las células CHO-K1 como se describe a continuación. Los animales con el título más alto de anticuerpos neutralizantes fueron elegidos para fusiones y aumentados con toxina sin adyuvante.

Después del refuerzo, los animales se sacrificaron, y los esplenocitos aislados se fusionaron con la línea celular Sp2/0, usando métodos estándar. Los hibridomas se suspendieron en medio de selección, RPMI-1640, FBS al 10%, BM Condimed-H1 al 10% (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) y beta mercaptoetanol (para PA-38 y PA-39) o Hybridoma-SFM y FBS al 10% (para PA-41 y PA-50) que contenía hipoxantina 100 µM, 1 µg/mL de azaserina y timidina 16 µM para presión selectiva. Los hibridomas se sembraron en placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pozos (BD Biosciences, San Jose, CA). Las placas se incubaron a 37 °C durante 3 días, seguido de la adición de medio de crecimiento HT (el medio de selección sin azaserina). La incubación continuó durante 4-7 días adicionales antes de seleccionar los sobrenadantes de hibridoma para la actividad neutralizante.

En la selección primaria para PA-38, se evaluaron 608 sobrenadantes de hibridoma por la capacidad para neutralizar el efecto citotóxico de la toxina A (List Laboratories) en células CHO-K1 (ATCC # CCL-61, Manassas, VA). En la selección primaria para PA-39 y PA-41, se evaluaron 2416 sobrenadantes de hibridoma por la capacidad para neutralizar el efecto citotóxico de la toxina B (List Laboratories) en células CHO-K1. En la selección primaria para PA-50, se evaluaron 1440 sobrenadantes de hibridoma por la capacidad de neutralizar el efecto citotóxico de la toxina A (TechLab Inc.) en células T-84. Un segundo ensayo examinó la inhibición de la aglutinación mediada por toxinas de eritrocitos de conejo. A partir del procedimiento de selección, se aislaron cuatro mAb, que se designaron PA-38 (antitoxina A), PA-39 (antitoxina A/B), PA-50 (antitoxina A) y PA-41 (antitoxina B) y que efectivamente inhibieron o neutralizaron las toxinas de *C. difficile* en los ensayos de selección. Las líneas celulares de hibridoma que produjeron estos mAb se clonaron dos veces limitando la dilución para generar líneas celulares clonales. Se determinó que los mAb PA-38, PA-39, PA-41 y PA-50 eran los isotipo IgG2a,K, IgG1,κ, IgG1,κ e IgG1,K, respectivamente, usando el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Las líneas celulares de hibridoma que producen mAb se designan con el mismo nombre que los mAb que ellas producen.

C. Selección: neutralización del efecto citotóxico de la toxina A o B sobre las células.

Los sobrenadantes de hibridoma se seleccionaron para determinar la capacidad de neutralizar el efecto citotóxico de la toxina A o la toxina B en las células. Se desarrolló un método de alto rendimiento para procesar miles de sobrenadantes de hibridoma al mismo tiempo. El ensayo de citotoxicidad utilizó células CHO-K1 (para PA-38, PA-39 y PA-41) o células T-84 (para PA-50). Las células se agregaron a placas de ensayo (placas de 96 pozos, pared opaca blanca, fondo plano transparente; Perkin Elmer, Waltham, MA) usando el sistema robótico Biomek FX (Beckman Coulter, Brea, CA). Las placas de ensayo se incubaron durante 4 horas a 37 °C para permitir que las células se unieran a los pozos. Para el ensayo con T-84, la toxina A se diluyó hasta 240 ng/mL. Para el ensayo con CHO-K1, la toxina A se diluyó hasta 2 µg/mL o la toxina B se diluyó hasta 6 ng/mL. Se agregó toxina diluida a las placas de dilución de reactivo (placas de fondo redondo de 96 pozos; BD, Franklin Lakes, NJ) manualmente en una cabina de bioseguridad (BSC). Los sobrenadantes de hibridoma se recolectaron manualmente y se agregaron a los pozos de las placas de dilución de reactivo usando el sistema Biomek FX. La mezcla de sobrenadante y toxina se incubó a 37 °C durante 1 hora y se añadió a las placas de ensayo que contenían las células usando el sistema Biomek FX. Después de incubar a 37 °C durante 72 horas, se añadieron 20 µL/pozo de CellTiter-Blue (Promega, Madison, WI) a cada pozo. Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales y luego se leyeron en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La supervivencia celular se comparó en cultivos no tratados y tratados con toxinas. El porcentaje de supervivencia celular se graficó contra la concentración.

D. Producción de mAb murinos de la invención.

Se usaron métodos de producción *in vivo* e *in vitro* para obtener mAb aislados y/o purificados de la invención. Para la producción *in vivo* de mAb murinos, se preparó un fluido ascítico inyectando la línea celular de hibridoma apropiada en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c cebados con pristano. El mAb se purificó hasta >95% de homogeneidad por precipitación con sulfato de amonio seguido por cromatografía de proteína A. Los anticuerpos purificados se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Para la producción *in vitro* a pequeña escala (<100 mg), los mAb murinos se purificaron a partir de sobrenadantes de hibridoma que crecieron en cultivo. Los hibridomas se cultivaron en Hybridoma-SFM (Invitrogen) y FBS al 10%. Las líneas celulares se pasaron y expandieron en matraces T-150 tres veces por semana para asegurar que la concentración celular no excediera de 2×10^6 células/mL. Los sobrenadantes que contenían PA-39 (IgG1, κ), PA-41 (IgG1, κ) y PA-50 (IgG1, κ) se clarificaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos y se filtraron. El material clarificado se diluyó en una concentración final de tampón de procesamiento (glicina 60 mM/NaCl 3 M, pH 8,5) y se cargó en una columna de proteína A equilibrada con tampón de procesamiento. Después de lavar la columna, los mAb PA-39 o PA-41 se eluyeron con acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5 y se neutralizaron a pH 7,0. Los sobrenadantes que contenían PA-38 (IgG2a, κ) se clarificaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos y se filtraron. El material clarificado se ajustó a una concentración final de tampón de fosfato de sodio 25 mM/NaCl 100 mM, pH 7,0 y se cargó en una columna de proteína A equilibrada con tampón de fosfato de sodio 50 mM/NaCl 0,5 M. La columna fue lavada; el mAb PA-38 se eluyó con acetato de sodio 0,1 M, pH 3,0, y el anticuerpo eluido se neutralizó a pH 7,0.

Para la producción *in vitro* de grandes cantidades de mAb (>100 mg), los hibridomas se inocularon en un Biorreactor WAVE (GE Healthcare, Piscataway, NJ) con una densidad inicial de 2×10^5 células/mL de Hibridoma-SFM con FBS al 5% ultrabajo en IgG. El recuento celular y la viabilidad se monitorizaron diariamente. Alrededor de los días 6 o 7, cuando la producción de anticuerpos se había estabilizado, el cultivo se terminó. El cultivo se clarificó y luego se concentró 10-20 veces por filtración de flujo tangencial. El anticuerpo se cargó en una columna de proteína A equilibrada con glicina 60 mM, NaCl 3 M a pH 8,5. La columna se lavó con el mismo tampón y el anticuerpo se eluyó con acetato 50 mM, pH 3,5. El anticuerpo agrupado se neutralizó a pH 7,4 con Tris 1 M, se concentró a 10 mg/mL y se diafiltró en PBS. Los mAb purificados se filtraron en forma estéril y almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 2

Especificidad y afinidad de los mAb anti-toxina A y/o toxina B de *C. difficile* de la invención para la toxina A y/o la toxina B

A. ELISA para determinar la especificidad de mAb para la toxina A y/o la toxina B

Las placas de ELISA (BD Biosciences) se recubrieron con 50 ng/pozo de toxina A (List Laboratories) o 25 ng/pozo de toxina B (List Laboratories) durante la noche a 4 °C. Después de lavar las placas con PBS (PBS sin calcio o magnesio, Tween 20 al 0,05%), los pozos se bloquearon con 200 μ L de tampón de bloqueo (PBS sin calcio o magnesio, Tween 20 al 0,1%, leche descremada al 2,5%) durante una hora a 37 °C. Se repitió la etapa de lavado y se añadieron sobrenadantes de hibridoma o mAb purificado durante una hora a 37 °C. La placa se lavó y se incubó durante una hora a 37 °C con IgG-Fc anti-ratón de cabra, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). La placa se desarrolló con el sistema de sustrato de peroxidasa ABTS (KPL, Gaithersburg, MD), con solución de parada de peroxidasa ABTS (KPL), y se leyó en un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices) a 405 nm.

Los datos de titulación se muestran en las Figuras 1A-C. La Figura 1A demuestra que PA-38 se une a la toxina A y no a la toxina B. La Figura 1B demuestra que PA-39 puede unirse tanto a la toxina A como a la toxina B. La Figura 1C demuestra que PA-41 se une a la toxina B y no a la toxina A.

B. Reactividad de los mAb a las toxinas A y B en Biacore

Se usó un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare) para determinar la especificidad de unión de los mAb de la invención a la toxina A y/o la toxina B. Los mAb se inmovilizaron a aproximadamente 10.000 unidades de resonancia (RU) en chips sensores CM5 (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el acoplamiento de aminas. Se utilizó como control una superficie de referencia de anticuerpo que coincide con el isotipo de especificidad irrelevante (Southern Biotech). Los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en tampón HPS-EP con base en HEPES (GE Healthcare). La toxina A o la toxina B purificada (30 nM; List Biological Laboratories) se pasaron sobre las celdas de control y flujo de prueba a una velocidad de 5 μ L/min. Cuando se indicó, se hizo pasar mAb adicional (100 nM) sobre la celda de flujo a 5 μ L/min para examinar la unión multivalente o competitiva.

Como se muestra en las Figuras 2A-D, mAb PA-38 (Figura 2A) y mAb PA-50 (Figura 2C) se unen específicamente a la toxina A; mAb PA-41 (Figura 2D) se une específicamente a la toxina B; y el mAb PA-39 (Figura 2B) se une preferencialmente a la toxina A, pero también se demostró la unión a la toxina B. Los resultados de estos datos son consistentes con los datos de ELISA (Figuras 1A-C) y demuestran las especificidades de unión de los mAb de la invención a la toxina A y/o la toxina B.

C. Afinidad de unión

El análisis de Biacore también se usó para determinar la avidéz de unión de los mAb de la invención a sus toxinas respectivas. El mAb se capturó utilizando un chip sensor CM5 preparado con el kit de captura de anticuerpos de ratón de Biacore. Luego se pasó la toxina a través de las celdas de flujo a concentraciones variables (0,4 - 100 nM, escalamiento doble). Todas las concentraciones de toxina se probaron por duplicado y la superficie del chip se regeneró después de cada proceso utilizando las condiciones especificadas en los kits. Los cambios en RU se registraron y analizaron utilizando el modelo de unión 1:1 mediante el software Bia Evaluation (Langmuir) que calculó la K_D del mAb para la toxina. Los datos de asociación y disociación y el ajuste se ilustran en las Figuras 3A-E.

El análisis de Biacore determinó que la K_D de los mAb para la toxina A era 1,0 nM para PA-38, 0,16 nM para PA-39 y 0,16 nM para PA-50. Se determinó que la K_D de los mAb para la toxina B era 2,4 nM para PA-39 y 0,59 nM para PA-41. Estos resultados demostraron que los mAb de la invención se unieron a la toxina A y/o la toxina B con afinidades nanomolares y subnanomolares.

Ejemplo 3

Ensayos de neutralización *in vitro* basados en células

Los ensayos de citotoxicidad basados en células que emplean células CHO-K1 o células T-84 se usaron para evaluar las actividades de neutralización de los mAb anti-toxina A y anti-toxina B descritos.

A. Neutralización del efecto citotóxico de la toxina A en las células CHO-K1

Se sembraron células CHO-K1 (2.000 células en 50 μ L/pozo) en placas de ensayo (placas de 96 pozos, pared opaca blanca, de fondo plano transparentes (Perkin Elmer)). Se permitió que las células se unieran durante 4 horas antes del tratamiento. Se mezclaron volúmenes iguales (35 μ L) de 2 μ g/mL de toxina A (List Biological Laboratories) y mAb diluidos en serie en placas de dilución de reactivo (placas de fondo redondo de 96 pozos (Falcon)) durante 1 hora a 37 °C, y luego se añadieron 50 μ L de la mezcla a cada pozo de las placas. Después de incubar durante 72 horas, se añadieron 20 μ L/pozo de CellTiter-Blue (Promega) a cada pozo. Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales, luego se leyeron en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) utilizando una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La supervivencia celular se comparó en cultivos no tratados y tratados con toxinas. El porcentaje de supervivencia celular se graficó contra la concentración de mAb. Los datos de inhibición se ajustaron a la regresión no lineal, la curva dosis-respuesta sigmoidea utilizando el software GraphPad Prism, y se calculó la concentración de mAb requerida para la neutralización del 50% de la citotoxicidad (EC_{50}). Como se muestra en la Figura 4, el mAb PA-39 neutralizó completamente la actividad de la toxina A en células CHO-K1 con una EC_{50} de 93 pM.

B. Neutralización del efecto citotóxico de la toxina B en células CHO-K1

Se usó un ensayo de citotoxicidad con CHO-K1 para evaluar la actividad de neutralización de mAb específicos antitoxina B. Similar a la evaluación de los mAb anti-toxina A, la toxina B (8 pg/mL, TechLab) se incubó durante 1 hora a 37 °C con mAb diluidos en serie antes de la adición a CHO-K1 (2.000 células/pozo) en una placa de 96 pozos. Después de 72 horas, se añadieron 20 μ L/pozo de CellTiter-Blue (Promega) a cada pozo. Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales y luego se leyeron en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) utilizando una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La viabilidad celular se determinó usando CellTiter-Blue; la supervivencia celular se comparó entre cultivos tratados y no tratados. Los datos de inhibición se ajustaron a la regresión no lineal, la curva dosis-respuesta sigmoidea utilizando el software GraphPad Prism, y se calculó la concentración de mAb requerida para la neutralización del 50% de la citotoxicidad (EC_{50}). Como se muestra en la Figura 5, PA-41 demostró un alto grado de actividad (una EC_{50} de 9,2 pM) en la neutralización de la citotoxicidad de la toxina B en células CHO-K1.

Aunque el mAb PA-39 demostró la unión a la toxina B con base en los análisis de ELISA y Biacore, este mAb no tenía actividad *in vitro* contra la toxina B en CHO-K1 y otros ensayos basados en células. Se han reportado anticuerpos que se unen tanto a la toxina A como a la toxina B pero que no tienen actividad funcional en la neutralización de la toxina A o la toxina B en ensayos *in vitro* basados en células (46, 92 y 93). La presente invención abarca un mAb novedoso que tiene la doble capacidad de unirse tanto a la toxina A como a la toxina B y también neutralizar la citotoxicidad de una toxina de *C. difficile*, es decir, la toxina A.

C. Neutralización del efecto citotóxico de la toxina A en células T-84

Se usó un ensayo de citotoxicidad con T-84 para evaluar la actividad de neutralización de los mAb anti-toxina A descritos. Se sembraron células T-84 (15.000 células en 50 μ L/pozo) en placas de ensayo (placas de 96 pozos, pared opaca blanca, de fondo plano transparente (Perkin Elmer)). Se permitió que las células se unieran durante 4 horas antes del tratamiento. Se mezclaron volúmenes iguales (35 μ L) de 240 ng/mL de toxina A (TechLab) y se mezclaron en serie mAb diluidos en placas de dilución de reactivo (placas de fondo redondo de 96 pozos (Falcon)) durante 1 hora

a 37 °C, y luego se añadieron 50 µL de la mezcla a cada pozo de las placas de ensayo. Después de incubar durante 72 horas, se añadieron 20 µL/pozo de CellTiter-Blue (Promega) a cada pozo. Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales, luego se leyeron en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) utilizando una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La supervivencia celular se comparó en cultivos no tratados y tratados con toxinas. Los datos de inhibición se ajustaron a la regresión no lineal, la curva dosis-respuesta sigmoidea utilizando el software GraphPad Prism, y se calculó la concentración de mAb requerida para la neutralización del 50% de la citotoxicidad (EC₅₀). Como se muestra en la Figura 6, los mAb PA-38 y PA-50 neutralizan completamente la actividad de la toxina A en las células T-84 con una EC₅₀ de 175 pM y 146 pM, respectivamente. En el ensayo de células T-84, el mAb PA-39 demostró una actividad mínima contra la toxina A y PA-41 no estaba activo.

D. Hemaglutinación de glóbulos rojos (RBC) de conejo

La capacidad de los mAb de la invención para bloquear la unión de la toxina A a los receptores celulares se evaluó usando un ensayo de hemaglutinación. Para este ensayo, se mezclaron volúmenes iguales (30 µL/pozo) de toxina A (8 µg/mL; TechLab) y mAb diluidos en serie en placas de dilución de reactivo (placas de fondo redondo de 96 pozos (Falcon)) durante 1 hora a 4 °C. Los glóbulos rojos (RBC) de conejo, (Colorado Serum Co., Denver, CO) se lavaron con PBS tres veces y se resuspendieron en PBS. Se añadieron 60 µL de una suspensión de RBC al 1% a los pozos de las placas de 96 pozos que contenían la mezcla de toxina A-mAb, y las placas se incubaron a 4 °C durante 4 horas. La toxina libre A causa la hemaglutinación de RBC. Por consiguiente, se espera que la adición de mAb anti-toxina A que se une a la toxina A evite la hemaglutinación. La extensión de la hemaglutinación se determinó usando un instrumento ImageQuant 400; la hemaglutinación completa produjo una señal más fuerte en comparación con RBC en suspensión. Los valores de EC₅₀ se calcularon a partir de los datos de inhibición usando la regresión no lineal GraphPad Prism, ajuste de la curva dosis-respuesta sigmoidea. Como se muestra en la Figura 7, el mAb PA-38 (cuadrados rellenos) y el mAb PA-50 (triángulos rellenos) neutralizaron completamente la actividad de la toxina A en los RBC con una EC₅₀ de 30 nM y 1,8 nM, respectivamente. PA-38 y PA-50 parecen neutralizar la toxina A al bloquear la unión de la toxina A a su receptor. Se descubrió que los mAb, PA-39 y PA-41 estaban inactivos en el ensayo.

E. Ensayo de monocapa de Caco-2

Se sembraron células Caco-2 (25.000 células en 75 µL/pozo) en la cámara superior de placas de Caco-2 Multiscreen de 96 pozos (Millipore Billerica, MA) con 250 µL de medio agregado a la cámara inferior. Se permitió que las células crecieran durante 10 días con cambios regulares de medio cada 3-4 días. Después de una incubación de 10-14 días, se confirmó la formación de una monocapa apretada midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) utilizando un voltímetro epitelial (modelo: EVOMX, World Precision Instruments, Sarasota, FL). Después de establecer y determinar la integridad de la monocapa, se mezclaron volúmenes iguales (60 µL) de toxina A (a 50 ng/mL) y mAb diluido en serie durante 1 hora a 37 °C y luego se agregaron a la cámara superior de la placa de ensayo. Las placas se incubaron durante 18-24 horas, y luego se midió el valor de TEER usando el voltímetro. La integridad de la monocapa se comparó en pozos no tratados y tratados con toxinas. Como se muestra en la Figura 8, los datos de inhibición se ajustaron a una regresión no lineal, curva dosis-respuesta sigmoidea usando el software GraphPad Prism para determinar la concentración de mAb requerida para la neutralización del 50% (EC₅₀). Los mAb PA-38 y PA-50 neutralizaron la interrupción de monocapas de Caco-2 por la toxina A con una EC₅₀ de 485 pM y 196 pM, respectivamente. Se encontró que los otros mAb estaban inactivos en este ensayo.

Sin querer limitarse a la teoría, los resultados *in vitro* basados en células demuestran que PA-38 y PA-50 parecen representar una clase de mAb anti-toxina A, mientras que PA-39 representa otra clase de mAb anti-toxina A. Los mAb PA-38 y PA-50 parecen unirse a un epítipo de toxina A importante para la unión del receptor; el mAb PA-39 parece unirse a la toxina de una manera que bloquea más directamente los efectos citotóxicos de la toxina A *in vitro*.

Ejemplo 4

Evaluación de la eficacia *in vivo* de mAb anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* de la invención en ratones

Se usó un modelo de ratón *in vivo* para medir la capacidad de los mAb descritos en el presente documento para neutralizar las toxinas circulantes de *C. difficile* en un animal. Las actividades neutralizantes *in vivo* de los mAb PA-38, PA-39, PA-41 o PA-50, administrados solos o en combinación, se probaron contra los efectos de la toxina A y la toxina B sistémicas combinadas de *C. difficile* (TechLab) en animales de prueba.

Se usaron en los experimentos 4-6 ratones hembras Swiss Webster/grupo (edad: ~6-8 semanas al comienzo del estudio; Charles River Laboratories). Los ratones se aclimataron en las instalaciones durante un mínimo de 4 días, y se verificó la salud de los animales antes de su uso. Los experimentos con animales se realizaron bajo el protocolo aprobado por IACUC.

Se realizaron experimentos iniciales para determinar la toxicidad de la toxina A y la toxina B en ratones. Los animales se dosificaron a 0, 20, 100, 500, 2500 ng de toxina/animal por vía intraperitoneal (ip) y se seleccionó una dosis que era letal para los animales para su uso en experimentos posteriores de neutralización de anticuerpos. Los ratones de control inyectados con PBS no se vieron afectados. Se seleccionó una dosis de 100 ng de toxina A (TechLab) para

los experimentos de neutralización, ya que era el nivel de dosis más bajo que resultaba letal para el 100% de los ratones dentro de las 24 horas posteriores a la inyección. Del mismo modo, se seleccionó una dosis de 100 ng de toxina B (TechLab) para los experimentos de neutralización, ya que era el nivel de dosis más bajo que resultaba letal para el 100% de los ratones dentro de las 24 horas posteriores a la inyección.

Para evaluar la actividad de neutralización de los mAb anti-toxina, se administró una sola inyección de cada mAb a diferentes niveles de dosis ip a los ratones (5 por grupo) en el día 0, seguido de administración ip de 100 ng/200 µL de toxina A o toxina B en el día 1. Se observó a los animales diariamente durante tres días y luego semanalmente durante hasta 21 días después de la administración de la toxina. La supervivencia de los animales fue el punto final primario del estudio.

Para los experimentos de neutralización, todas las dosis de anticuerpo se formularon en PBS sin calcio ni magnesio (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA). Se administró una sola inyección de mAb PA-38, PA-39, PA-41 o PA-50 a diferentes niveles de dosis ip (200 µL/dosis/animal) a ratones en el día 0, seguido de inyección de toxina (ip en un sitio diferente del sitio de inyección de anticuerpos) en el día 1. El estado de salud de los animales se controló diariamente durante los primeros 3-4 días y luego dos veces por semana hasta 21 días después de la administración de la toxina. Se registraron las observaciones de los animales al lado de la jaula (por ejemplo, postura encorvada, pelaje mate, inactividad), así como la supervivencia.

Se evaluaron diferentes niveles de dosis de PA-38 (0,2 µg a 250 µg por animal) y PA-50 (0,2 µg a 100 µg por animal). En este modelo, se encontró que PA-38 y PA-50 neutralizaban una dosis de 100 ng de toxina A y permitían una supervivencia del 100% a niveles de dosis tan bajos como 2 µg de mAb por animal como se muestra en las Figuras 9A y B. Por el contrario, un anticuerpo monoclonal humano anti-toxina A comparador (documentos WO/2006/121422 y US2005/0287150), denominado en el presente documento como mAb comparador CDA-1, a razón de 5 µg por animal, no protegió a los animales de la muerte relacionada con la toxina como lo hicieron los mAb de la invención (Figura 9C). Se evaluaron dosis de PA-41 que oscilaban entre 0,5 µg y 250 µg, y se encontró que una dosis única de 5 µg de mAb por animal neutralizaba completamente una dosis de 100 ng de toxicidad de toxina B en animales como se muestra en la Figura 10. El mAb PA-39 (100 µg por animal) no se observó que proporcionara un retraso de la muerte de los ratones relacionada con la toxina para la toxina A o B.

Después de que se demostró claramente *in vivo* la actividad de neutralización de anticuerpos individuales contra la toxina A (PA-38, PA-50) o contra la toxina B (PA-41), se realizó un experimento para probar la combinación de los mAb (PA-38 + PA-41) a niveles de dosis de 5 y 50 µg de cada mAb contra una dosis letal combinada de toxinas (100 ng de toxina A y 100 ng de toxina B) en el mismo modelo de ratón *in vivo*. Además, los anticuerpos monoclonales individuales se incluyeron como controles. Como se muestra en la Figura 11, una combinación de los mAb PA-38 y PA-41 mostró protección contra la combinación de toxinas tanto en 50 µg/animal (4 de 5 sobrevivieron) como en 5 µg/animal (1 de 5 sobrevivió) en comparación con la actividad de cada mAb solo (todos los animales murieron dentro de las 24 horas de la administración de la toxina).

Ejemplo 5

Evaluación de los mAb anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* de la invención en el modelo de diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD) en hámsteres sirios dorados

El modelo de CDAD en hámsteres reproduce los aspectos clave de la enfermedad de CDAD en humanos. Tras el tratamiento con antibióticos, se erradica la flora colónica normal y los hámsteres se vuelven fácilmente susceptibles a la infección por *C. difficile*. La infección produce diarrea severa, colitis pseudomembranosa y muerte. El modelo CDAD de hámster se utilizó para evaluar la eficacia potencial de los mAb de la invención para prevenir la enfermedad y la muerte asociadas con la exposición de animales a bacterias vivas de *C. difficile*. Estos experimentos se realizaron bajo protocolos aprobados por IACUC.

A. Análisis farmacocinético.

Antes de realizar el estudio de eficacia en el modelo de hámster utilizando hámsteres infectados con microorganismos vivos de *C. difficile*, se realizó un estudio farmacocinético en hámsteres normales no infectados. Los hámsteres sirios dorados (Harlan) fueron inyectados intraperitonealmente con 0,2 mg/animal, o 1 mg/animal de mAb purificado PA-38 o mAb PA-41. Se recogieron muestras de sangre mediante técnicas de hemorragia retroorbital o de punción cardíaca (terminal) a los 0,125, 0,25, 1, 2, 4, 7, 10, 14 y 21 días. Las muestras de sangre se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos para obtener sueros.

La concentración de mAb en los sueros se determinó mediante ELISA. Se recubrieron placas de ELISA de noventa y seis pozos (BD Biosciences) durante la noche con toxina A (TechLab) o toxina B (TechLab) a razón de 250 ng/pozo a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20® al 0,05% (PBS-T) y se bloquearon con 200 µL de tampón de bloqueo (PBS sin calcio o magnesio, Tween 20® al 0,1%, leche descremada al 2,5%) durante una hora a temperatura ambiente. El estándar de referencia de anticuerpos (mAb purificado PA-38 o mAb PA-41) se diluyó en

suero de hámster no modificado agrupado al 1% para generar una curva estándar en un intervalo de 0,3-1000 ng/mL. Las muestras de prueba diluidas y los patrones se incubaron durante una hora a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron (como anteriormente) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP, específica de Fc γ (Jackson Immunoresearch). Las placas se desarrollaron con el sistema de sustrato de peroxidasa ABTS (KPL), se detuvieron con solución de parada de peroxidasa ABTS (KPL) y se leyeron en un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices) a 405 nm. La concentración de mAb en cada hámster en diferentes puntos de tiempo se calculó utilizando las curvas estándar. Aproximadamente el 10% de las muestras no tenían título de anticuerpos, probablemente debido a la falta de inyección o la falta de absorción; estas muestras no se incluyeron en el cálculo del parámetro PK. El análisis farmacocinético no comparativo se realizó con WinNonLin, versión 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA) y los datos se ilustran en la Tabla 1 y en las Figuras 12A y B. Como se indicó, la C $_{m\acute{a}x}$ y el área bajo la curva (AUC) fueron dependientes de la dosis. Cada uno de los anticuerpos demostró una vida media terminal de más de 6 días, lo que aseguró la retención de anticuerpos en los estudios de eficacia descritos a continuación.

Tabla 1. Parámetros PK de los mAb en hámsteres

mAb	AUC $_{INF_obs}$ (día* mg/mL)	T $_{m\acute{a}x}$ (día)	C $_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	Semivida $_{1/2}$ (día)	Rsq
PA-38 2 mg/kg	303,8	2,00	25,2	7,4	0,999
PA-38 10 mg/kg	1522,6	0,25	128,0	10,6	0,988
PA-41 2 mg/kg	202,2	0,25	20,5	6,2	1,000
PA-41 10 mg/kg	696,7	1,00	78,1	6,8	1,000

B. Evaluación de los mAb anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* de la invención, en combinación, en el modelo de diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD) en hámsteres sirios dorados

Se realizó un experimento de eficacia para evaluar los mAb murinos anti-toxina A y anti-toxina B de la invención por su capacidad para afectar la supervivencia de animales infectados en un modelo *in vivo* de diarrea asociada a *C. difficile* en hámsteres. Los hámsteres machos sirios dorados (~90 g) (CrI: LVG(SYR)), (Charles River Laboratories, Inc., Kingston, NY) se trataron previamente con una dosis subcutánea única de clindamicina (Sigma, St. Louis, formulada en PBS a razón de 5 mg/mL) a razón de 50 mg/kg para alterar la flora colónica normal. Al día siguiente, los hámsteres en los grupos de prueba relevantes recibieron una dosis oral (1×10^7 CFU en 0,5 mL) de una suspensión de *C. difficile* (cepa ATCC 43596). La cepa 43596 se ha utilizado previamente en modelos de hámster para evaluar anticuerpos neutralizantes. Los animales se pesaron semanalmente y se monitorizaron diariamente para determinar su estado de salud y supervivencia.

Los anticuerpos de prueba comprendían combinaciones de los mAb murinos de la invención, es decir, una combinación de los mAb PA-38 y PA-41 o una combinación de los mAb PA-39 y PA-41. Los anticuerpos policlonales anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* de cabra (TechLab) se incluyeron como control positivo. Los mAb y los reactivos de control se administraron como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Grupos de tratamiento en el estudio de eficacia de hámster.

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma	No. de hámsteres
1	No infectado	NA*	NA	NA	4
2	No infectado +clindamicina	NA	NA	NA	4
3	Control infectado	NA	NA	NA	8
4	Vancomicina	20	PO	Dos veces al día X 5 días	8
5	Ab policlonales de cabra	1 mL/hámster	IP	Cada dos días X 4	8
6	PA-38 + PA-41	50, 50	IP	Cada dos días X 4	8
7	PA-39 + PA-41	50, 40	IP	Cada dos días X 4	8

*No aplicable

Los hámsteres en el Grupo 1 no recibieron tratamiento durante todo el estudio. Los hámsteres en los Grupos 2-7 fueron tratados previamente con una dosis subcutánea única de fosfato de clindamicina a razón de 50 mg/kg (Día -1). Los hámsteres en los Grupos 5-7 se dosificaron con los anticuerpos policlonales de cabra (Grupo 5) o con las combinaciones de mAb (Grupos 6 y 7) como se indica en la Tabla 2 mediante administración ip inmediatamente después del tratamiento con clindamicina. Después de 24 horas, cada hámster en los Grupos 3-7 se inoculó con 0,5 mL de la suspensión apropiada de *C. difficile* ATCC 43596 ($10^6 - 10^7$ CFU/mL) mediante sonda oral (día 0). Después del tratamiento inicial con anticuerpos en el Día -1, los tres tratamientos posteriores para estos grupos se administraron en días alternos, una vez al día, en los días 1, 3 y 5. La vancomicina (20 mg/kg dos veces al día) se administró por sonda oral a los animales en el Grupo 4 dos veces al día, aproximadamente con 6 horas de diferencia en los días 1-5. La administración de vancomicina (animales del Grupo 4) comenzó aproximadamente 20-24 horas después de que los animales habían sido inoculados con *C. difficile*.

Los resultados de supervivencia para los grupos tratados con mAb y control se ilustran en la Figura 13. En la Tabla 3 se presenta un resumen de la mortalidad de hámsteres para todos los grupos. Todos los hámsteres infectados con *C. difficile* sin ningún tratamiento (control infectado, Grupo 3) fueron encontrados muertos el día 2 o el día 3 del estudio. En el grupo tratado con vancomicina (Grupo 4), siete de ocho hámsteres fueron encontrados muertos entre los días 15 y 19. Como se observa típicamente en este modelo, la mayoría (88%) de los hámsteres tratados con vancomicina recayeron y murieron por infección con *C. difficile* dentro de las dos semanas posteriores a la interrupción de la terapia. Por el contrario, todos los hámsteres tratados con la combinación de mAb PA-39 + PA-41 (Grupo 7), y 7 de los 8 hámsteres tratados con la combinación de mAb PA-38 + PA-41 (Grupo 6), sobrevivieron al final del estudio (37 días después de la infección). Además, al final del estudio, todos los animales del grupo tratado con anticuerpos policlonales de cabra (Grupo 5) estaban vivos. Todos los hámsteres sobrevivientes tenían tractos gastrointestinales normales en la necropsia postmortem (véanse las Figuras 15A, C y D).

Tabla 3. Tasa de mortalidad y día de la muerte del hámster en cada grupo

Grupo	Tratamiento	No. de animales	% de mortalidad	Días de estudio								
				2	3	5	7	15	18	19	37	
1	No infectado	4	0									
2	No infectado + clindamicina	4	50			1	1					
3	Control infectado	8	100	5	3							
4	Vancomicina	8	88					1	5	1		
5	Ab policlonales de cabra	8	0									
6	PA-38 + PA-41	8	13		1							
7	PA-39 + PA-41	8	0									

Estos resultados indican que la combinación de los mAb PA-39 y PA-41 y la combinación de los mAb PA-38 y PA-41 protegieron eficaz y duraderamente a los hámsteres de enfermedades graves, tanto inicialmente como de una recaída posterior de la enfermedad. La duración del beneficio del tratamiento con mAb (37 días) excedió significativamente la ventana (dos semanas) para establecer la infección por *C. difficile* después del tratamiento con clindamicina en el modelo de hámster.

Los pesos corporales de los animales en los grupos tratados con policlonales y mAb y en los grupos de control se ilustran en la Figura 14. Los hámsteres en el grupo de control no infectado (Grupo 1) aumentaron de peso de manera constante, oscilando entre 13 y 29 g en transcurso del estudio. Todos los animales de control infectados murieron antes de la primera medición de peso posterior a la inoculación. Los pesos corporales medios de los animales tratados con vancomicina, anticuerpos policlonales de cabra, la combinación de mAb PA-38 + PA-41 y la combinación de mAb PA-39 + PA-41 disminuyeron significativamente durante la primera semana después de la infección. A partir de entonces, los pesos corporales medios en los grupos tratados con mAb, así como en el grupo tratado con anticuerpos policlonales, aumentaron constantemente y fueron similares a los del control no infectado al final del estudio, lo que indica que no hubo toxicidad manifiesta.

En general, en este estudio con hámsteres, se demostró que las combinaciones de mAb de la invención protegían eficaz y duraderamente a los hámsteres de la mortalidad en un modelo de hámster relevante y estricto de infección por *C. difficile*. Estos hallazgos respaldan un mecanismo mediante el cual las combinaciones de mAb protegieron a los animales de la enfermedad de *C. difficile* durante un tiempo lo suficientemente largo como para permitir el crecimiento y la repoblación de la flora intestinal normal en los animales tratados con mAb en comparación con los animales no infectados (Figura 15A-D). Por lo tanto, los mAb de la invención proporcionaron protección terapéutica a los animales infectados y resolvieron la enfermedad asociada a *C. difficile*, restablecieron la salud gastrointestinal y la supervivencia.

C. Evaluación de mAb individuales anti-toxina A y/o toxina B de *C. difficile* de la invención en el modelo de diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD) en hámsteres sirios dorados

Se realizó un estudio adicional en hámsteres para evaluar la eficacia de los mAb murinos individuales de la invención administrados a animales infectados en comparación con la de los mAb administrados en combinación. Los grupos de tratamiento para este estudio se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Estudio de eficacia en hámsteres de mAb individuales en comparación con una combinación de mAb

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma	No. de hámsteres
1	control infectado	NA ¹	NA	NA	7
2	Vancomicina	20	PO	dos veces al día X 5 días	7
3	PA-39 + PA-41	50, 50	IP	Cada 2 días X 4	7
4	PA-41	50	IP	Cada 2 días X 4	7
5	PA-38	50	IP	Cada 2 días X 4	7

6	PA-39	50	IP	Cada 2 días X 4	7
7	PA-50	50	IP	Cada 2 días X 4	7
¹ No aplicable					

En este estudio, los hámsteres en los Grupos 1-7 fueron tratados previamente con una dosis subcutánea única de fosfato de clindamicina a razón de 50 mg/kg (día -1). Los animales en los Grupos 3-7 fueron dosificados con mAb por administración ip inmediatamente después del tratamiento con clindamicina. Después de 24 horas, cada hámster en los Grupos 1-7 se inoculó con 0,5 mL de la suspensión de *C. difficile* por sonda oral (día 0), como se describe en la sección B, más arriba. Los tratamientos de mAb de prueba se administraron a los animales en los Grupos 3-7 en una dosis única en los días 1, 3 y 5. La vancomicina se administró a los animales dos veces al día en los días 1-5 (Grupo 2). Los hámsteres fueron observados dos veces al día para determinar su viabilidad. Los pesos corporales se registraron una vez por semana. Se realizó una necropsia en animales que fueron encontrados muertos o que fueron sacrificados durante el estudio. Al final del estudio (40 días después de la inoculación), se realizó una necropsia terminal en todos los hámsteres restantes.

La supervivencia de los grupos de animales tratados con mAb y de control se representa en la Figura 16A, y el día de la muerte de los hámsteres en todos los grupos se resume en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos de mortalidad y día de la muerte.

Grupo	Tratamiento	No. de hámsteres	% de mortalidad	Días de estudio												
				2	3	4	8	11	12	14	15	18	19	40		
1	Control infectado	7	100	7												
2	Vancomicina	7	100						1	2	1	1	2			
3	PA-39 + PA-41	7	14						1							
4	PA-41	7	100	6	1											
5	PA-38	7	100	5	2											
6	PA-39	7	100	1	1	1	2	1	1							
7	PA-50	7	100	3	4											

En el grupo de control infectado (Grupo 1), los siete hámsteres fueron encontrados muertos en el día 2. Todos estos hámsteres tenían los tractos gastrointestinales inflamados en el examen post mortem. En el grupo tratado con vancomicina (Grupo 2), los siete hámsteres murieron entre los días 12 y 19 del estudio. El momento de estas muertes fue similar al tiempo que se observó anteriormente con el tratamiento con vancomicina en este modelo. El examen post mortem indicó que todos los hámsteres tenían los tractos gastrointestinales inflamados indicativos de infección por *C. difficile*.

El tratamiento combinado de mAb PA-39 + PA-41 (Grupo 3) fue muy eficaz en la protección de los hámsteres infectados en este estudio. Seis de los siete hámsteres en el Grupo 3 sobrevivieron hasta el final del estudio. Un hámster fue encontrado muerto el día 12 del estudio. El examen post mortem indicó que este hámster tenía un tracto gastrointestinal inflamado típico de la infección por *C. difficile*.

Entre los tratamientos con anticuerpos individuales (Grupos 4-7), el mAb PA-39 solo (Grupo 6) exhibió cierta actividad protectora en animales tratados. Los hámsteres en este grupo fueron encontrados muertos en los días 2 a 12. En los grupos tratados con los mAb individuales, PA-41 (Grupo 4), PA-38 (Grupo 5) o PA-50 (Grupo 7), los hámsteres fueron encontrados muertos en los días 2 y 3. En la necropsia terminal, todos los hámsteres en estos grupos tenían los tractos gastrointestinales inflamados, lo que es indicativo de infección por *C. difficile*. Por el contrario, todos los hámsteres tratados que sobrevivieron tenían tractos gastrointestinales normales. Los resultados de este estudio indican que el tratamiento con la combinación de mAb de PA-39 + PA-41 protegió con éxito a los hámsteres del desarrollo de la enfermedad durante más de un mes después de la interrupción del tratamiento, y son los mismos que los obtenidos en el estudio descrito anteriormente del Ejemplo 5B en el que ocho de los ocho hámsteres tratados con la combinación de PA-39 + PA-41 sobrevivieron a la infección por *C. difficile*. En este estudio, el mAb PA-39 como un único tratamiento con mAb mostró cierta actividad en la protección de los hámsteres infectados con *C. difficile* de la enfermedad por *C. difficile*.

D. Determinación de concentraciones de anticuerpo de sangre de animales terminales y evaluación de la existencia de *C. difficile* en muestras de porciones de ciego de hámsteres terminales

Se recogió sangre de animales que se encontraron moribundos durante el estudio. Al final del estudio, también se recolectó sangre de todos los animales que permanecieron vivos. Las muestras de sangre se procesaron para recoger suero, a menos que se indique lo contrario a continuación. Las muestras procesadas se congelaron a < -70 °C para un posible análisis adicional.

Después de los estudios de eficacia de hámsteres *in vivo* descritos anteriormente, se examinó la presencia de los mAb en sangrados de animales terminales tomadas en los estudios. Para el estudio de la combinación de mAb descrito en el Ejemplo 5B, ocho de los animales del Grupo 7, que habían recibido una dosis (cada 2 días x 4) de una combinación de mAb PA-39 (50 mg/kg) + mAb PA-41 (40 mg/kg) se sangraron terminalmente el día 37 del estudio. En el suero recogido de este sangrado terminal, se detectó PA-39 a un nivel de $3,3 \pm 3,4$ $\mu\text{g/mL}$, y se detectó PA-41 a un nivel de $2,4 \pm 1,7$ $\mu\text{g/mL}$. Para el estudio individual de mAb descrito en el Ejemplo 5C, seis de los animales del Grupo 3, que habían recibido una dosis (cada 2 días x 4) de una combinación de mAb PA-39 (50 mg/kg) + mAb PA-41 (50 mg/kg) se sangraron terminalmente el día 40 del estudio y la muestra de sangre se procesó para obtener el plasma. En el plasma recogido de este sangrado terminal, se detectó PA-39 a un nivel de $1,8 \pm 1,4$ $\mu\text{g/mL}$, y se detectó PA-41 a un nivel de $3,4 \pm 3,2$ $\mu\text{g/mL}$. El límite de detección de anticuerpos en estos análisis fue de 1,6 ng/mL. Por lo tanto, los niveles detectables de los mAb se midieron en los animales durante varias semanas. Esto apoya un modo de acción en el que estos mAb proporcionan un beneficio terapéutico en el transcurso de un régimen de tratamiento y después de que se administran las últimas dosis de los mAb.

En la necropsia terminal del Grupo 3 en el Ejemplo 5C, se expuso el ciego de cada hámster y cada uno parecía normal. No se observó inflamación ni enrojecimiento y los contenidos de los ciegos fueron relativamente firmes en consistencia. La pared de cada ciego se abrió con un bisturí estéril y desechable. Se usó un bisturí nuevo para cada hámster para evitar la contaminación cruzada. Se extrajo una pequeña cantidad de heces del ciego con un hisopo estéril y se colocó en un tubo de ensayo estéril. Se usó un asa de inoculación de 10 μL para recolectar una muestra de las heces del tubo y para pasar la muestra a través de una placa de agar que contenía CCFA con medio de sangre de caballo (Remel, Lote 735065), que es selectivo para *C. difficile*. Las placas se colocaron en una caja anaeróbica y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Una placa se rayó con *C. difficile* ATCC 43596 del cultivo patrón y se incubó junto con las rayas fecales para la comparación de colonias. Se observaron colonias similares a *C. difficile* en las placas de los seis hámsteres. Los resultados de estos experimentos indican que si bien los animales supervivientes tratados con mAb de la invención todavía albergaban *C. difficile*, su flora normal se había repoblado para restablecer el equilibrio microbiano intestinal normal, lo que contribuyó a su supervivencia general.

E. Evaluación de mAb humanizados anti-toxina A y/o toxina B de *C. difficile* de la invención y mAb comparadores anti-toxina A y anti-toxina B en el modelo de diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD) en hámsteres sirios dorados

Se realizó un estudio adicional en hámsteres para evaluar la eficacia *in vivo* de una combinación de los mAb humanizados anti-toxina A y anti-toxina B de la invención en comparación con el de una combinación de mAb comparador humano anti-toxina A, CDA-1, y mAb comparador humano anti-toxina B humana, CDB-1, cuando las combinaciones de anticuerpos respectivas se administraron a animales infectados con *C. difficile*. Los grupos de tratamiento para este estudio se presentan en la Tabla 5A.

Tabla 5A. Grupos de tratamiento en el estudio de eficacia comparativa de hámster.

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma	No. de hámsteres
1	Control no infectado	NA1	NA	NA	4
2	Control infectado	NA	NA	NA	8
3	Vancomicina	20	dos veces al día	dos veces al día X 5 días	8
4	hPA-41 + hPA-50	50, 50	IP	Cada 2 días X 4	10
5	hPA-41 + hPA-50	20, 20	IP	Cada 2 días X 4	10
6	CDA-1 + CDB-1	50, 50	IP	Cada 2 días X 4	10
7	CDA-1 + CDB-1	20, 20	IP	Cada 2 días X 4	10

¹No aplicable

Los anticuerpos de prueba comprendieron combinaciones de los mAb humanizados de la invención, es decir, una combinación de mAb humanizado anti-toxina A PA-50 y mAb humanizado anti-toxina B PA-41 (hPA-41 + hPA-50), o una combinación de mAb comparador humano anti-toxina A denominado como mAb comparador CDA-1 y mAb comparador humano anti-toxina B denominado como mAb comparador CDB-1 (CDA-1 + CDB-1) en las cantidades indicadas en la Tabla 5A. Los mAb comparadores se sintetizaron (DNA2.0) con base en las regiones de cadena pesada y ligera publicadas de 3D8 y 124 (documentos WO2006/121422 y US2005/0287150), se clonaron en vectores de expresión de IgG1 de longitud completa (pCON-gamma y pCON-kappa), se expresaron en células CHO-KSV1 y se purificaron utilizando los métodos descritos en este documento. Las combinaciones de mAb y los tratamientos de control se administraron como se describe en la Tabla 5A.

Los métodos de tratamiento fueron esencialmente los descritos para la Parte B de este Ejemplo, véase más arriba. En resumen, se utilizaron hámsteres sirios dorados (Charles River Laboratories, Stone Ridge, NY, de 50 días de edad) en este estudio del Ejemplo 5E. Los hámsteres en el grupo de control 1 no estaban infectados (y no tratados). Los animales en los Grupos 2-7 fueron tratados previamente con una dosis subcutánea única de fosfato de clindamicina a razón de 50 mg/kg para alterar la flora colónica normal (Día -1). Los animales de los Grupos 4-7 fueron dosificados por administración ip inmediatamente después del tratamiento con clindamicina. Después de 24 horas, cada animal

en los Grupos 2-7 se inoculó con 0,5 mL de suspensión de *C. difficile* (ATCC 43596, cepa 545) mediante sonda oral (Día 0), (es decir, dosis oral). Se proporcionaron administraciones adicionales de los tratamientos de prueba a los animales en los Grupos 4-7 en una dosis única en los Días 1, 3 y 5. Se administró vancomicina a los animales del Grupo 3 dos veces al día, aproximadamente con 6 horas de diferencia, en los Días 1-5. Los animales fueron pesados semanalmente y monitoreados diariamente para determinar su estado de salud y supervivencia durante 39 días. La necropsia se realizó al finalizar, y se determinaron los títulos cecales de microorganismos de *C. difficile* después del cultivo anaeróbico a 37 °C durante 48 horas en medio selectivo. El límite de detección fue de 20 CFU/g de contenido del ciego. Este estudio y los estudios de hámster descritos anteriormente se llevaron a cabo en Ricerca Biosciences (Concord, OH) de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

Los resultados de supervivencia para los grupos tratados con mAb y control se ilustran en la Figura 16B-1. Los datos de mortalidad para el estudio se presentan en la Tabla 5B a continuación. Un resumen de la supervivencia de hámsteres se presenta en la Tabla 5C a continuación.

Tabla 5B. Datos de mortalidad y día de la muerte del hámster en cada grupo

Grupo	Tratamiento	No de animales	% de mortalidad	Día del estudio								
				2	3	5	8	11 a 14	18 a 20	22	... 30	
1	Control no infectado	4	0									
2	Control infectado	8	100	7	1							
3	Vancomicina	8	100					1	5	2		
4	hPA-50 + hPA-41 50, 50 mg/kg	10	10				1					
5	hPA-50 + hPA-41 20, 20 mg/kg	10	0									
6	Comparador CDA-1 + CDB-1 50, 50 mg/kg	10	100			1		8				1
7	Comparador CDA-1 + CDB-1 20, 20 mg/kg	10	100			2		8				

Como se observa en la Tabla 5B, los 4 hámsteres de control no infectados (Grupo 1) sobrevivieron hasta el final del estudio. Todos los animales de control infectados (Grupo 2) murieron los días 2 y 3. En el grupo tratado con vancomicina (Grupo 3), todos los animales del estudio murieron entre los días 13 y 22. Para el Grupo 4 con hPA-50 + hPA-41 (50, 50 mg/kg), nueve de diez animales sobrevivieron hasta el final del estudio. Un hámster de este grupo fue encontrado moribundo el día 8, con decoloración roja del tracto gastrointestinal, mientras que los nueve animales restantes en este grupo tenían tractos gastrointestinales normales. Los diez hámsteres en el Grupo 5 sobrevivieron hasta el final del estudio con tractos gastrointestinales normales. En los grupos comparativos de mAb, nueve de cada diez animales que recibieron 50 mg/kg (Grupo 6) murieron entre los días 5 y 14; un animal murió el día 28 del estudio. Los diez hámsteres tratados con 20 mg/kg de la combinación de mAb comparador (Grupo 7) murieron entre los días 5 y 14 del estudio.

Tabla 5C. Supervivencia media y general de los animales tratados con mAb humanizados de la invención y mAb comparadores

Grupo/Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Supervivencia media (Día)	Supervivencia el día 40 (%)
Grupo 1 no infectado	NA*	40	100
Grupo 2 infectado	NA*	2	0
Grupo 3 con vancomicina	20	20	0
Grupo 4 hPA-50 + hPA-41	50, 50	NA	90
Grupo 5 hPA-50 + hPA-41	20, 20	NA	100
Grupo 6 CDA-1 + CDB-1	50, 50	14	0
Grupo 7 CDA-1 + CDB-1	20, 20	11	0

* No Aplica

Como se observa en la Tabla 5C, los cuatro animales del Grupo 1 de control no infectados sobrevivieron hasta el final del estudio (40 días). Todos los hámsteres infectados con *C. difficile* sin ningún tratamiento (control infectado, Grupo 2) tuvieron una supervivencia media de 2 días; ningún animal en este grupo sobrevivió al final del estudio. En el grupo tratado con vancomicina (Grupo 3), la supervivencia media fue de 20 días, sin animales sobrevivientes en el día 40. Los dos tratamientos combinados de mAb hPA-50 + hPA-41 fueron efectivos para proteger a los animales infectados en este estudio (Grupos 4 y 5). Todos (100%) de los hámsteres tratados con la combinación de los mAb humanizados PA-50 + PA-41 (20 mg/kg cada uno; Grupo 5), y el 90% de los hámsteres tratados con la combinación de los mAb humanizados PA-50 + PA-41 (50 mg/kg cada uno; Grupo 4), sobrevivió hasta el final del estudio (40 días después de la infección). Todos los hámsteres sobrevivientes tenían tractos gastrointestinales esencialmente normales en la necropsia postmortem. Por el contrario, la supervivencia media de los animales que recibieron una combinación de los mAb comparadores anti-toxina A y anti-toxina B fue similar para ambas dosis de los mAb comparadores; todos los animales murieron en los dos grupos tratados con las combinaciones de mAb comparador. Específicamente, para los animales que recibieron la combinación CDA-1 + CDB-1 (50 mg/kg cada uno; Grupo 6), la supervivencia media fue de

14 días, mientras que para los animales que recibieron la combinación CDA-1 + CDB-1 (20 mg/kg cada uno; Grupo 7), la supervivencia media fue de 11 días.

5 Evaluaciones adicionales en el estudio incluyeron mediciones de peso corporal, necropsia macroscópica y título cecal de microorganismos de *C. difficile* al final del estudio. El peso corporal medio de los animales tratados con vancomicina o la combinación de PA-50/PA-41 disminuyó durante la primera semana después de la infección y luego se recuperó (Figura 16B-2). Para el día 39, el peso corporal medio de los animales tratados con la combinación de PA-50/PA-41 fue similar al de los animales sanos, no infectados que se alojaron en paralelo ($P > 0,05$). El peso corporal medio de los animales tratados con la combinación de la combinación de anticuerpos comparadores CDA1/CDB1 disminuyó constantemente durante el estudio.

15 En el día 39, los tractos gastrointestinales de los 19 animales supervivientes tratados con la combinación PA-50/PA-41 parecían similares a los de los animales no infectados; y los títulos cecales de *C. difficile* eran indetectables ($< 1,3 \log_{10}$ CFU, $n = 11$) o bajos ($4,15 \pm 0,76 \log_{10}$ CFU, $n = 8$). Por el contrario, se observaron tractos gastrointestinales inflamados en algunos o todos los animales en los otros grupos de tratamiento al momento de la muerte. Se detectó *C. difficile* en 4 de 4 animales no tratados (CFU media = $8,96 \pm 0,59 \log_{10}$, $P < 0,0001$ en relación con PA-50/PA-41) y 4 de 4 animales tratados con vancomicina (CFU media = $6,01 \pm 0,93 \log_{10}$, $P < 0,017$ en relación con PA-50/PA-41) para el cual se realizaron análisis cecales. La mayoría de los hámsteres tratados con la combinación de anticuerpos comparadores CDA1/CDB1 tenían poco o ningún contenido en el ciego, lo que impedía el análisis cuantitativo de los títulos de *C. difficile*.

25 Para el análisis estadístico en este estudio y los estudios anteriores, los datos de neutralización se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando GraphPad Prism (Software GraphPad, v. 4.0 San Diego, CA). Se utilizaron pruebas t de dos lados o pruebas de log-rank para la comparación de medias o datos de supervivencia, respectivamente.

30 Los resultados del estudio indican que el tratamiento de animales infectados con *C. difficile* con la combinación de los mAb humanizados PA-50 y PA-41 a ambos niveles de dosis protegió de manera efectiva y duradera a los hámsteres de enfermedades graves, tanto inicialmente como posterior a la recaída de la enfermedad. La duración del beneficio del tratamiento de combinación de mAb humanizado (40 días) mejoró significativamente la supervivencia a largo plazo de los animales en comparación con el tratamiento con vancomicina o los mAb comparadores anti-toxina A y anti-toxina B como controles.

35 Como se evidencia por los estudios en animales *in vivo*, el tratamiento combinado con una combinación de mAb humanizados PA-50/PA-41 fue altamente eficaz contra la infección por *C. difficile* en el modelo bien establecido de hámster sirio dorado para CDI y terapia. Un curso corto de tratamiento con PA-50/PA-41 resultó en una supervivencia del 95% a los 39 días posteriores a la infección, en comparación con una supervivencia del 0% para los animales que no habían recibido tratamiento, terapia antibiótica estándar o los mAb comparadores. A los 39 días después de la infección, los animales tratados con PA-50/PA-41 tenían pesos normales y no tenían lesiones gastrointestinales obvias. *C. difficile* no pudo recuperarse de la mayoría de los animales, lo que refleja una eliminación $> 7\text{-log}_{10}$ en relación con los animales no tratados. Una explicación probable para estos hallazgos es que la neutralización de toxinas mediada por mAb en ausencia de antibióticos permitió que se restableciera una flora microbiana protectora en los tractos gastrointestinales de los animales.

45 Se ha reportado que la toxina A o la toxina B solas pueden causar una enfermedad mortal en el modelo de hámster de CDI, y los mAb para ambas toxinas generalmente se requieren para la máxima eficacia del tratamiento. En los estudios descritos anteriormente, los mAb murinos PA-50 y PA-41 no mostraron beneficios de supervivencia cuando se usaron individualmente a dosis de 50 mg/kg en el modelo de hámster, lo que subraya el requisito de tratamiento combinado.

50 En general, en este estudio con hámsteres, similar a los hallazgos descritos anteriormente utilizando combinaciones de mAb murino, se demostró que las combinaciones de mAb humanizados de la invención protegían eficaz y duraderamente a los hámsteres de la mortalidad en el modelo riguroso de hámster de infección por *C. difficile*. Sin desear limitarse a la teoría, estos hallazgos respaldan un mecanismo de acción mediante el cual las combinaciones de mAb humanizadas protegieron a los animales de la enfermedad de *C. difficile*, y/o permitieron a los animales generar una respuesta contra la infección por *C. difficile*, por un tiempo suficientemente largo para permitir el crecimiento y la repoblación de la flora intestinal normal en los animales tratados con mAb humanizados, brindando así protección terapéutica a los animales infectados, resolución efectiva de la enfermedad asociada a *C. difficile* y restauración de la salud gastrointestinal y la supervivencia.

60 Ejemplo 6

Unión de mAb a regiones de toxina A y toxina B de *C. difficile*

65 Se realizaron experimentos para determinar las regiones del epítipo de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* a las que se unen los mAb de la invención. Tanto la toxina A como la toxina B producidas por *C. difficile* tienen

aproximadamente 300 kDa y comparten una secuencia y una homología estructural considerables. Ambos tienen un dominio de unión al receptor del terminal C que contiene oligopéptidos repetitivos clostridiales (CROP), un dominio hidrofóbico central que se cree que causa la formación de poros y media la inserción de la toxina en la membrana del endosoma y un dominio proteolítico que escinde el dominio enzimático del terminal N, permitiendo así que la glucosiltransferasa ingrese al citosol. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las toxinas de *C. difficile*, así como otras proteínas de *C. difficile*, se han publicado y también están disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (es decir, www.ncbi.nlm.nih.gov). Por ejemplo, para la cepa VPI 10463 de *C. difficile*, las secuencias de ADN que codifican la toxina A y la toxina B se pueden encontrar con el N° de Acceso x92982 del NCBI; además, el número de acceso NC_009089 del NCBI, región 795842-803975 proporciona la secuencia de ADN para la toxina A de la secuencia del genoma completo del cromosoma de 630 de *C. difficile*, mientras que el número de acceso NC_009089 del NCBI, región 787393-794493 proporciona la secuencia de ADN que codifica la toxina B de la secuencia del cromosoma de 630 de *C. difficile*.

A. Mapeo del dominio de unión al anticuerpo de la toxina B de *C. difficile*

La toxina B de *C. difficile* de longitud completa consta de tres dominios principales: un dominio de enzima del terminal N que procesa la actividad glucosiltransferasa (GT) (63 kDa) y una unión al receptor de células del terminal C (59 kDa), que están en cada extremo de un dominio putativo de translocación (148 kDa) (Figuras 17A y C). Se generaron varios fragmentos de toxina B a través de escisión enzimática de la toxina B de longitud completa usando la enzima caspasa 1 (Figura 17C). Después del tratamiento de la toxina B con caspasa 1 (relación enzima/toxina ~1 U/μg de toxina) a 37 °C durante 96 horas, se produjeron cuatro fragmentos principales, incluidos dos fragmentos que contienen el terminal C (193 y 167 kDa) y dos fragmentos que contienen el terminal N (103 y 63 kDa) como se detecta a través de SDS-PAGE (Figura 17B). Otros fragmentos más pequeños, tales como 26 y 14 kDa, también parecen generarse, pero no son detectables en el análisis de gel de acetato de Tris al 3-8%.

Se realizaron análisis de SDS-PAGE y transferencia Western en la toxina B que no se trató o se trató con caspasa 1 (Figuras 18A-C). El mAb PA-41 reconoció los fragmentos de 103 kDa y 63 kDa de la toxina B tratada con caspasa 1 (carril derecho en la Figura 18B), lo que indica que el PA-41 se une al dominio enzimático del terminal N de la toxina B. El análisis de secuenciación del terminal N confirmó que PA-41 se une al dominio enzimático del terminal N de 63 kDa de la toxina B. Es interesante observar que una banda de 63 kDa en la toxina B no tratada (carril izquierdo, Figura 18B) no fue reconocida por PA-41, lo que sugiere que dos fragmentos con el mismo peso molecular (63 kDa) en los carriles parecen ser proteínas diferentes.

El mAb PA-39 se unió al fragmento de 167 kDa de la toxina B tratada con caspasa 1 (Figura 18C, carril derecho), así como a una proteína de 63 kDa en la preparación de toxina B no tratada (Figura 18C, carril izquierdo), lo que sugiere que PA-39 se une a un epítipo en el dominio de translocación de la toxina B. Por lo tanto, con base en los resultados de los análisis de SDS-PAGE/transferencia Western de la toxina B de *C. difficile* tratada con caspasa 1, se observó que los mAb PA-41 y PA-39 interactúan de manera diferente con la toxina B. Mientras que se encontró que el mAb PA-41 se unía a un epítipo en el dominio enzimático del terminal N de la toxina B, el mAb PA-39 se unía a un epítipo en el dominio de translocación de la toxina (amino ácidos 850-1330). Estos hallazgos también fueron confirmados por SDS-PAGE/transferencia Western de fragmentos de toxina B usando digestión con enteroquinasa.

La unión competitiva de los mAb anti-toxina B a la toxina B también se realizó usando Biacore. Como se ve en las Figuras 19A-E, los mAb PA-39 y PA-41 se unen a diferentes regiones epitópicas de la toxina B. Se observó que los mAb murinos PA-39 y PA-41 se unen a un solo sitio o epítipo en la toxina B; no se encontró que estos mAb se unieran al dominio de unión del receptor de células en el terminal C (CRB). Para PA-41 murino, la afinidad de unión a la toxina B fue de 0,59 mM. Además, el sitio en la toxina B unido por PA-41 no bloqueó la unión del mAb comparador anti-toxina B CDB-1 (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), (Figura 19D). Estos resultados están de acuerdo con los resultados de los análisis de transferencia Western. Como se observa en las Figuras 19C y E, el mAb comparador anti-toxina B CDB-1 se une a la toxina B en epítipos diferentes de los de los mAb PA-39 y PA-41.

B. Mapeo del dominio de unión a anticuerpos de la toxina A de *C. difficile*

La toxina A de longitud completa de *C. difficile* tiene un peso molecular de 310 kDa (Figura 20A) y contiene tres dominios principales: un dominio de procesamiento enzimático del terminal N que tiene actividad glucosiltransferasa (GT) (~63kDa) y un dominio CRB del terminal C (~101 kDa), que están en cualquier extremo de un dominio hidrofóbico (~144 kDa).

Se generaron varios fragmentos de toxina A a través de la escisión enzimática de la toxina de longitud completa usando la enzima enteroquinasa (EK). Después del tratamiento de la toxina A con enteroquinasa (relación enzima/toxina: aproximadamente 3 mU/μg de toxina) a 25 °C durante 48 horas, se produjeron nueve fragmentos principales, incluidos cuatro fragmentos del terminal C (~223, ~158-160, ~91 y ~68 kDa) y tres fragmentos del terminal N (~195, ~181 y ~127 kDa). También se observaron fragmentos más pequeños (~53 y ~42 kDa). (Figuras 20 B y C).

Se realizaron análisis de SDS-PAGE y transferencia Western en la toxina A que no se trató o se trató con enteroquinasa (Figuras 21A-C). La toxina A de longitud completa y sus fragmentos que tienen pesos moleculares de

~223, ~158-160, ~91 y ~68 kDa fueron reconocidos por el mAb PA-50 (Figura 21B); la secuenciación del terminal N confirmó que el fragmento de 68 kDa contiene parte del dominio de unión al receptor del terminal C (CRB). El patrón de unión del mAb PA-50 sugiere que el mAb se une a los fragmentos de la toxina A que contienen el terminal C. En conjunto, los resultados indican que el mAb PA-50 se une a los epítomos de unión al receptor del terminal C en la toxina A. El mAb PA-39 unido a los fragmentos que contienen el terminal C (~223 y ~158-160 kDa), así como un fragmento que contiene el terminal N de ~181 kDa (Figura 21C), lo que indica que el mAb PA-39 une un epítomo en una región exterior del dominio de unión al receptor de la toxina A. También se identificaron múltiples sitios de unión (al menos dos sitios de unión) en un mAb PA-50 y un estudio de interacción con la toxina A utilizando un ensayo Biacore (Figura 22A-1). En los estudios de comparación que utilizan el análisis Biacore, PA-50 murino inmovilizado se unió específicamente a la toxina A con una afinidad de 0,16 nM. También se encontró que después de ser capturado en el chip del sensor por el mAb PA-50 murino, la toxina A podía unirse a un PA-50 adicional y, posteriormente, un mAb comparador anti-toxina A CDA-1 (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), (Figura 22A-2). Además, la toxina A capturada por el mAb comparador anti-toxina A CDA-1 en el chip Biacore se unió adicionalmente al mAb CDA-1 y PA-50 adicionales, lo que indica que el mAb comparador CDA-1 se une a múltiples repeticiones en la toxina A, que son diferentes de los epítomos de unión a mAb PA-50 en la toxina A (Figura 22B). Por lo tanto, según se determina a partir de estos resultados, el epítomo de mAb PA-50 está presente en múltiples copias en la toxina A y no se superpone con el epítomo para CDA-1. Además, el mAb PA-39 se unió al epítomo o epítomos en la toxina A diferente del epítomo o epítomos de la toxina A unido por el mAb comparador CDA-1 (Figura 22C). Se encontró que los mAb PA-39 y PA-50 se unen a diferentes epítomos en la toxina A (Figura 22D). El análisis de transferencia Western mostró que PA-39 y el mAb comparador CDA-1 tienen diferentes patrones de unión a la toxina A tratada con EK, lo que indica diferentes dominios de unión y diferentes epítomos en la toxina A (Figura 22E). El análisis de transferencia Western mostró que PA-50 y el mAb comparador CDA-1 se unen al mismo dominio de la toxina A tratada con EK (Figura 22F), pero a diferentes epítomos (Figura 22B).

Como se describe en A y B de este ejemplo, los sitios de unión para los mAb murinos PA-50 y PA-41 se localizaron en regiones específicas de las toxinas por proteólisis limitada de las toxinas seguido de transferencia Western. El mAb murino PA-50 reconoció la toxina A de longitud completa y varios productos de escisión de enteroquinasa, incluido un gran fragmento de 223 kDa y fragmentos del terminal carboxilo de 68, 91 y 160 kDa de tamaño (Figura 22F). La secuenciación del terminal N confirmó que el fragmento de 68 kDa corresponde al dominio del terminal carboxilo de la toxina A. Los mismos fragmentos fueron reconocidos por el mAb comparador CDA-1. El mAb murino PA-41 se unió a la toxina B de longitud completa, así como a los fragmentos del terminal amino de 63 y 103 kDa generados por la digestión con caspasa-1 (Figura 18B), mientras que el mAb comparador CDB-1 reconoció un conjunto distinto de productos de escisión de caspasa-1. La secuenciación del terminal N confirmó que el fragmento de 63 kDa corresponde al dominio del terminal amino de la toxina B. Colectivamente, los datos indican que mPA-50 se une a múltiples sitios dentro del dominio de unión al receptor de la toxina A, y mPA-41 se une a un solo sitio dentro del dominio enzimático de la toxina B.

Ejemplo 7

Los mAb anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* – Estudios del mecanismo de acción

A. Ensayos *in vitro* basados en células utilizados para los estudios del mecanismo de acción.

Para evaluar el mecanismo de acción de los mAb anti-toxina, se realizaron ensayos *in vitro* usando diferentes concentraciones de toxina A o toxina B. Estos ensayos utilizaron células CHO-K1 o T-84, como se describe en el Ejemplo 3 más arriba.

Brevemente, el ensayo CHO-K1 se usó para evaluar la potencia de neutralización de los mAb anti-toxina A y anti-toxina B (PA-39 y PA-41). Se sembraron células CHO-K1 (2.000 células/pozo) en placas de 96 pozos. Se permitió que las células se unieran durante 4 horas antes del tratamiento. Se incubaron diferentes concentraciones (60, 30, 15 o 6 ng/mL) de toxina de *C. difficile* (cepa VPI 10463) con mAb diluidos en serie, mezclados en placas de fondo redondo de 96 pozos durante 1 hora a 37 °C y luego se agregaron las mezclas a las placas de cultivo celular. Después de la incubación durante 72 horas, se añadieron 20 µL/pozo de CellTiter-Blue; las mezclas se incubaron durante 4 horas adicionales; y se midió el porcentaje de supervivencia celular en comparación con los controles.

El ensayo de citotoxicidad con T-84 también se usó para evaluar la potencia de neutralización de los mAb anti-toxina A. Se sembraron células T-84 (línea celular de carcinoma de colon humano) (15.000 células/pozo) en placas de 96 pozos. Se permitió que las células se unieran durante 4 horas antes del tratamiento. Se incubaron diferentes concentraciones (240, 120, 60 o 30 ng/mL) de toxina de *C. difficile* (cepa VPI 10463) con mAb diluidos en serie, se mezclaron en placas de fondo redondo de 96 pozos durante 1 hora a 37 °C y las mezclas fueron luego agregadas a las placas de cultivo celular. Después de la incubación durante 72 horas, se añadieron 20 µL/pozo de CellTiter-Blue; las mezclas se incubaron durante 4 horas adicionales; y se midió el porcentaje de supervivencia celular en comparación con los controles.

B. ELISA que muestra que los mAb anti-toxina A previenen la internalización de la toxina A en las células

En un experimento diseñado para evaluar adicionalmente el mecanismo de acción de mAb anti-toxina de *C. difficile*, cada anticuerpo de prueba (PA-39, PA-50, mAb comparador anti-toxina A CDA-1 y un control de anticuerpo policlonal de cabra anti-toxina A) se mezcló e incubó durante 1 hora a 100x su valor EC₉₀ con una concentración CC₉₀ de toxina A para las células Vero para asegurar la neutralización completa a una concentración altamente citotóxica de toxina A. La mezcla se incubó luego con células Vero a 37 °C durante 15 minutos. Luego se lavaron las células con PBS, se fijaron y se permeabilizaron. Se usó un anticuerpo (PA-38) anti-toxina A, marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP), que no compite por la unión con los anticuerpos probados, para detectar la toxina A internalizada y se detectó usando quimioluminiscencia (Figura 31G). En este ensayo, la sonda solo detectaría la toxina A que se ha unido y se ha internalizado en la célula, produciendo así una señal quimioluminiscente basada en una reacción quimioluminiscente de HRP. La detección quimioluminiscente utiliza una enzima para catalizar una reacción (es decir, la oxidación catalizada de luminol por peróxido) entre la enzima HRP y su sustrato en presencia de peróxido que da como resultado la generación de luz visible. El luminol oxidado emite luz a medida que se desintegra a su estado fundamental. Una vez que el sustrato es catalizado por HRP, la señal luminosa se cuantifica mediante un luminómetro (Analyst GT).

C. Resultados de la actividad de neutralización y estudios MOA

Los mAb anti-toxina A

En el ensayo de citotoxicidad celular usado para evaluar la actividad de neutralización y el mecanismo de acción para los anticuerpos anti-toxina A, se añadió toxina A en concentraciones crecientes a las células, como se describió anteriormente en la Sección A de este Ejemplo. Los resultados de estos experimentos en los que se evaluó la neutralización de la toxina A por los mAbs anti-toxina A PA-39, PA-50 y el mAb comparador CDA-1 se muestran en las Figuras 31B-D y en la siguiente Tabla A a continuación.

Tabla A. Resultados del experimento de potencia de la toxina A y porcentaje máximo de inhibición

mAb	[Toxina A] (ng/mL)	[EC ₅₀]* (nM)	Porcentaje máximo de inhibición
PA-39	60	0,340	69
	30	0,080	86
	15	0,003	96
	6	0,002	97
PA-50	240	0,91	105
	120	0,54	100
	60	0,27	114
	30	0,10	118
mAb comparador CDA-1	240	9,0	52
	120	6,6	74
	60	5,1	103
	30	2,0	110

*: EC₅₀ se calculó como el porcentaje del 50% de inhibición máxima en los casos en que las curvas no alcanzaron el 100% de control.

Como se observa a partir de los datos presentados en la Tabla A, la actividad *in vitro* de mAb PA-39 en el ensayo de potencia de toxina muestra cambios tanto en EC₅₀ como en el porcentaje de inhibición máximo a medida que se agrega más toxina A al cultivo, lo que indica un mecanismo competitivo mixto de inhibición para PA-39. La detección por ELISA de la toxina A después de la protección por un exceso de 100 veces de PA-39 confirmó que la inhibición de la toxina por PA-39 se produce al prevenir la internalización de la toxina y el efecto de la toxina citocelular. La actividad *in vitro* del mAb PA-50 en el ensayo de potencia de la toxina muestra un cambio en la EC₅₀ a medida que se agrega más toxina A al cultivo, lo que indica un mecanismo competitivo de inhibición para PA-50. La detección por ELISA de la toxina A después de la protección por un exceso de 100 veces de PA-50 confirmó que la inhibición de la toxina por PA-50 se produce al prevenir la internalización de la toxina.

Los mAb anti-toxina B

En el ensayo de citotoxicidad celular usado para evaluar la potencia de neutralización y el mecanismo de acción para los anticuerpos anti-toxina B, se añadió toxina B en concentraciones crecientes a las células, como se describe en la Sección A de este Ejemplo. Los resultados de los experimentos de potencia en los que se evaluó la neutralización de la toxina B por los mAb anti-toxina B PA-41 y el mAb comparador CDB-1 se muestran en las Figuras 31E y F y en la Tabla B a continuación. Como se observa a partir de los datos presentados en la Tabla, la actividad *in vitro* de PA-41 en el ensayo de potencia de la toxina muestra cambios tanto en la EC₅₀ como en el porcentaje máximo de inhibición a medida que se agrega más toxina B al cultivo, lo que indica un mecanismo competitivo mixto de inhibición de PA-41.

Tabla B. Resultados del experimento de potencia de la toxina B y porcentaje máximo de inhibición

mAb	[Toxina B] (pg/mL)	[EC ₅₀]* (nM)	Porcentaje máximo de inhibición
PA-41	20	0,82	49
	10	0,33	80
	5	0,13	96
	2	0,05	96
mAb Comparador CDB-1	20	4,1	23
	10	3,0	51
	5	1,1	75
	2	0,2	95

*: EC₅₀ se calculó como un porcentaje máximo de inhibición del 50% en los casos en que las curvas no alcanzaron el 100% de control.

5 Con base en los ensayos descritos anteriormente en este ejemplo, un inhibidor que tiene la capacidad de neutralizar completamente concentraciones crecientes de toxina A o toxina B simplemente mediante la adición de mayores concentraciones de inhibidor mostraría un cambio en la EC₅₀ a medida que se une más anticuerpo y neutraliza las concentraciones más altas de toxina y, por lo tanto, se consideraría un inhibidor competitivo. Un inhibidor que no puede superar los efectos tóxicos de las concentraciones crecientes de toxina exhibiría un efecto porcentual máximo reducido a concentraciones más altas de inhibidor, pero no mostraría un cambio en la EC₅₀ y, por lo tanto, se consideraría un inhibidor no competitivo. Además, un inhibidor que muestra tanto un cambio en la EC₅₀ como un efecto porcentual máximo reducido como resultado del aumento de las concentraciones de inhibidor a concentraciones más altas de toxina se consideraría un inhibidor competitivo mixto. Hasta cierto punto, la evaluación del mecanismo de acción utilizando ensayos de citotoxicidad celular debe realizarse teniendo en cuenta el error involucrado en la repetibilidad del ensayo y la citotoxicidad de fondo observada en los pozos de control que no contienen inhibidor, lo que afecta la meseta del porcentaje de inhibición máximo. En consecuencia, se puede observar un ligero desplazamiento hacia la derecha en los valores de EC₅₀ a medida que aumentan las concentraciones de toxina debido a estos efectos.

20 De acuerdo con lo anterior, para la neutralización de la toxina A y MOA, el mAb PA-39 se considera un inhibidor competitivo mixto debido al cambio en la EC₅₀ y la meseta baja observada para las curvas de citotoxicidad de PA-39 (Figura 31B), así como en el efecto porcentual máximo reducido calculado en la Tabla A. Estos datos están respaldados por los resultados de ELISA (Figura 31H), que muestran un grado de efecto citotóxico a altas concentraciones de PA-39, lo que indica que al menos algún MOA de PA-39 ocurre intracelularmente. Se observa que el mAb PA-50 es un inhibidor competitivo como lo demuestra el desplazamiento hacia la derecha en los valores de EC₅₀ observados en las curvas de ensayo de citotoxicidad (Figura 31C) y por los datos presentados en la Tabla A que muestran un cambio mínimo en el porcentaje de inhibición máximo. Estos datos están respaldados por los resultados de ELISA (Figura 31H), que muestran la inhibición completa de la unión a la toxina A y la internalización a altas concentraciones de PA-50.

30 Como se observa en la Figura 31D, el mAb comparador CDA-1 muestra un cambio mínimo en EC₅₀, pero una reducción considerable del efecto porcentual máximo a medida que aumenta la toxina. Cuando los resultados mostrados en la Figura 31D se consideran con los datos presentados en la Tabla A, el mAb comparador de CDA-1 demuestra un mecanismo de acción no competitivo, ya que toda su actividad se observa fuera de la célula. Es probable que el impedimento estérico de la unión a la toxina y la internalización celular sea responsable de producir los gráficos de datos en la Figura 31D, lo que respalda un MOA no competitivo para el mAb comparador CDA-1.

35 De acuerdo con lo anterior para la neutralización de la toxina B y MOA, se considera que el mAb PA-41 exhibe un mecanismo de acción competitivo mixto debido al desplazamiento hacia la derecha de los valores de EC₅₀ y el efecto porcentual máximo reducido observado tanto en la Figura 31E como en los datos presentados en la Tabla B.

40 Los resultados observados para el mAb PA-41 están en contraste con los observados para el mAb comparador CDB-1, que muestra un efecto porcentual máximo reducido, pero un menor grado de cambio de EC₅₀. En este caso, el mecanismo de acción para la actividad del mAb comparador contra la toxina B es menos claro, particularmente en vista de las consideraciones de error mencionadas anteriormente.

45 **Ejemplo 8**

Prueba de los mAb de la invención contra un panel de aislados o cepas de *C. difficile*, que incluyen aislados o cepas hipervirulentas

50 Para evaluar la capacidad de los mAb anti-toxina A y anti-toxina B de *C. difficile* de la invención para neutralizar toxinas de una amplia gama de aislados relevantes de *C. difficile*, se probó la actividad de neutralización de los mAb contra una colección de veinte aislados o cepas de *C. difficile* clínicos, toxigénicos, incluidos los aislados hipervirulentos de

BI/NAP1/027. Dado que *C. difficile* exhibe una considerable heterogeneidad entre cepas en los genes que codifican las toxinas A y B, estos estudios se llevaron a cabo para examinar la amplitud de la neutralización de toxinas por los mAb descritos, y en particular, los mAb PA-50 y PA-41.

5 Se seleccionó un panel de aislados tóxicos clínicos de *C. difficile* (Tabla 6) para la diversidad geográfica y genética basada en análisis de toxinotipo, ribotipo y endonucleasa de restricción de una colección internacional de aislados o cepas de *C. difficile* mantenidos en TechLab (Blacksburg, VIRGINIA).

10 Como se clasifica en la Tabla 6, las cepas de *C. difficile* incluyen 3 cepas de referencia (VPI 10463 (ATCC 43255), 630 (ATCC BAA-1382) y 545 (ATCC 43596), seis cepas de BI/NAP1/027 derivadas de un hospital (CCL678, HMC553, Pitt45, CD196, 5, 7.1), dos cepas de toxina A-/toxina B+ (tcdA-tcdB+) (F1470, 8864), tres aislados de pacientes externos (MH5, CCL13820 y CCL14402) y otros aislados clínicos frecuentes (Pitt2, CCL14137, UVA17, UVA30/TL42, Pitt102, Pitt7). Además, los aislados 13 (CCL13820) y 19 (Pitt 102), que se clasifican como "aislados de pacientes externos" y "aislado clínico frecuente (diferente del Ribotipo 027)", respectivamente, en la Tabla 6 también están las cepas toxA-/toxB+. Los sobrenadantes de cultivo que contienen estas toxinas de *C. difficile* se produjeron en TechLab, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4 °C. La presencia de las toxinas en los sobrenadantes del cultivo se confirmó usando el kit de Toxina/Antitoxina de *C. difficile* (TechLab) y el ensayo de citotoxicidad.

20 La actividad citotóxica de cada sobrenadante de cultivo que contiene toxina para células CHO-K1 (utilizadas para determinar la actividad de toxina B de sobrenadantes de cultivo) y células T-84 (utilizadas para determinar la actividad de toxina A de sobrenadantes de cultivo) se evaluó tratando células con sobrenadantes de cultivo valorados.

Tabla 6. Aislados/cepas de *C. difficile* utilizados para generar sobrenadantes

No	Cepa	Categoría	Ribo tipo	Tipo de toxina	Tipo REA	Año	Ubicación
1	VPI 10463 ATCC 43255	Cepas de referencia A+B+	003	0	No conocido	~1975	EE. UU.
2	ATCC BAA-1382		No conocido	No conocido	No conocido	1982	Suiza
3	545 ATCC 43596		No conocido	No conocido	No conocido	No conocido	Lovaina, Bélgica
4	CCL 678	Ribotipo (aislados de hospital)	027	III	BI	2007	Virginia, EE. UU.
5	HMC553					2008	Pensilvania, EE. UU.
6	Pitt 45					2001-2002	Pensilvania, EE. UU.
7	Cd 196					1988	Paris, Francia
8	5					2004	Quebec, Canadá
9	7.1					2004	Quebec, Canadá
10	F1470	Cepas tcdA-tcdB+	017	VIII	CF1	1990	Lovaina, Bélgica
11	8864 CUG 20309		036	X	CY1	1986	Birmingham, Inglaterra
12	MH 5	Aislados de pacientes externos	001	No conocido	No conocido	2008	Virginia, EE. UU.
13	CCL13820		017	VIII	CF	2008	Virginia, EE. UU.
14	CCL 14402		027	III	BI	2008	Virginia, EE. UU.
15	Pitt 2	Aislados clínicos frecuentes (distinto del ribotipo 027)	001	No conocido	J	2001-2002	Pensilvania, EE. UU.
16	CCL 14137		001	No conocido	J	2008	Virginia, EE. UU.
17	UVA17		002	No conocido	G	2006-2007	Virginia, EE. UU.
18	UVA30/TL42		014	No conocido	Y	2006-2007	Virginia, EE. UU.

19	Pitt 102		017	VIII	CF	2001-2002	Pensilvania, EE. UU.
20	Pitt 7		078	V	BK	2001-2002	Pensilvania, EE. UU.

Para probar las actividades neutralizantes de los mAb de la invención, se usaron sobrenadantes de cultivo que contenían toxinas a la dilución máxima que dio como resultado una pérdida de viabilidad celular $\geq 95\%$. Los sobrenadantes de toxina se mezclaron previamente con diversas concentraciones de los mAb durante 1 hora y luego se añadieron a las células para incubación a 37 °C durante 72 horas. La viabilidad celular se midió usando CellTiter Blue (Promega). El porcentaje de supervivencia de los pozos tratados se comparó con el de los pozos de control no tratados y se graficaron para calcular las actividades de neutralización *in vitro* (EC_{50}) de los mAb. En una primera serie de experimentos, la Figura 23A muestra la actividad del mAb PA-41 en la neutralización de los sobrenadantes que contienen toxinas usando células CHO-K1. PA-41 neutralizó de forma potente (EC_{50} varió de $1,1^{-11}$ M a $6,5^{-10}$ M) sobrenadantes de todas las cepas toxigénicas de *C. difficile*, incluidas todas las cepas hipervirulentas, con la excepción de tres cepas de toxina A-/toxina B+. Se ha informado que existen diferencias de secuencia significativas en los dominios enzimáticos de la toxina A-/toxina B+ de las cepas convencionales de *C. difficile*. Debido a que PA-41 se une al dominio enzimático de la toxina B, la diversidad de secuencia en este dominio puede explicar la actividad neutralizante menos efectiva de PA-41 contra la toxina B de las dos cepas de toxina A-/toxina B+. También se realizaron experimentos para evaluar la actividad tanto de hPA-41 como de mAb humano comparador anti-toxina B, CDB-1 (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), contra cepas hipervirulentas de *C. difficile* en la línea celular CHO-K1. En estos estudios, se observó que hPA-41 mostró una actividad de neutralización significativa contra los sobrenadantes de las 6 cepas de BI/NAP1/027, mientras que el mAb comparador CDB-1 mostró una actividad mínima (Figura 23B). También en estos estudios, se observó que la actividad de neutralización del mAb hPA-41 era > 1.000 veces que la del mAb comparador CDB-1 en la neutralización de la toxicidad de las cepas BI/NAP1/027. La actividad de neutralización del mAb hPA-41 y el comparador CDB-1 para las 2 cepas de referencia (VPI 10463 y ATCC 43596) y 6 cepas BI/027/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 y Montreal 7.1) es ilustrado en la Figura 23B. En estos estudios, se descubrió que hPA-41 era inactivo contra tres aislados del Ribotipo 017 (Tabla 6) que son toxina A-/B+, aunque el mAb anti-toxina B hPA-41 exhibió una actividad de neutralización significativamente mayor que el mAb comparador contra otras cepas en el panel

La actividad del mAb PA-50 en la neutralización de los sobrenadantes que contienen toxina A de cultivos de *C. difficile* usando células T-84 varió de $2,6^{-12}$ M a $7,7^{-11}$ M como se muestra en la Figura 24A. PA-50 neutralizó completamente los sobrenadantes de todas las cepas disponibles que producen toxina A, incluidas las cepas hipervirulentas. PA-50 no neutralizó las cuatro cepas de toxina A-/toxina B+ (F1470, 8864, CCL13820, CCL14402), ya que estas cepas no producen ninguna toxina A. hPA-50 también fue significativamente más eficaz en neutralizar la actividad de las cepas restantes en el panel. En otros estudios comparativos, se encontró que la actividad de neutralización de hPA-50 contra las 6 cepas de BI/NAP1/027 de *C. difficile* que produce toxina-A era 100 veces mayor que la del mAb comparador CDA-1 (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), (Figura 24B). La hPA-50 también mostró una mayor actividad de neutralización que el mAb comparador CDA-1 contra las cepas de referencia productoras de toxina A de *C. difficile* VPI 10463 y 545. De manera similar, el mAb PA-39 neutralizó la toxina A en sobrenadantes de cultivos de *C. difficile* con valores de EC_{50} que varían desde $7,7^{-12}$ M a $4,8^{-8}$ M, como se muestra en la (Figura 25A). Como se ve para el mAb PA-50, las cuatro cepas de toxina A/toxina B+ no fueron neutralizadas por PA-39. Además, los resultados de estudios comparativos demostraron que la actividad de neutralización del mAb PA-39 frente a las 6 cepas de BI/NAP1/027 fue 100 veces mayor que la del mAb humano comparador anti-toxina A CDA-1; PA-39 también mostró una actividad significativamente más neutralizante contra las cepas restantes en el panel (Figura 25B). Se observa que una cepa de toxina, CCL14402, no redujo la viabilidad de las células T-84 lo suficiente como para permitir una medición precisa de la actividad de neutralización del mAb en el ensayo.

En estos estudios, la línea celular CHO-K1, hPA-41 mostró altos niveles de actividad de neutralización contra los sobrenadantes de las 6 cepas de BI/NAP1/027, mientras que el mAb comparador CDB-1 mostró una actividad mínima. Se observó que el PA-41 humanizado tenía una actividad de neutralización 1.000 veces mayor que la del mAb comparador CDB-1 para neutralizar las cepas hipervirulentas BI/NAP1/027 de *C. difficile*. Las actividades de neutralización de hPA-41 y CDB-1 en estos estudios contra las 2 cepas de referencia (VPI 10463 y ATCC 43596) y 6 cepas BI/027/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 y Montreal 7.1) se ilustran en la Figura 23B. De manera similar, hPA-41 mostró una actividad de neutralización significativamente mayor en estos estudios en comparación con el mAb comparador CDB-1 contra las otras cepas en el panel, con la excepción de tres aislados de Ribotipo 017, que son toxina A-/B+. Se realizaron experimentos similares para evaluar la actividad de neutralización de hPA-39 y la del mAb humano comparador anti-toxina A CDA-1 en células T-84. Los resultados mostraron que la neutralización de las 6 cepas de BI/NAP1/027 por hPA-39 fue 100 veces mayor que la del mAb comparador CDA-1 (Figura 25B). El PA-39 humanizado también mostró una actividad de neutralización significativamente mayor en los estudios que el mAb comparador CDA-1 contra las cepas restantes en el panel. Por lo tanto, los mAb hPA-41 y hPA-39 mostraron altos niveles de actividad de neutralización de la cepa hipervirulenta anti-*C. difficile* contra todas las cepas analizadas. Esto indica que los epítomos reconocidos por estos mAb humanizados están altamente conservados en diversas cepas.

Similar a la Tabla 6, la Tabla 7 presenta los resultados de los experimentos de neutralización de la toxina de *C. difficile* *in vitro* descritos anteriormente, mostrando el panel de cepas toxigénicas de *C. difficile* aisladas de Norteamérica y Europa y los valores de EC₅₀ resultantes generados por los mAb humanizados anti-toxina y los mAb comparadores CDA-1 y CDB-1. El panel incluye los ribotipos 001, 002, 003, 012, 014, 017, 027 y 078 en proporción aproximada a las tasas observadas clínicamente (94, 95), con la excepción de las cepas de ribotipo 017 *tcdA*⁻*tcdB*⁺, que están sobre representados en el panel. Los sobrenadantes de las cepas *tcdA*⁻*tcdB*⁺ se usaron como herramientas para identificar células que eran refractarias a la muerte por sobrenadantes que contenían la toxina B sola, y por lo tanto serían adecuadas para examinar la citotoxicidad mediada por la toxina A. VPI10463 se incluyó en el panel y permitió la comparación de los resultados obtenidos con toxinas purificadas y no purificadas.

En estos estudios, el mAb humanizado PA-50 neutralizó la toxina A de una manera independiente de la cepa. La mediana del valor de EC₅₀ fue de 32 pM (intervalo: 20 a 127 pM, Tabla 7), y se observaron curvas pronunciadas de dosis-respuesta con pendientes de Hill que típicamente eran mayores que dos (Figura 25C). PA-50 fue más activo que CDA-1 contra cada uno de los aislados de prueba. La mayor diferencia en potencia se observó para las cepas hipervirulentas 027, para las cuales PA-50 fue aproximadamente 1.000 veces más potente que CDA-1 (P = 0,0002), y para una cepa del ribotipo 078 incluida en el panel.

El mAb humanizado PA-41 inhibió potentemente cada una de las cepas *tcdA*⁻*tcdB*⁺ con un valor medio de EC₅₀ de 23 pM (intervalo: 7,7 a 129 pM, Tabla 7), y se observó una neutralización esencialmente completa a mayores concentraciones (Figura 25D). PA-41 fue generalmente más eficaz que CDB-1 contra las cepas *tcdA*⁻*tcdB*⁺ y fue aproximadamente 500 veces más potente contra las cepas hipervirulentas 027 (P = 0,003). CDB-1, pero no PA-41, fue eficaz para neutralizar la toxina B de las cepas *tcdA*⁻*tcdB*⁺ del ribotipo 017. Finalmente, PA-41 y PA-50 exhibieron actividades similares contra formas de toxina crudas y purificadas de la cepa de referencia VPI 10463 (Tabla 7 y Figuras 25C y 25D).

Tabla 7 Neutralización de las toxinas de diversas cepas de *C. difficile* *in vitro*

Ribotipo	Cepa	EC ₅₀ , pM			
		mAb anti-toxina A		mAb anti-toxina B	
		PA-50	CDA1	PA-41	CDB1
001	CCL14137	39	611	9,7	129
001	MH5	127	384	18	73
001	Pitt 2	27	247	13	92
002	UVA 17	26	825	129	671
003	VPI 10463	20	1271	7,7	136
012	545	38	4552	15	153
012	630	54	1019	111	1782
014	UVA30/TL42	51	625	21	324
017	CCL13820	N/A	N/A	> 10 ⁵	72
017	F1470	N/A	N/A	> 10 ⁵	46
027	Pitt 102	N/A	N/A	> 10 ⁵	8,1
027	CCL678	29	58925	77	> 10 ⁵
027	CCL14402	ND	ND	19	4678
027	CD196	61	132600	16	9812
027	HMC553	29	109000	24	14730
027	Montreal 5	29	87090	36	25810
027	Montreal 7.1	31	109400	29	16800
027	Pitt 45	43	108100	29	26510
078	Pitt 07	32	> 10 ⁵	59	8415

Como se muestra en este ejemplo, los mAb humanizados PA-50 y PA-41 mostraron un alto nivel de actividad de neutralización contra las toxinas A y B de *C. difficile*, respectivamente, de cepas genéticamente diversas representativas de la epidemia actual de CDI. La amplitud de actividad de estos mAb es notable a la luz de la variación genotípica y fenotípica dentro de las toxinas. En particular, las toxinas neutralizadas PA-50 y PA-41 producidas por las cepas 027 hipervirulentas resistentes a antibióticos con actividad picomolar, mientras que se observó que los mAb comparadores tenían actividad nanomolar. Este resultado puede reflejar la unión reducida de CDA-1 a la toxina A de las cepas 027 como se informó anteriormente (90). La toxina B de las cepas 027 exhibió una marcada divergencia de secuencia con respecto a otras cepas de *C. difficile*. Las diferencias de secuencia se concentran dentro del dominio de unión al receptor del terminal carboxilo y están asociadas con una citotoxicidad aumentada *in vitro*. Sin embargo, dicha divergencia de secuencia no afectó la actividad neutralizante de PA-41, que une un epítipo dentro del dominio del terminal amino de la toxina B. PA-50 y PA-41 neutralizaron las seis cepas 027 en el panel con potencias picomolares, incluyendo la cepa CD196 que es anterior al reciente aumento en la prevalencia de 027. En general, los resultados indican que los epítipos para PA-50 y PA-41 se conservan ampliamente a través del linaje de 027.

La CDI es causada típicamente por cepas de *C. difficile* que producen las toxinas A y B. Sin embargo, las cepas *tcdA*⁻*tcdB*⁺ también se han relacionado con la enfermedad. Las cepas clínicamente relevantes de *tcdA*⁻*tcdB*⁺ son

predominantemente del ribotipo 017. Se ha informado que las cepas del ribotipo 017 exhiben una patogenicidad reducida en los hámsteres y codifican un tcdB atípico cuya región del terminal amino tiene una identidad de secuencia del 70-80% con ambas tcdB de VPI 10463 y una toxina letal (tcsL) de *C. sordellii*. Fenotípicamente, el ribotipo 017 tcdB tiene características híbridas y exhibe las propiedades de unión al receptor y las especificidades de glucosilación de las toxinas tcdB y tcsL típicas, respectivamente. La región atípica del terminal amino de 017 tcdB proporciona una explicación probable de por qué esta toxina no fue neutralizada por PA-41 en este estudio. Aunque las cepas 017 pueden ser regionalmente prevalentes y causar brotes locales de CDI, en general se determinó que comprenden < 2% de las cepas encontradas en estudios clínicos internacionales de fase 3 recientes de terapias de investigación para el tratamiento de CDI (94, 95).

Ejemplo 9

Generación de los mAb quiméricos

Se produjeron y caracterizaron anticuerpos monoclonales quiméricos que comprenden la región variable del mAb de ratón original y la región constante de IgG1 humana. Se generaron mAb quiméricos para asegurar que las regiones variables murinas que tienen la actividad antitoxina correcta y la especificidad de unión se clonaran y que la construcción de las regiones variables murinas con una región constante humana no alterara significativamente las propiedades de unión y neutralización de cada mAb clonado. Los mAb quiméricos exhiben típicamente la misma actividad de unión que los mAb de ratón progenitores.

Los mAb PA-38, PA-39, PA-41 y PA-50 contienen todas cadenas ligeras kappa. Para generar los mAb quiméricos, las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se insertaron en vectores de expresión adecuados, tales como, pero sin limitarse a, pCON Gamma1 y pCON kappa, respectivamente (Lonza Biologics, Berkshire, Reino Unido). Los plásmidos adecuados codifican la región constante de la cadena ligera kappa humana o la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana. Para la producción de mAb quimérico, la región variable de la cadena pesada de cada mAb se clonó en el plásmido pCON gamma1. El gen completo de la cadena pesada se subclonó en el plásmido que contenía el gen de la cadena ligera para crear un plásmido único que codificaba los genes de la cadena pesada y ligera. Las células 293F se transfectaron transitoriamente con este vector de expresión usando Effectene (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El sobrenadante celular que contenía mAb quimérico secretado se recogió siete días después de la transfección y se purificó usando cromatografía de proteína A. Las potencias y actividades de los mAb quiméricos se compararon con las de los mAb murinos en ensayos de citotoxicidad y hemaglutinación.

De acuerdo con el procedimiento anterior, se generaron mAb quiméricos (cPA-39 y cPA-41) con base en los mAb PA-39 y PA-41 de ratón progenitor. Las concentraciones de estos mAb quiméricos en los sobrenadantes de células sin purificar oscilaron entre aproximadamente 2 - 11 µg/mL. En particular, el sobrenadante sin purificar de un cultivo celular 293F transfectado que produce cPA-39 contenía 10,6 µg/mL del mAb quimérico, mientras que los sobrenadantes sin purificar de varios cultivos celulares 293F transfectados que producían cPA-41 contenían 9,6 - 10,9 µg/mL del mAb quimérico.

Los mAb quiméricos se compararon con sus respectivos mAb de ratón progenitor para determinar la capacidad de neutralizar las toxinas de *C. difficile in vitro* realizando ensayos de citotoxicidad (cPA-39: células CHO-K1, cPA-41: células CHO-K1 y cPA-50: células T-84) como se describió previamente (Ejemplo 3). Se encontró que todos los mAb quiméricos eran igualmente efectivos en comparación con su mAb progenitor murino como se muestra en la Figura 26 (PA-41), Figura 27 (PA-39) y Figura 28 (PA-50). Estos resultados demuestran el éxito de la quimerización y la producción de mAb quiméricos funcionales que tienen potencias de neutralización de toxinas equivalentes a las de los mAb de ratón progenitor.

Ejemplo 10

Humanización de mAb murino(s) y prueba de los mAb humanizados de la invención para la potencia de neutralización de toxinas *in vitro*

Los mAb humanizados se han generado mediante métodos conocidos en la técnica. Ejemplos y descripciones de varios mAb humanizados incluyen, por ejemplo, Zenapax (65,66) Synagis (67-69), Herceptin (70-72), Mylotarg (73,74), Xolair (75-77), Raptiva (78- 80), Avastin (81,82) y Tysabri (83). Se pueden generar anticuerpos monoclonales humanizados que son efectivos para minimizar la inmunogenicidad, de modo que la actividad de mAb en humanos no se vea afectada negativamente (84-87). Preferiblemente, los mAb humanizados demuestran una actividad neutralizante de toxinas que está dentro del doble de los mAbs de ratón progenitores. Además, los mAb humanizados demuestran de manera óptima una potente eficacia en el modelo de hámster de la infección por *C. difficile*.

Se usaron métodos establecidos de injerto de región determinante de complementariedad (CDR) para generar formas humanizadas de los mAb murinos anti-toxina A y/o anti-toxina B como se describe en este documento. El(los) mAb(s) humanizado(s) se compararon con el(los) mAb(s) de ratón progenitor para determinar la actividad neutralizante de

toxinas *in vitro* e *in vivo*. De acuerdo con la invención, el(los) mAb humanizados pueden retener la actividad antitoxina del(de los) mAb murinos progenitores y pueden ser adecuados para la dosificación repetida en humanos.

A. Clonación molecular de los genes de la cadena pesada y ligera de los mAb murinos

Se usaron métodos establecidos para la clonación de genes de anticuerpos. (88) Brevemente, el ARN total se purificó a partir de 1×10^7 células de hibridoma usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se transcribieron en forma inversa 5 µg de ARN total utilizando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) utilizando un cebador oligo-dT. El ADNc resultante se trató con ARNasa H para eliminar la plantilla de ARN y luego se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) para eliminar nucleótidos y cebadores libres. A continuación, se añadió una cola de nucleótidos de guanidina al extremo 3' del ADNc usando la enzima transferasa terminal (NEB) en presencia de dGTP de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El ADNc con cola resultante se sometió a PCR usando un cebador que se hibridó con la región constante de la cadena pesada o ligera y un cebador universal que se hibridó con la cola de guanosina en el ADNc. Tanto para la cadena pesada como para la ligera, se usó el cebador universal 5'TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC3' SEQ ID NO: 11. Para amplificar la cadena ligera, se usó el cebador 5'TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTG3' (SEQ ID NO: 12), mientras que la cadena pesada se amplificó usando el cebador 5'TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC (CAT)GATGGGG(GC)TGT(TC)GTTTT GGC3' (SEQ ID NO: 13), donde las secuencias entre paréntesis indican degeneraciones de bases. El ADN amplificado por PCR resultante se purificó usando un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen) y se secuenció. Las reacciones PCR se realizaron y secuenciaron por triplicado para garantizar que no se introdujeran errores durante la amplificación de los fragmentos de ADN de aproximadamente 500 pares de bases.

B. Humanización de las regiones variables de mAb

Para producir las secuencias de los mAb humanizados, primero se identificaron los residuos de aminoácidos marco importantes para la estructura de la CDR. Paralelamente, las secuencias de V_H y V_L humanas que tienen una alta homología con las V_H y V_L murinas, respectivamente, se seleccionaron de entre las secuencias de inmunoglobulina humana conocidas. Las secuencias de la CDR del mAb murino, junto con cualquier resto de aminoácidos marco importante para mantener la estructura de las CDR, si es necesario, se injertaron en las secuencias marco humanas seleccionadas. Además, los residuos de aminoácidos marco humanos que se encontró que eran atípicos en el subgrupo de la región V correspondiente se sustituyeron con los residuos típicos en un esfuerzo por reducir la inmunogenicidad potencial del mAb humanizado resultante. Estas regiones V_H y V_L humanizadas se clonaron en vectores de expresión, tales como, pero sin limitación, pCON Gamma1 y pCON kappa (Lonza Biologics, Berkshire, RU), respectivamente. Estos vectores codifican la región o regiones constantes de los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Las células 293F se transfectaron transitoriamente con estos vectores de expresión usando el sistema Effectene (Qiagen, Valencia, CA). Los sobrenadantes celulares que contenían mAb humanizado secretado se recogieron siete días después de la transfección y se purificaron usando cromatografía de proteína A.

C. Generación de células CHO estables clonadas que expresan mAb humanizados

La generación de células/líneas celulares CHO estables permite la producción de cantidades suficientes de mAb para probar tanto en ensayos de células *in vitro* como en el modelo de diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD) en hámsteres sirios dorados. Como un ejemplo, las células CHO K1 SV pueden usarse de Lonza Biologics (Berkshire, RU) utilizando un sistema de selección y amplificación de glutamina sintetasa (GS) para generar células CHO transfectadas de manera estable. El sistema Lonza GS generalmente produce líneas celulares CHO de alta producción que pueden producir cantidades considerables de mAb humanizados.

Las células CHO K1 SV se expandieron en medio de cultivo de células CD CHO (Invitrogen) suplementado con IX glutamina (Invitrogen) y suplemento IX H/T (Invitrogen). Se electroporaron 1×10^7 células viables a 290 V, resistencia infinita y 960 µF con 40 µg de ADN plasmídico linealizado resuspendido en 100 µL de tampón TE estéril. Las células se transfirieron a un matraz T-150 que contenía 50 mL de medio CD CHO completo y se incubaron durante aproximadamente 48 horas a 37 °C y 8,0% de CO₂. Las células se centrifugaron y se resuspendieron hasta una densidad final de $3,3 \times 10^5$ células/mL en medio de selección GS (CD CHO + suplemento IX GS (JRH Biosciences) + suplemento IX H/T) que contiene MSX (Sigma) a razón de 100 µM, se sembraron a razón de 5000 células viables/pozo en placas de 96 pozos (Corning) y se incubaron durante aproximadamente 3-4 semanas hasta que comenzaron a aparecer colonias de células primarias (clones de células transfectadas). Se tomaron muestras de aproximadamente 300 colonias de células (clones) para la producción de mAb recombinante removiendo cuidadosamente 20 µL de sobrenadante y realizando un ensayo de ELISA en un formato de 96 pozos. Brevemente, las placas de 96 pozos se recubrieron con un anticuerpo de captura (anticuerpo antihumano de cabra) y luego se agregaron sobrenadantes de transfectantes CHO clonados (diluidos 1:800) para permitir la unión al anticuerpo de captura unido a los pozos de la placa. Después del lavado, se añadió a la placa un anticuerpo secundario (anticuerpo antihumano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina) y se dejó unir al anticuerpo humano en la muestra antes de lavarlo para eliminar la unión no específica. Luego se analizó la actividad de la fosfatasa alcalina en la placa usando un kit PNPP de 1 paso (Thermo, Rockford, IL) para identificar los clones que producen la mayor cantidad de anticuerpos secretados. Los clones que

producen altas cantidades de mAb se expandieron en medio de cultivo de células CD CHO suplementado con IX glutamina y suplemento IX H/T. Los sobrenadantes celulares que contenían mAb humanizado secretado se recogieron y purificaron usando proteína A. Los clones que exhibían la mejor producción se subclonaron mediante dilución limitante y se ampliaron para producir cantidades en gramos de anticuerpo monoclonal humanizado recombinante.

5

D. mAb humanizados hPA-39, hPA-41 y hPA-50

Los mAb humanizados, clonados molecularmente, se aislaron como se describió anteriormente y se caracterizaron (véase la Sección E a continuación). La región constante de cadena ligera (L) (CL) de cada uno de los anticuerpos humanizados es de la clase kappa (κ); la región constante de cadena pesada (H) (CH) de cada uno de los anticuerpos humanizados es del isotipo IgG1. Se encontró que los mAb humanizados que contienen regiones variables (V) únicas se unen y neutralizan la actividad de la toxina A o la toxina B de *C. difficile*. Las regiones V de las cadenas L y H de los mAb humanizados pueden formar parte de una inmunoglobulina completa (Ig) o molécula de anticuerpo compuesta por dos polipéptidos de la cadena H y dos polipéptidos de la cadena L, típicamente unidos por enlaces disulfuro, o pueden ser porciones discretas o fragmentos del anticuerpo, en particular, porciones o fragmentos de anticuerpo que se unen a la toxina A y/o la toxina B y/o que neutralizan la actividad de la toxina. Los ejemplos no limitantes de fragmentos o porciones de inmunoglobulina adecuados que contienen la región V incluyen fragmentos F(ab), F(ab') o F(ab')₂.

Los mAb humanizados anti-toxina A y toxina B de *C. difficile* se produjeron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. El proceso de humanización produjo varios mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile* (hmAb) que se unen a la toxina A y neutralizan la actividad de la toxina A en las células susceptibles. Los ejemplos de tales hmAb incluyen mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de la cadena H que comprende una región VH de la SEQ ID NO: 1 (Figura 32A) y una región C de IgG1 humana y una secuencia de polipéptidos de cadena L que comprende una región VL de la SEQ ID NO: 3 (Figura 33A) y una región C κ humana; hmAb anti-toxina A de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de cadena H que comprende una región VH de la SEQ ID NO: 2 (Figura 32B) y una región C de IgG1 humana y una secuencia de polipéptidos de cadena L que comprende una región VL de la SEQ ID NO: 3 (Figura 33A) y una región C κ humana; hmAb anti-toxina A de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de cadena H que comprende una región VH de la SEQ ID NO: 1 (Figura 32A) y una región C de IgG1 humana y un polipéptido de cadena L que comprende una región VL de la SEQ ID NO: 4 (Figura 33B) y una región C κ humana; y hmAb anti-toxina A de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de cadena H que comprende una región VH de SEQ ID NO: 2 (Figura 32B) y una región C de IgG1 humana y una secuencia de polipéptidos de cadena L que comprende una región VL de SEQ ID NO: 4 (Figura 33B) y una región C κ humana. Tales mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile* abarcan un hmAb PA-39 (hPA-39) de la invención. La inmunoglobulina hPA-39 completa que tiene dos cadenas L y dos cadenas H puede producirse en una célula huésped que coexpresa y secreta un polipéptido de la cadena H de hPA-39 compuesto por una región VH de la invención (por ejemplo, SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2) y una región CH adecuada, por ejemplo, del isotipo IgG1, tal como está contenida en GenBank acceso No. NW_001838121, y un polipéptido de cadena L de hPA-39 compuesto por una región VL de hPA-39 de la invención (por ejemplo, la SEQ ID NO: 3; la SEQ ID NO: 4), y una región CL adecuada, por ejemplo, del subtipo κ , como está contenido dentro del GenBank acceso No. NW_001838785.

40

Otros ejemplos de mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile* de la invención incluyen mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de cadena H que comprende una región VH de la SEQ ID NO: 5 (Figura 34A) y una región C de IgG1 humana y una secuencia de polipéptidos de la cadena L que comprende una región VL de la SEQ ID NO: 7 (Figura 35) y una región C κ humana; y mAb humanizado anti-toxina A de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de la cadena H que comprende una región VH de la SEQ ID NO: 6 (Figura 34B) y una región C de IgG1 humana y una secuencia de polipéptidos de la cadena L que comprende una región VL de la SEQ ID NO: 7 (Figura 35) y una región C κ humana. Tales mAb humanizados anti-toxina A de *C. difficile* abarcan un mAb humanizado PA-50 (hPA-50) de la invención. La inmunoglobulina hPA-50 completa que tiene dos cadenas L y dos cadenas H se puede producir en una célula huésped adecuada que coexpresa y secreta un polipéptido de la cadena H hPA-50 compuesto de una región VH de la invención (por ejemplo, la SEQ ID NO: 5; la SEQ ID NO: 6) y una región CH adecuada, por ejemplo, del isotipo IgG1, tal como está contenida dentro del GenBank acceso No. NW_001838121, y un polipéptido de cadena L hPA-50 compuesto de una región VL de la invención (SEQ ID NO: 7) y una región CL, por ejemplo, del subtipo κ , tal como está contenida dentro del GenBank acceso No. NW_001838785.

55

El proceso de humanización produjo además mAb humanizados anti-toxina B de *C. difficile* que se unen a la toxina B y neutralizan la actividad de la toxina B en células susceptibles *in vitro*. Los ejemplos de tales hmAb incluyen mAb humanizado anti-toxina B de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de la cadena H que comprende una región VH de la SEQ ID NO: 8 (Figura 36A) y una región C de IgG1 humana y una secuencia de polipéptidos de la cadena L que comprende una región VL de la SEQ ID NO: 10 (Figura 37) y una región C κ humana; y mAb humanizado anti-toxina B de *C. difficile* que comprende una secuencia de polipéptidos de la cadena H que comprende una región VH de SEQ ID NO: 9 (Figura 36B) y una región C de IgG1 humana y una secuencia de polipéptidos de la cadena L que comprende una región VL de SEQ ID NO: 10 (Figura 37) y una región C κ humana. Tales mAb humanizados anti-toxina B de *C. difficile* abarcan un mAb humanizado PA-41 (hPA-41) de la invención. La inmunoglobulina hPA-41 completa que tiene dos cadenas L y dos cadenas H se puede producir en una célula huésped adecuada que coexpresa y secreta un polipéptido de la cadena H hPA-41 compuesto por una región VH de hPA-41

65

de la invención (por ejemplo, la SEQ ID NO: 8; la SEQ ID NO: 9) y una región CH adecuada, por ejemplo, del isotipo IgG1, tal como está contenido dentro del Genbank acceso No. NW_001838121, y un polipéptido de cadena L hPA-41 compuesto por una región VL hPA-41 de la invención (por ejemplo, SEQ ID NO: 10) y una región CL, por ejemplo, del subtipo κ , tal como está contenida dentro del GenBank acceso No. NW_001838785.

Además, se produjeron mAb clonados humanizados (hmAb) que se unen a la toxina A o la toxina B de *C. difficile* y neutralizan fuertemente la actividad de la toxina. HmAb anti-toxina A de *C. difficile* PA-50 está compuesta por dos polipéptidos de cadena pesada, cada cadena pesada contiene una región VH y una región CH humana y dos polipéptidos de cadena ligera, cada cadena ligera contiene una región VL y una región CL humana. La secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena pesada hPA-50 de la SEQ ID NO: 14 se establece en la SEQ ID NO: 15, (Figura 38B); la secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena ligera hPA-50 de la SEQ ID NO: 16 se establece en la SEQ ID NO: 17 (Figura 38A). HmAb anti-toxina A de *C. difficile* PA-39 está compuesta por dos polipéptidos de cadena pesada, cada cadena pesada contiene una región VH y una región CH humana y dos polipéptidos de cadena ligera, cada cadena ligera contiene una región VL y una región CL humana. La secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena pesada hPA-39 de la SEQ ID NO: 18 se establece en la SEQ ID NO: 19, (Figura 39B); la secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena ligera hPA-39 de la SEQ ID NO: 20 se establece en la SEQ ID NO: 21 (Figura 39A). HmAb anti-toxina B de *C. difficile* PA-41 se compone de dos polipéptidos de cadena pesada, cada cadena pesada contiene una región VH y una región CH humana y dos polipéptidos de cadena ligera, cada cadena ligera contiene una región VL y una región CL humana. La secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena pesada hPA-41 de la SEQ ID NO: 22 se establece en la SEQ ID NO: 23 (Figura 40B); la secuencia de ácido nucleico (o ADNc) que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena ligera hPA-41 de la SEQ ID NO: 24 se establece en la SEQ ID NO: 25 (Figura 40A).

Los anticuerpos monoclonales CDA-1 y CDB1 (7, 89) se prepararon para uso como mAb comparadores. Se sintetizaron secuencias de ADN que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de Ig de 3D8 y 124 (documentos WO2006/121422 y US2005/0287150) (DNA2.0) y se clonaron en los vectores pCON-gamma1 y pCON-kappa. Los mAb IgG1k, de longitud completa se expresaron en células CHO-K1SV transfectadas de forma estable y se purificaron como se describió anteriormente. Cuando se probó la afinidad de unión a las toxinas A y B, mediante Biacore la inhibición de los efectos citopáticos mediados por toxinas y la hemaglutinación de acuerdo con los métodos publicados (7), las preparaciones de CDA1 y CDB1 exhibieron los niveles de actividad esperados.

E. Caracterización *in vitro* de los mAb humanizados.

Se llevaron a cabo experimentos de neutralización de la toxina de *C. difficile in vitro* para comparar la actividad funcional de los mAb humanizados con aquellos de los mAb de ratón progenitor. Como se muestra en la Figura 29, el mAb PA-41 humanizado (hPA-41) neutralizó en forma potente la citotoxicidad de la toxina B (EC_{50} de 6 pM) en comparación con un EC_{50} de 9 pM para el mAb murino PA-41 (mPA-41). Del mismo modo, se encontró que el mAb humanizado PA-39 (hPA-39) y el mAb humanizado PA-50 (hPA-50) eran igualmente potentes cuando se compararon con sus mAb murinos progenitores en la neutralización de la toxina A usando células CHO-K1 o células T-84, respectivamente, como se muestra en la Figura 30 para hPA-39 y en la Figura 31 para hPA-50. Estos resultados demuestran que los mAb murinos progenitores se humanizaron con éxito y que los mAbs humanizados fueron funcionales y efectivos.

De los mAbs anti-toxina de *C. difficile* examinados en estos estudios, PA-50 exhibieron una curva de neutralización dosis-respuesta distinta con coeficientes de Hill que típicamente eran mayores que dos, lo que indica inhibición cooperativa. Las interacciones cooperativas son comunes en la naturaleza y a menudo se caracterizan por curvas pronunciadas de dosis-respuesta y coeficientes de Hill > 1 . Los medicamentos que muestran actividad cooperativa se han asociado con una mayor actividad clínica en el tratamiento de infecciones virales. Además, PA-50 se une a la toxina A de manera multivalente, una condición que a menudo es necesaria, pero no suficiente para la cooperatividad.

Ejemplo 11

Generación de fragmentos Fab de los mAb murinos anti-toxina de la invención.

A. Preparación de fragmentos Fab.

La fragmentación de Fab se realizó usando un kit de preparación de Fab y $F(ab')_2$ de IgG1 de ratón (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los reactivos suministrados con el kit. Se usó el mismo protocolo para la fragmentación para todos los mAb; PA-39, PA-41 y PA-50. Brevemente, la suspensión de ficina inmovilizada (750 μ L) se lavó con tampón de digestión (cisteína 75 mM, pH 5,6) antes de agregar aproximadamente 3 mg de mAb y la mezcla se incubó a 37 °C durante cuatro horas con rotación constante de giro vertical de 180 grados. Una vez que se completó la digestión, la suspensión se centrifugó y se recogió el producto de digestión. La suspensión se lavó tres veces con tampón de unión a proteína A y el material de lavado se añadió a la digestión completa. La columna de proteína A NAb se equilibró con tampón de unión a proteína A y se añadió la muestra de anticuerpo digerido. La

columna y la muestra se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La columna se centrifugó a 1000 g durante un minuto para recoger el flujo que contenía los fragmentos Fab. La columna se lavó tres veces con tampón de unión a proteína A. Se recogió el flujo, se cambió el tampón en PBS y se concentró.

5 B. SDS-PAGE de fragmentos Fab

Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE usando el sistema de gel Novex (Invitrogen) y todos los reactivos enumerados a continuación eran de Invitrogen a menos que se indique lo contrario. Las muestras se mezclaron con tampón de muestra NuPage y se redujeron con DTT. Las muestras reducidas y no reducidas se incubaron a 100 °C durante 10 minutos. Después de cargar las muestras (4 µg) en un gel Bis Tris NuPage al 4-12%, se realizó la electroforesis con tampón de operación MOPS a 180 V durante 60 minutos. Después de la electroforesis, el gel se incubó con fijador (metanol al 40%, ácido acético al 10%) durante 20 minutos, se enjuagó con agua y se tiñó con colorante Simply Blue durante la noche con rotación constante.

15 C. Caracterización *in vitro* de Fab

Se llevaron a cabo experimentos de neutralización *in vitro* de la toxina de *C. difficile* para comparar la actividad funcional de los Fab (▲) con la de aquella de los mAb completos (■) en función del número de sitios de unión. El Fab de PA-39 neutralizó fuertemente la citotoxicidad de la toxina A en las células CHO-K1 en comparación con PA-39 completo (EC₅₀ de 880 pM y EC₅₀ de 200 pM, respectivamente) (Figura 41A). Se encontró que el Fab de PA-41 era igualmente potente para el PA-41 completo en la neutralización de la actividad de la toxina B en células CHO-K1 (EC₅₀ de 88 pM y EC₅₀ de 80 pM, respectivamente) (Figura 41B). El Fab de PA-50 tenía un valor EC₅₀ de 1,8 nM en comparación con un valor EC₅₀ de 100 pM del mAb PA-50 completo en la neutralización de la toxina A en células T-84 (Figura 41C).

25

Ejemplo 12

Análisis de inmunohistoquímica de los mAb humanizados anti-toxina de *C. difficile* en muestras de tejido humano

30 El valor de la inmunohistoquímica (IHC) en el estudio de la expresión de un antígeno dado es aquel que permite la evaluación de detalles microanatómicos y la heterogeneidad en tejidos normales y tumorales. IHC es ventajoso sobre otros métodos de análisis porque puede localizar directamente proteínas en tipos de células individuales. Las diferencias de expresión génica en el tejido normal y tumoral se pueden detectar al mismo tiempo que se observan los cambios en el número celular y la composición. Las limitaciones de esta técnica incluyen posibles resultados falsos negativos debido a bajos niveles de expresión de la molécula en estudio, así como resultados falsos positivos (reactividad cruzada) debido a la unión de anticuerpos a epítomos similares o aquellos epítomos compartidos por otros antígenos. Para abordar estas limitaciones, este estudio se realizó a la concentración más baja posible de cada uno de los anticuerpos que mostraron una tinción fuerte y específica en muestras positivas de control de ratón inyectados con una toxina específica.

40

Los mAb humanizados PA-41 y PA-50 se biotinilaron para determinar un patrón de unión inmunohistoquímica en una selección de tejidos humanos congelados, que incluían adrenal, vejiga, médula ósea, mama, cerebelo, corteza cerebral, cuello uterino, colon, esófago, ojo, trompa de Falopio, corazón, íleon, yeyuno, riñón, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, músculo, ovario, nervio periférico, páncreas, paratiroides, pituitaria, placenta, próstata, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, uréter, útero y glóbulos blancos. Se tiñó un tejido de cada uno de los 37 tipos de tejido humano diferentes anteriores con cada anticuerpo. Se desarrollaron ensayos de IHC de trabajo para ambos anticuerpos. Se incluyó un anticuerpo de control de isotipo IgG1k humano irrelevante para todas las muestras.

45

50 Para la preparación del tejido, las muestras congeladas embebidas en el compuesto OCT (compuesto de incrustación de temperatura de corte óptima; Sakura, Torrance, CA) se seccionaron a 5 micras y se colocaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Se desarrollaron, probaron y optimizaron los métodos y las condiciones de tinción de IHC para cada anticuerpo y muestra de tejido. Se realizó un procedimiento de IHC biotinilado directo usando secciones de tejido no fijadas congeladas recién cortadas. Los portaobjetos se retiraron del criostato, se dejaron secar al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente, se fijaron en etanol al 95% durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron en tres baños secuenciales de solución salina tamponada con Tris/tampón de lavado Tween-20 al 0,1% (TBST; DakoCytomation) durante 3 minutos. Todos los lavados posteriores se realizaron de esta manera. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con una incubación de 5 minutos de bloque de peroxidasa listo para usar a temperatura ambiente. Después de un lavado con tampón, la actividad de biotina endógena se bloqueó con incubaciones de 15 minutos cada una de avidina seguida de biotina en cada etapa seguido de lavados con tampón. Para PA-41, los portaobjetos se incubaron luego con el reactivo de bloqueador de la proteína Background Sniper durante 10 minutos a temperatura ambiente sin ningún lavado de tampón. Los portaobjetos se incubaron con el artículo de prueba o el reactivo de control negativo (1,25 µg/mL para PA-41 y 10 µg/mL para PA-50) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario PA-50 se diluyó a razón de 1:350 en diluyente Dako mientras que el anticuerpo primario PA-41 se diluyó a razón de 1:3520 en diluyente Dako con prolina (250 mM, 0,576 g, Genzyme, CA) e histidina (15 mM, 0,046 g, Genzyme, CA) añadidos a 20 mL de diluyente (pH 7,7). Después de los lavados en

65

TBST, se aplicó el reactivo de detección ABC (1:50 en TBST) a las secciones de tejido para ambos ensayos de anticuerpos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de lavados con tampón. La inmunorreacción se visualizó incubando con una solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se enjuagaron con agua desionizada (DI) 3 veces durante 30-60 segundos cada uno, se contratiñeron con una hematoxilina de Mayers modificada (DakoCytomation), se volvieron azules en amoníaco al 0,2%, se deshidrataron a través de alcoholes graduados, se aclararon en xileno y se cubrieron con un cubreobjetos. La interpretación de los portaobjetos teñidos se realizó mediante examen microscópico. En general, una revisión morfológica del tejido en el portaobjetos después de la tinción de anticuerpos determinó si estaba presente una cantidad adecuada de tejido y si los elementos de tejido normales designados estaban representados adecuadamente. Las muestras que no cumplieron con los estándares anteriores fueron rechazadas del análisis por el patólogo del estudio.

El sistema de puntuación incluyó un análisis semicuantitativo de la intensidad de tinción. La intensidad de tinción del artículo de prueba se juzgó en relación con la intensidad del portaobjetos de control de tejido que contiene una sección adyacente teñida con un anticuerpo de control negativo. La tinción de la sección marcada con el control de reactivo negativo se consideró tinción de "fondo". Una puntuación de "0" indica que no hay tinción en relación con el fondo; "1+" indica una tinción débil; "2+" indicó tinción moderada; y "3+" indicó una tinción fuerte. De acuerdo con la práctica estándar de patología, la intensidad de tinción se reportó al nivel más alto de intensidad observado en todos los elementos del tejido.

Los resultados del análisis de IHC para los mAb humanizados PA-50 y PA-41 fueron tales que no se observó tinción positiva (0%) en ninguna de las muestras de tejido humano probadas. Se indicó una tinción fuerte consistente (por ejemplo, 3+) en los tejidos de control del músculo de la pata de ratón inyectados con toxina (Toxina A para PA-50 y Toxina B para PA-41) durante todo el estudio. Para PA-50, no se observó tinción positiva verdadera para ninguna muestra de tejido (es decir, el 100% de las células mostraron 0% de tinción). Para PA-41, no se observó una tinción positiva verdadera en los 37 tejidos humanos probados, sin embargo, la tinción positiva débil (1+) se observó como una intensidad de tinción más alta en el hígado normal (debido al pigmento lipocromo), pulmón normal (macrófagos pulmonares con un cuerpo extraño) y músculo normal (reacción consistente con tinción de artefactos). Dichos valores de tinción débiles para PA-41 se consideraron intrascendentes en relación con todos los controles y en vista de la mínima variación de tinción dentro del ensayo.

Ejemplo 13

Análisis farmacocinético de los mAb humanizados anti-toxina de *C. difficile* en primates no humanos

Se realizó un estudio farmacocinético (PK) en monos *Cynomolgus* no alterados utilizando los mAb PA-41 o el mAb PA-50 humanizados purificados. En este estudio, se inyectó por vía intravenosa a monos *Cynomolgus* machos, no alterados, (*Macaca fascicularis*) con 1 mg/kg/animal o 5 mg/kg/animal de mAb PA-41 o mAb PA-50 humanizados purificados. El estudio se realizó de acuerdo con las políticas y procedimientos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC).

La Tabla 8 presenta el formato del estudio PK, mostrando que cada mAb (a una concentración de 10 mg/kg) se administró por vía intravenosa a dos niveles de dosis a animales no alterados.

Tabla 8 Estudio PK de mAb humanizado en primates no humanos

Grupo	Tratamiento	Ruta	Nivel de dosis (mg/kg/día)	Concentración (mg/kg)	Volumen de la dosis (mL/kg/día)	No. de monos (macho)
1	PA-41	IV	1	10	0,1	3
2	PA-41	IV	5	10	0,5	3
3	PA-50	IV	1	10	0,1	3
4	PA-50	IV	5	10	0,5	3

Los animales recibieron una sola inyección intravenosa del anticuerpo del estudio al inicio del estudio. Posteriormente, se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción de vasos periféricos de cada animal en 14 puntos de tiempo individuales dentro de 29 días (es decir, antes de la dosis; a las 0,5, 2, 6, 12 y 24 horas el día 1 (después de la dosis); y los días 3, 4, 7, 9, 12, 15, 22 y 29). Las muestras de sangre se recogieron en tubos separadores de suero y se mantuvieron en hielo húmedo hasta la coagulación. Después de la coagulación, las muestras de sangre se centrifugaron a 1800 g durante 15 minutos a 4 °C para obtener sueros. Las muestras de suero se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

La concentración de mAb en los sueros se determinó mediante ELISA. Las placas de ELISA de noventa y seis pozos (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) se revistieron durante la noche con toxina A (TechLab) o toxina B (TechLab) a razón de 100 ng/pozo a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20® al 0,05% (PBS-T) y se bloquearon con 200 µL de tampón de bloqueo (PBS sin calcio o magnesio, Tween 20® al 0,1%, caseína al 1%) durante una hora a temperatura ambiente. El estándar de referencia de anticuerpos (mAb PA-41 o mAb PA-50 purificados) se

diluyó en suero de Cynomolgus no alterado agrupado al 1% (Bioreclamation) para generar una curva estándar con un intervalo de 0,3 - 4000 ng/mL. Las muestras de prueba diluidas y los estándares se analizaron por triplicado y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente.

5 Las placas se lavaron seis veces con PBS-T y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con IgG1 anti-humano de cabra conjugado con HRP (The Binding Site, San Diego, CA). Las placas se desarrollaron con sustrato de peroxidasa de un componente SureBlue TMB (KPL), se detuvieron con ácido clorhídrico 1 N (Thermo Fisher Scientific) y se leyeron en un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices) a 450 nm. La concentración de mAb en cada mono en diferentes puntos de tiempo se calculó utilizando las curvas estándar. El análisis farmacocinético no comparativo se realizó con WinNonLin, Versión 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Los resultados de PK para mAb humanizado PA-50 se muestran en la Figura 42A; los resultados para el mAb humanizado PA-41 se muestran en la Figura 42B. Para PA-50 a dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg, la media de $T_{1/2}$ (días) fue de $14,5 \pm 0,3$ y $12,3 \pm 1,5$, respectivamente. Para PA-41 con dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg, la media $T_{1/2}$ (días) fue de $8,9 \pm 1,3$ y $9,2 \pm 3,3$, respectivamente.

15 Referencias

1. Bartlett, J. G., T. W. Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach, y A. B. Onderdonk. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *The New England Journal of Medicine* 298: 531-534.
- 20 2. Kyne, L., R. J. Farrell, y C. P. Kelly. 2001. *Clostridium difficile*. *Gastroenterol. Clin North Am* 30: 753-777.
3. Kelly, C. P. y J. T. LaMont. 2008. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *The New England Journal of Medicine* 359: 1932-1940.
4. MacCannell, D. R., T. J. Louie, D. B. Gregson, M. Laverdiere, A. C. Labbe, F. Laing, y S. Henwick. 2006. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canadá. *J Clin Microbiol* 44: 2147-2152.
- 25 5. McDonald, L. C., G. E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, Jr., S. V. Kazakova, S. P. Sambol, S. Johnson, y D. N. Gerding. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine* 353: 2433-2441.
6. Warny, M., J. Pepin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J. Brazier, E. Frost, y L. C. McDonald. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366: 1079-1084.
- 30 7. Babcock, G. J., T. J. Broering, H. J. Hernandez, R. B. Mandell, K. Donahue, N. Boatright, A. M. Stack, I. Lowy, R. Graziano, D. Molrine, D. M. Ambrosino, y W. D. Thomas, Jr. 2006. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. *Infect Immun* 74: 6339-6347.
- 35 8. Bartlett, J. G. 1981. Antimicrobial agents implicated in *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea of colitis. *Johns Hopkins Med J* 149: 6-9.
9. McFarland, L. V., M. E. Mulligan, R. Y. Kwok, y W. E. Stamm. 1989. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *The New England Journal of Medicine* 320: 204-210.
10. Zilberberg, M. D., A. F. Shorr, y M. H. Kollef. 2008. Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005. *Emerg. Infect Dis* 14: 929-931.
- 40 11. Riley, T. V., Codde, J. P., y Rous, I. L. Increased length of hospital stay due to *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Lancet* 345, 455-456. 2-18-1995.
12. O'Brien, J. A., B. J. Lahue, J. J. Caro, y D. M. Davidson. 2007. The emerging infectious challenge of *Clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 28: 1219-1227.
- 45 13. Redelings, M. D., F. Sorvillo, y L. Mascola. 2007. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg. Infect Dis* 13: 1417-1419.
14. Loo, V. G., L. Poirier, M. A. Miller, M. Oughton, M. D. Libman, S. Michaud, A. M. Bourgault, T. Nguyen, C. Frenette, M. Kelly, A. Vibien, P. Brassard, S. Fenn, K. Dewar, T. J. Hudson, R. Horn, P. Rene, Y. Monczak, y A. Dascal. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *The New England Journal of Medicine* 353: 2442-2449.
- 50 15. Warny, M. K. C. 2003. Pathogenicity of *Clostridium difficile* toxins. Washington DC: ASM Press 366: 503-524.
16. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, y J. T. LaMont. 1994. *Clostridium difficile* colitis. *The New England Journal of Medicine* 330: 257-262.
- 55 17. Lyerly, D. M., D. E. Lockwood, S. H. Richardson, y T. D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun.* 35: 1147-1150.
18. McFarland, L. V., H. W. Beneda, J. E. Clarridge, y G. J. Raugi. 2007. Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *Am J Infect Control* 35: 237-253.
19. Drudy, D., T. Quinn, R. O'Mahony, L. Kyne, P. O'Gaora, y S. Fanning. 2006. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in *gyrB* in toxin-A-negative, toxin-B-positive *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 58: 1264-1267.
- 60 20. Rupnik, M., N. Kato, M. Grabnar, y H. Kato. 2003. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J Clin Microbiol* 41: 1118-1125.
21. Voth, D. E. y J. D. Ballard. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18: 247-263.

22. Reineke, J., S. Tenzer, M. Rupnik, A. Koschinski, O. Hasselmayer, A. Schratzenholz, H. Schild, y C. Eichel-Streiber. 2007. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 446: 415-419.
23. Aslam, S., R. J. Hamill, y D. M. Musher. 2005. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 5: 549-557.
- 5 24. Musher, D. M., S. Aslam, N. Logan, S. Nallacheru, I. Bhaila, F. Borchert, y R. J. Hamill. 2005. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis* 40: 1586-1590.
25. Pepin, J., M. E. Alary, L. Valiquette, E. Raiche, J. Ruel, K. Fulop, D. Godin, y C. Bourassa. 2005. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canadá. *Clin Infect Dis* 40: 1591-1597.
26. Fekety, R. y A. B. Shah. 1993. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA* 269: 71-75.
- 10 27. Fekety, R., L. V. McFarland, C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, G. W. Elmer, y M. E. Mulligan. 1997. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin Infect Dis* 24: 324-333.
28. Pothoulakis, C. y J. T. LaMont. 1993. *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. *Gastroenterol. Clin North Am* 22: 623-637.
- 15 29. McFarland, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, R. Fekety, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, J. L. Cox, Z. Noorani, y . 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 271: 1913-1918.
30. McFarland, L. V., G. W. Elmer, y C. M. Surawicz. 2002. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol.* 97: 1769-1775.
- 20 31. Kyne, L., M. Warny, A. Qamar, y C. P. Kelly. 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *The New England Journal of Medicine* 342: 390-397.
32. Kyne, L., M. Warny, A. Qamar, y C. P. Kelly. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 357: 189-193.
- 25 33. Leav, B., Blair, B., Leney, M., Knauber, M., Reilly, C., Lowy, I., Kohberger, R., Gerding, D. N., Kelly, C., Katchar, K., Baxter, R., y Ambrosino, D. 2008. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD). ICAAC/IDSA, Poster B-1295. 2008.
34. Wilcox, M. H., W. N. Fawley, C. D. Settle, y A. Davidson. 1998. Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection--relapse or reinfection? *J Hosp Infect* 38: 93-100.
- 30 35. Jodlowski, T. Z., R. Oehler, L. W. Kam, y I. Melnychuk. 2006. Emerging therapies in the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Ann. Pharmacother* 40: 2164-2169.
36. Missaghi, B., A. J. Valenti, y R. C. Owens, Jr. 2008. *Clostridium difficile* Infection: A Critical Overview. *Curr. Infect Dis Rep* 10: 165-173.
37. Optimer Pharmaceuticals, News Release, 10 de noviembre de 2008.
- 35 38. Louie, T. J., J. Peppe, C. K. Watt, D. Johnson, R. Mohammed, G. Dow, K. Weiss, S. Simon, J. F. John, Jr., G. Garber, S. Chasan-Taber, y D. M. Davidson. 2006. Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 43: 411-420.
39. Louie, T. G. M. G. D. e. al. 2007. Results of a phase III trial comparing tolevamer, vancomycin and metronidazole in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDI). 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- 40 40. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, J. Orellana, y J. T. LaMont. 1992. Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. *Gastroenterology* 102: 35-40.
41. Salcedo, J., S. Keates, C. Pothoulakis, M. Warny, I. Castagliuolo, J. T. LaMont, y C. P. Kelly. 1997. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. *Gut* 41: 366-370.
- 45 42. Leung, D. Y., C. P. Kelly, M. Boguniewicz, C. Pothoulakis, J. T. LaMont, y A. Flores. 1991. Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J Pediatr* 118: 633-637.
43. Medarex and Massachusetts Biologic Laboratories, News Release, 3 de noviembre de 2008.
- 50 44. Kamiya, S., K. Yamakawa, X. Q. Meng, H. Ogura, y S. Nakamura. 1991. Production of monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A which neutralizes enterotoxicity but not haemagglutination activity. *FEMS Microbiol Lett* 65: 311-315.
45. Kink, J. A. y J. A. Williams. 1998. 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 Immun* 66: 2018-2025.
- 55 46. Lyerly, D. M., C. J. Phelps, J. Toth, y T. D. Wilkins. 1986. Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 54: 70-76.
47. Harlow, E. y Lane, D. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York. 1988.
48. Clark, G. F., H. C. Krivan, T. D. Wilkins, y D. F. Smith. 1987. Toxin A from *Clostridium difficile* binds to rabbit erythrocyte glycolipids with terminal Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc sequences. *Arch Biochem Biophys* 257: 217-229.
- 60 49. Anton, P. M., M. O'Brien, E. Kokkotou, B. Eisenstein, A. Michaelis, D. Rothstein, S. Paraschos, C. P. Kelly, y C. Pothoulakis. 2004. Rifaximin treats and prevents relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3975-3979.
- 65 50. Boss, S. M., C. L. Gries, B. K. Kirchner, G. D. Smith, y P. C. Francis. 1994. Use of vancomycin hydrochloride for treatment of *Clostridium difficile* enteritis in Syrian hamsters. *Lab Anim Sci* 44: 31-37.

51. Freeman, J., S. D. Baines, D. Jabes, y M. H. Wilcox. 2005. Comparison of the efficacy of ramoplanin and vancomycin in both *in vitro* and *in vivo* models of clindamycin-induced *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 56: 717-725.
52. Kink, J. A. y J. A. Williams. 1998. 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 Immun* 66: 2018-2025.
53. Kokkotou, E., A. C. Moss, A. Michos, D. Espinoza, J. W. Cloud, N. Mustafa, M. O'Brien, C. Pothoulakis, y C. P. Kelly. 2008. Comparative efficacies of rifaximin and vancomycin for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1121-1126.
54. Kurtz, C. B., E. P. Cannon, A. Brezzani, M. Pitruzzello, C. Dinardo, E. Rinard, D. W. Acheson, R. Fitzpatrick, P. Kelly, K. Shackett, A. T. Papoulis, P. J. Goddard, R. H. Barker, Jr., G. P. Palace, y J. D. Klinger. 2001. GT160-246, a toxin binding polymer for treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2340-2347.
55. McVay, C. S. y R. D. Rolfe. 2000. *In vitro* and *in vivo* activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2254-2258.
56. Razaq, N., S. Sambol, K. Nagaro, W. Zukowski, A. Cheknis, S. Johnson, y D. N. Gerding. 2007. Infection of hamsters with historical and epidemic BI types of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 196: 1813-1819.
57. Fernie, D. S., R. O. Thomson, I. Batty, y P. D. Walker. 1983. Active and passive immunization to protect against antibiotic associated caecitis in hamsters. *Developmental Biology Standard* 53: 325-332.
58. Giannasca, P. J., Z. X. Zhang, W. D. Lei, J. A. Boden, M. A. Giel, T. P. Monath, y W. D. Thomas, Jr. 1999. Serum antitoxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from *Clostridium difficile* disease in hamsters. *Infect Immun* 67: 527-538.
59. Kim, P. H., J. P. Iaconis, y R. D. Rolfe. 1987. Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocectitis and transfer of protection to infant hamsters. *Infect Immun* 55: 2984-2992.
60. Lyerly, D. M., E. F. Bostwick, S. B. Binion, y T. D. Wilkins. 1991. Passive immunization of hamsters against disease caused by *Clostridium difficile* by use of bovine immunoglobulin G concentrate. *Infect Immun* 59: 2215-2218.
61. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, F. Vavva, I. Castagliuolo, E. F. Bostwick, J. C. O'Keane, S. Keates, y J. T. LaMont. 1996. Anti-*Clostridium difficile* bovine immunoglobulin concentrate inhibits cytotoxicity and enterotoxicity of *C. difficile* toxins. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 373-379.
62. Delmee, M., M. Homel, y G. Wauters. 1985. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination. *J Clin Microbiol* 21: 323-327.
63. Delmee, M., V. Avesani, N. Delferriere, y G. Burtonboy. 1990. Characterization of flagella of *Clostridium difficile* and their role in serogrouping reactions. *J Clin Microbiol* 28: 2210-2214.
64. Barbut, F., A. Richard, K. Hamadi, V. Chomette, B. Burghoffer, y J. C. Petit. 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38: 2386-2388.
65. Carswell, C. I., G. L. Plosker, y A. J. Wagstaff. 2001. Daclizumab: a review of its use in the management of organ transplantation. *BioDrugs* 15: 745-773.
66. Wiland, A. M. y B. Philosophe. 2004. Daclizumab induction in solid organ transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 4: 729-740.
67. Fenton, C., L. J. Scott, y G. L. Plosker. 2004. Palivizumab: a review of its use as prophylaxis for serious respiratory syncytial virus infection. *Paediatr. Drugs* 6: 177-197.
68. Wu, H., D. S. Pfarr, Y. Tang, L. L. An, N. K. Patel, J. D. Watkins, W. D. Huse, P. A. Kiener, y J. F. Young. 2005. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J Mol Biol* 350: 126-144.
69. Romero, J. R. Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palivizumab usage. *Pediatr. Infect. Dis* 22, S46-S54. 2003.
70. Carter, P., L. Presta, C. M. Gorman, J. B. Ridgway, D. Henner, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. Kotts, M. E. Carver, y H. M. Shepard. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4285-4289.
71. Emens, L. A. 2005. Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neuoverexpressing metastatic breast cancer. *Am J Ther* 12: 243-253.
72. Finn, R. S. y D. J. Slamon. 2003. Monoclonal antibody therapy for breast cancer: herceptin. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 21: 223-233.
73. Giles, F., E. Estey, y S. O'Brien. 2003. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 98:2095-2104.
74. Siemoneit, K., S. Cardoso Mda, K. Koerner, A. Wolpl, y B. Kubanek. 1995. Human monoclonal antibodies for the immunological characterization of a highly conserved protein domain of the hepatitis C virus glycoprotein E1. *Clin Exp Immunol* 101: 278-83.
75. Casale, T. B. 2004. Omalizumab: an effective anti-IgE treatment for allergic asthma and rhinitis. *Drugs Today (Barc.)* 40: 367-376.
76. Holgate, S. T., R. Djukanovic, T. Casale, y J. Bousquet. 2005. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy* 35: 408-416.
77. Presta, L. G., S. J. Lahr, R. L. Shields, J. P. Porter, C. M. Gorman, B. M. Fendly, y P. M. Jardieu. 1993. Humanization of an antibody directed against IgE. *The Journal of Immunology* 151: 2623-2632.
78. Jordan, J. K. 2005. Efalizumab for the treatment of moderate to severe plaque psoriasis. *Ann. Pharmacother* 39: 1476-1482.

79. Werther, W. A., T. N. Gonzalez, S. J. O'Connor, S. McCabe, B. Chan, T. Hotaling, M. Champe, J. A. Fox, P. M. Jardieu, P. W. Berman, y L. G. Presta. 1996. Humanization of an antilymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 monoclonal antibody and reengineering of the humanized antibody for binding to rhesus LFA-1. *The Journal of Immunology* 157: 4986-4995.

5 80. Leonardi, C. L. 2004. Current concepts and review of efalizumab in the treatment of psoriasis. *Dermatol. Clin* 22: 427-435.

81. Ferrara, N., K. J. Hillan, H. P. Gerber, y W. Novotny. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 391-400.

10 82. Presta, L. G., H. Chen, S. J. O'Connor, V. Chisholm, Y. G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, y N. Ferrara. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57: 4593-4599.

83. Steinman, L. 2005. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 510-518.

15 84. Fagnani, R. 1994. The immunogenicity of foreign monoclonal antibodies in human disease applications: problems and current approaches. *Immunol Ser.* 61: 3-22.

85. Mateo, C., E. Moreno, K. Amour, J. Lombardero, W. Harris, y R. Perez. 1997. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology.* 3: 71-81.

20 86. Reichert, J. M., C. J. Rosensweig, L. B. Faden, y M. C. Dewitz. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23: 1073-1078.

87. Stephens, S., S. Emtage, O. Vetterlein, L. Chaplin, C. Bebbington, A. Nesbitt, M. Sopwith, D. Athwal, C. Novak, y M. Bodmer. 1995. Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual antiidiotypic responses. *Immunology* 85: 668-674.

25 88. Co, M. S., N. M. Avdalovic, P. C. Caron, M. V. Avdalovic, D. A. Scheinberg, y C. Queen. 1992. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. *J Immunol.* 148: 1149-1154.

89. Lowy, I. et al. 2010. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N. Engl. J Med.*, 362, 197-205.

90. Babcock, G.J. et al. Human Monoclonal Antibodies Neutralize Toxins Produced by Epidemic Strains of *Clostridium difficile*, the Infectious Diseases Society of America 43rd Annual Meeting, 6-9 de octubre de 2005; San Francisco, California.

30 91. Optimer Pharmaceuticals Reports Positive Data from its North American Phase 3 CDI Study of OPT-80. Optimer Pharmaceuticals, Press Release (2008).

92. Rothman SW, *Toxicol.* 1988; 26(6): 583-97.

93. WO2005US0047100 de Diversa

35 94. Cheknis, AK. et al. Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005-2007. *Anaerobe* 15: 230-233 (2009).

95. Gerding D, et al. Restriction endonuclease analysis (REA) typing of *Clostridium difficile* in a phase 3 treatment trial of fidaxomicin vs vancomycin: Decreased cure rate for epidemic BI/NAP1/027 strain. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract, L1-1642, San Francisco, CA, 12-15 de septiembre de 2009.

40 Listado de secuencias

<110> PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.

45 <120> ANTICUERPOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN Y ENFERMEDAD ASOCIADA A *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

<130> P0903.70000WO00

50 <140> TBD

<141> 2011-04-15

<150> US 61/324.503

<151> 2010-04-15

55 <150> US 61/381.669

<151> 2010-09-10

<160> 25

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 117

65 <212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 757 675 T3

<220>

<223> anticuerpo, región VH

5 <400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Asp His
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Thr Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly His Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> anticuerpo, región VH

<400> 2

ES 2 757 675 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Asp His
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Thr Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly His Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 3
- 5 <211> 107
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> anticuerpo, región VL
- <400> 3

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 Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

ES 2 757 675 T3

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

5 <210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> anticuerpo, región VL

<400> 4

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 Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Ser 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

15 <210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> anticuerpo, región VH

<400> 5

25 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

ES 2 757 675 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Tyr Asp Ile Ile Gly His Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Met Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 6
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> anticuerpo, región VH

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Tyr Asp Ile Ile Gly His Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Met Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

15

ES 2 757 675 T3

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 7
<211> 104
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> anticuerpo, región VL

<400> 7

Glu 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 Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Arg Thr Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

15 <210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> anticuerpo, región VH

<400> 8

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

25 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ES 2 757 675 T3

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

Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> anticuerpo, región VH

<400> 9

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

ES 2 757 675 T3

<220>

<223> anticuerpo, región VL

<400> 10

5

Glu 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 Ser Val Gly 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 Phe Ala Ser Glu 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 Asn Lys Trp Pro Phe
85 90 95

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

<210> 11

<211> 30

10

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

15

<400> 11

tatatctaga attcccccc cccccccc 30

20

<210> 12

<211> 46

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

<400> 12

tatagagctc aagcttggat ggtggaaga tggatacagt tgggtc 46

30

<210> 13

<211> 54

<212> ADN

<213> secuencia artificial

35

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

<400> 13

40

tatagagctc aagctccag tggatagacc atgatggggg ctgttcgtt tggc 54

ES 2 757 675 T3

<210> 14
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> > anticuerpo, cadena pesada

<400> 14

10

```

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1                               10                      15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
      20                               25                      30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35                               40                      45

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50                               55                      60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asn Pro Lys Tyr Asp Ile Ile Gly His Asn
65                               70                      75                      80

Pro Lys Phe Met Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser
      85                               90                      95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
      100                              105                     110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
      115                              120                     125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      130                              135                     140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145                              150                     155                     160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
      165                              170                     175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
      180                              185                     190
    
```

ES 2 757 675 T3

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

ES 2 757 675 T3

450

455

460

Pro Gly Lys
465

<210> 15
<211> 1404
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> > anticuerpo, cadena pesada

10

<400> 15

atggaatggt	ccggcgtggt	catctttttg	ctgtcagtca	ccgctggcgt	gcactctcaa	60
gtccagcttg	ttcagagcgg	agcagaagtg	aagaagccag	gggccagcgt	caaggtttct	120
tgtaaagcca	gtggttatac	ctttactgat	tacaacatgg	attgggtacg	tcaggcacc	180
ggacaacggc	tggagtggat	tggcgacatc	aatcccaaat	acgacattat	cgccataac	240
cctaagttta	tgggaaaggc	taccattaca	gtagataagt	ctgcttccac	cgcttacatg	300
gagctctcct	ctctgcgcag	tgaggatacc	gcagtgtact	attgcgccag	gagtgaccga	360
ggctggtatt	tcgacgtttg	ggggcagggg	acattggtga	ctgtgtcaag	cgccagcaca	420
aagggcccat	cggtcttccc	cctggcacc	tctagcaaga	gcacctctgg	gggcacagcg	480
gccctgggct	gcctggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacggtgtc	gtggaactca	540
ggcgcctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtctc	aggactctac	600
tccctcagca	gcgtggtgac	cgtgccctcc	agcagcttgg	gcaccagac	ctacatctgc	660
aacgtgaatc	acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	gagttgagcc	caaactctgt	720
gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcca	gcacctgaac	tcctgggggg	accgtcagtc	780
ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcaca	840
tgcgtggtgg	tggacgtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	900
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	960
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	1020
tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccacgaga	aaacatctc	caaagccaaa	1080
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccgggagga	gatgaccaag	1140
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctatc	ccagcgacat	cgccgtggag	1200
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctcccgt	gctggactcc	1260
gacggtcct	tcttcctcta	tagcaagctc	accgtggaca	agagcaggtg	gcagcagggg	1320
aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	1380
ctctccctgt	ctccgggtaa	atga				1404

<210> 16
<211> 233
<212> PRT
<213> secuencia artificial

15

<220>
<223> anticuerpo, cadena ligera

20

ES 2 757 675 T3

<400> 16

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
 20 25 30

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Asn Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Pro Arg Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

5 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 17

<211> 657

10 <212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 757 675 T3

<220>

<223> anticuerpo, cadena ligera

<400> 17

5

```

atggattttc aagttcagat attctccttt cttctcatta gcgccagtgt gattatgtca      60
agaggggaga ttgtcctgac acagagtccc gccacactta gcctgtcccc cggagagcgt      120
gctacactct cttgtcgcgc ttccagctct gtcaactaca tgaactggta tcagcagaaa      180
cccggtcagg ccctagacc ccggatctat gccacatcta atcttgctc cggagtgcct      240
gcccgattca gcgggagcgg aagtggtagc gattacaccc tcacaatctc tagcttggaa      300
ccagaggact ttgcagtcta ttactgccaa cagtgggtcta gtcgcacttt cgggtggtggc      360
accaaattgg agatcaagag gactgtcgtc gcccgaagtg tgttcatctt tcctccatcc      420
gatgagcagc tgaagagtgg aaccgcatcc gtggtttgcc tgctgaacaa cttttacctt      480
cgggaagcta aagtgtcagt aaccgaacaa gattccaagg actccaccta ctctctctca      540
tctaccttga ccctgtcaaa ggccgactat gaaaaacaca aggtttacgc atgtgaggta      600
actcatcaag ggcttagctc tccagtcact aagagcttta acaggggcca atgctag      657
    
```

<210> 18

<211> 538

10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo, cadena pesada

15

<400> 18

```

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1                               5                               10                               15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                20                               25                               30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
                35                               40                               45

Asn Asp His Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50                               55                               60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Thr Thr Val Tyr Asn
65                               70                               75                               80
    
```

ES 2 757 675 T3

Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly His Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gly Glu Arg Pro Ala Gln
225 230 235 240

Gly Gly Arg Val Ser Ala Gly Ser Gln Ala Gln Arg Ser Cys Leu Asp
245 250 255

Ala Ser Arg Leu Cys Ser Pro Ser Pro Gly Gln Gln Gly Arg Pro Arg
260 265 270

Leu Pro Leu His Pro Glu Ala Ser Ala Arg Pro Thr His Ala Gln Gly
275 280 285

Glu Gly Leu Leu Ala Phe Ser Pro Gly Ser Gly Gln Ala Gln Ala Arg
290 295 300

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
305 310 315 320

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
325 330 335

ES 2 757 675 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 340 345 350

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 355 360 365

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 370 375 380

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 385 390 395 400

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 405 410 415

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 420 425 430

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 435 440 445

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 450 455 460

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 465 470 475 480

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 485 490 495

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 500 505 510

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 515 520 525

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 530 535

<210> 19
 <211> 1617
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> anticuerpo, cadena pesada

10 <400> 19

atggagtggt cgggagtgtt catctttctg ctctctgtta ccgctggcgt acatagccaa 60
 gtccagcttg tccagtctgg cgccgaggtc aagaaaccag gggccagcgt gaaagttagt 120

ES 2 757 675 T3

tgtaaggcat cgggtatac cttcaacgat cacaatatcc actgggtacg acaggctcca 180
 ggccaagggc tggaatggat tggttacata taccottaca ttggaacaac agtgtataac 240
 cagaagttca aatccaaggc aactcttact gtggatacat caacctcaac tgcctacatg 300
 gaattgagat ccctgaggag tgacgacact gctgtctatt actgcagtcg gtggggacat 360
 cgcggctttc cttattgggg tcaggggaca ctcgttactg tgagctctgc cagtaccaag 420
 ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctct agcaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 540
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttggtgagag gccagcacag 720
 ggaggggagg tgtctgctgg aagccaggct cagcgcctct gcctggacgc atccccgcta 780
 tgcagtccca gtccagggca gcaaggcagg ccccgctctgc ctcttcccc ggaggcctct 840
 gccccccca ctcatgctca gggagagggc cttctggctt tttccccagg ctctgggcag 900
 gcacaggcta ggtgccccga gcccaaactct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 960
 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 1020
 accctcatga tctccccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 1080
 gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1140
 aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1200
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1260
 gcccccatcg agaaaacat ctocaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1320
 accctgcccc catccccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1380
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagggggaga gcaatgggca gccggagaac 1440
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctatagcaag 1500
 ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1560
 gaggtctctc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1617

5 <210> 20
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> anticuerpo, cadena ligera

<400> 20

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15

ES 2 757 675 T3

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

- <210> 21
- 5 <211> 705
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> anticuerpo, cadena ligera
- <400> 21

ES 2 757 675 T3

```

atggaatctc agactcaagt gtttgtgtac atgttgctgt ggctgagcgg cgttgacggt      60
gacattcaga tgacccaaag cccctcaagt ctttctgcta gcgtggggga cagggtgacc      120
ataacatgca aagccagcca aaatgtgggg actaacgttg cctggtatca gcagaaacca      180
ggtaaagcac ccaaggctct gatctacagt gcaagttatc gatactccgg cgtgtcctct      240
cggttttctg gctctgggag cggaaccgat ttactctga ccattagttc actccaacca      300
gaagatttcg cagtctacta ttgtcagcag tactatagtt acccatatac atttgacag      360
ggcaccaagc tggaaatcaa gagaaccgtt gccgctcctt cagtattcat cttccctccc      420
tccgatgagc agttgaagtc cggcacagca agcgtcgtat gccttttgaa caatttctat      480
ccacgcgagg ccaaagtgca atggaagtc gacaacgctc tgcagtcagg caactcccaa      540
gagtcagtca cagagcagga cagcaaagat tccacttatt ctctctcttc tacactcact      600
ctgagcaagg cggactatga gaagcataag gtttacgcct gcgaagtgac ccaccaggg      660
ttgagttccc ctgtcactaa gtcctttaac cgtggggagt gttag                          705

```

<210> 22
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> anticuerpo, cadena pesada

10

<400> 22

```

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1                               5                               10                               15

Gly Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                20                               25                               30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe
                35                               40                               45

Thr Asn Tyr Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50                               55                               60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Ser
65                               70                               75                               80

Leu Asn Phe Arg Asp Lys Ala Thr Ile Thr Leu Asp Lys Ser Ala Ser
                85                               90                               95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
                100                               105                               110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Ile Thr Ser Pro Leu Leu Asp Phe Trp

```

ES 2 757 675 T3

	115						120						125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
	130						135						140			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
145					150					155						160
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
				165					170					175		
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
			180					185						190		
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
		195					200						205			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
	210					215					220					
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Gly	Glu	Arg	Pro	
225					230					235					240	
Ala	Gln	Gly	Gly	Arg	Val	Ser	Ala	Gly	Ser	Gln	Ala	Gln	Arg	Ser	Cys	
				245					250					255		
Leu	Asp	Ala	Ser	Arg	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Arg	
			260					265						270		
Pro	Arg	Leu	Pro	Leu	His	Pro	Glu	Ala	Ser	Ala	Arg	Pro	Thr	His	Ala	
		275					280						285			
Gln	Gly	Glu	Gly	Leu	Leu	Ala	Phe	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Ala	Gln	
	290					295						300				
Ala	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
305					310					315					320	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
				325					330					335		
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
			340					345					350			
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
		355					360					365				
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
	370					375					380					

ES 2 757 675 T3

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
385 390 395 400

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
405 410 415

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
420 425 430

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
435 440 445

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
450 455 460

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
465 470 475 480

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
485 490 495

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
500 505 510

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
515 520 525

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
530 535 540

- <210> 23
- <211> 765
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> anticuerpo, cadena pesada

- 10 <400> 23

```

atgggatgga gctggatddd cttgttcctc ctttccggga ctgctggcgg actgtcccaa      60
gtccagttgg tgcagagcgg cgctgaggtt aagaagcccg gtcctctgt caaagttagt      120
tgcaaagcaa gtggctaccc tttcacaaac tactttatgc actgggtgcg ccaggccoct      180
gggcaaagac tcgaatggat cggtcgtatc aatccataca atggggcaac tagttattct      240
ctcaacttca gggataaggc taccattaca ctggacaagt ctgcctctac cgcctatatg      300
gagctgagct ccctgcggag tgaagatact gctgtctatt actgtgcacg atccaccata      360
acctctcccc tgctggactt ttggggccag ggcacacttg tgactgtatc atcagcatcc      420
    
```

ES 2 757 675 T3

acaaagggcc catcggtcct cccctggca ccctctagca agagcacctc tgggggcaca 480
 gcggccttg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
 tcaggcgccc tgaccaggg cgtgcacacc ttccggctg tctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttgg tgagaggcca 720
 gcacagggag ggaggtgctc tgctggaagc caggctcagc gctcc 765

5 <210> 24
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> anticuerpo, cadena ligera

<400> 24

Met	Ser	Val	Pro	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	1	5	10	15
Asp	Ala	Arg	Cys	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	20	25	30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	35	40	45	
Val	Gly	Thr	Ser	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	50	55	60	
Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Phe	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	65	70	75	80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	85	90	95	
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	100	105	110	
Lys	Trp	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	115	120	125	
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	130	135	140	
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	145	150	155	160
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	165	170	175	

ES 2 757 675 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

- 5 <210> 25
- <211> 705
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> anticuerpo, cadena ligera
- <400> 25

```

atgtccggtc ctactcaagt gctgggactg cttcttctgt ggctcactga cgcaaggtgt      60
gagatcgtgc tgaccagag tccagccaca ctcagcttgt caccgggga acgggctaca      120
ctgtcctgtc gtgcatcaca gagcgtgggt acatcaattc actggtatca gcagaagccc      180
ggtcaggctc ccagactcct gataaagttt gcctccgaat ccatttctgg cattccagcc      240
cgcttctccg gctccggcag tgggaactgat ttcaccctca ccattagttc tttggagcct      300
gaagattttg cagtatacta ctgtcaacag tctaacaagt ggccttttac ttttgggcag      360
ggaactaaac tggagatcaa gcgcactgtc gctgctcaa gcgtattcat ctttctccc      420
tccgacgagc agttgaaatc agggacagcc tctgtggtct gcctgctgaa caatttctac      480
ccaaggaag ccaaagtgca gtggaaggtc gataatgcac ttcaatcagg taattctcaa      540
gagagtgtga ccgagcagga ttccaaggac agtacctact ctctcagctc aaccctgacc      600
ctttctaaag ctgactatga aaaacataaa gtctacgcct gcgaagtgac acaccaggtg      660
ctgagtagcc ctgttaccaa gagctttaac cgaggcgagt gctag                          705
    
```

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado seleccionado de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la toxina B de *C. difficile* producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 (PA-41), una forma humanizada quimérica o injertada de CDR del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la toxina A de *C. difficile* producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9694 (PA-50), una forma quimérica o injertada de CDR del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
2. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que neutraliza la toxicidad *in vivo* de la toxina A o la toxina B de *C. difficile*.
3. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno neutraliza la toxicidad *in vivo* de la toxina A o la toxina B de *C. difficile*: (i) en una cantidad en el intervalo de 1 µg a 1000 µg o de 1 mg/kg a 50 mg/kg; o (ii) a una dosis seleccionada de (A) 2, 5, 10, 50 o 100 µg o (B) 50 mg/kg.
4. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que se une específicamente a la toxina B de *C. difficile* y en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 y comprende una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10.
5. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, que se une específicamente a la toxina A de *C. difficile* y en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 y comprende una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 7.
6. Un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una primera región de unión a antígeno seleccionada de un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9694, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una versión humanizada injertada de CDR del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; y una segunda región de unión a antígeno seleccionada de un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una versión humanizada injertada de CDR del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.
7. Una composición que comprende uno o más anticuerpos aislados, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y un portador, excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición comprende al menos un anticuerpo anti-toxina A, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y al menos un anticuerpo anti-toxina B, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
9. Una composición que comprende un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, y un portador, excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que además comprende al menos un agente terapéutico adicional.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el agente terapéutico adicional se selecciona de metronidazol, vancomicina, fidaxomicina, nitazoxanida, rifaximina, ramoplanina o combinaciones de los mismos.
12. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que (a) se une específicamente a la toxina B de *C. difficile* y que comprende el VH y VL de CDR1, CDR2 y CDR3 del mAb producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC No. PTA-9693, en el que la VH de CDR1 corresponde a los residuos de aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 8, la VH de CDR2 corresponde a los residuos de aminoácidos 50 a 66 de la SEQ ID NO: 8, y la VH de CDR3 corresponde a los residuos de aminoácidos 99 a 108 de la SEQ ID NO: 8 y en la que VL de CDR1 corresponde a los residuos de aminoácidos 24 a 34 de la SEQ ID NO: 10, la VL de CDR2 corresponde a residuos de aminoácidos 50 a 56 de la SEQ ID NO: 10, y la VL de CDR3 corresponde a los residuos de aminoácidos 89 a 97 de la SEQ ID NO: 10; o que (b) se une específicamente a la toxina A de *C. difficile* y que comprende la VH y VL de CDR1, CDR2 y CDR3 del mAb producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9694, en la que la VH de CDR1 corresponde a los residuos de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 5, la VH de CDR2 corresponde a los residuos de aminoácidos 50 a 65 de la SEQ ID NO: 5, y la VH de CDR3 corresponde a los residuos de aminoácidos 95 a 102 de la SEQ ID NO: 5 y la VL de CDR1 corresponde

a los residuos de aminoácidos 24 a 33 de la SEQ ID NO: 7, la VL de CDR2 corresponde a los residuos de aminoácidos 49 a 55 de la SEQ ID NO: 7, y la VL de CDR3 corresponde a los residuos de aminoácidos 88 a 94 de la SEQ ID NO: 7.

- 5 13. Un anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 12, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 6, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para usar en el tratamiento de una infección por *C. difficile*, enfermedad asociada a *C. difficile*, o diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD); o la inhibición o neutralización de la toxicidad para una célula por la toxina A o la toxina B de *C. difficile*.
- 10 14. Anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 12 para uso en la neutralización de las toxinas producidas por una cepa hipervirulenta de *C. difficile*; o la inhibición o neutralización de la toxicidad para una célula por una toxina de *C. difficile*.
- 15 15. Una línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 o PTA-9694.
16. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 12.
- 20 17. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 16.
- 25 18. Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la toxina B de *C. difficile* producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9693 (PA-41), una forma humanizada quimérica o injertada de CDR del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la toxina A de *C. difficile* producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-9694 (PA-50), una forma humanizada quimérica o injertada de CDR del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo para el uso en el tratamiento de un sujeto que es asintomático, pero que es susceptible o está en riesgo de contraer una infección por *C. difficile*, enfermedad asociada a *C. difficile* o diarrea asociada a *C. difficile* (CDAD).

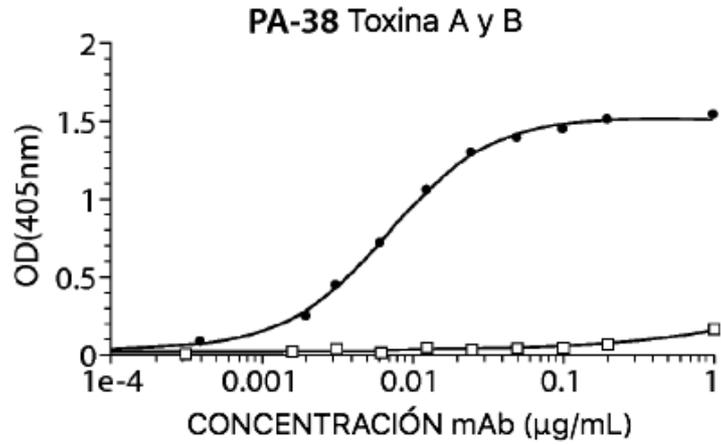


Fig. 1A

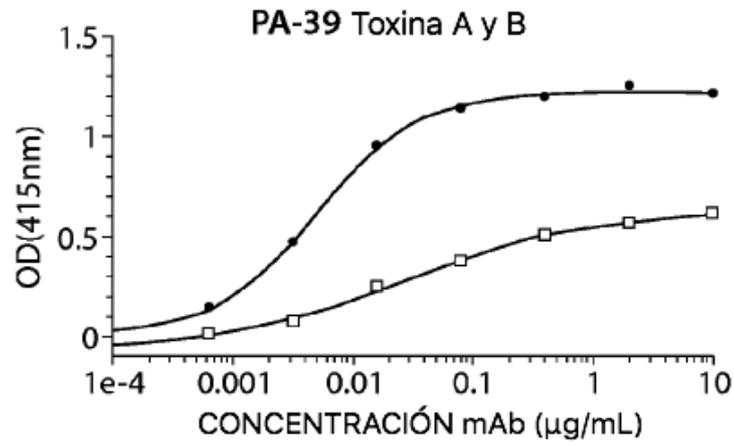


Fig. 1B

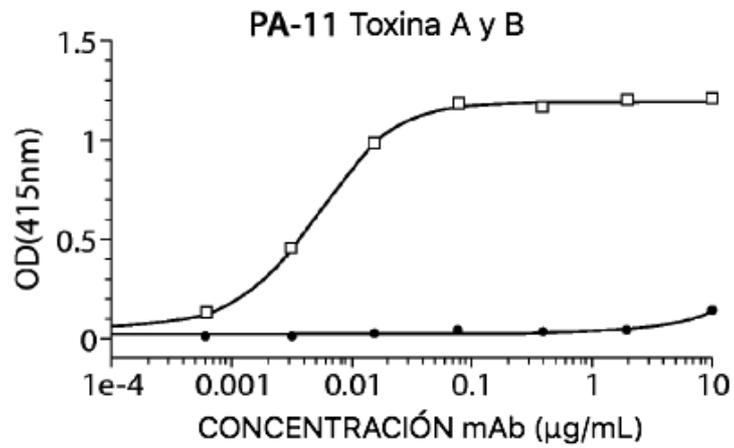


Fig. 1C

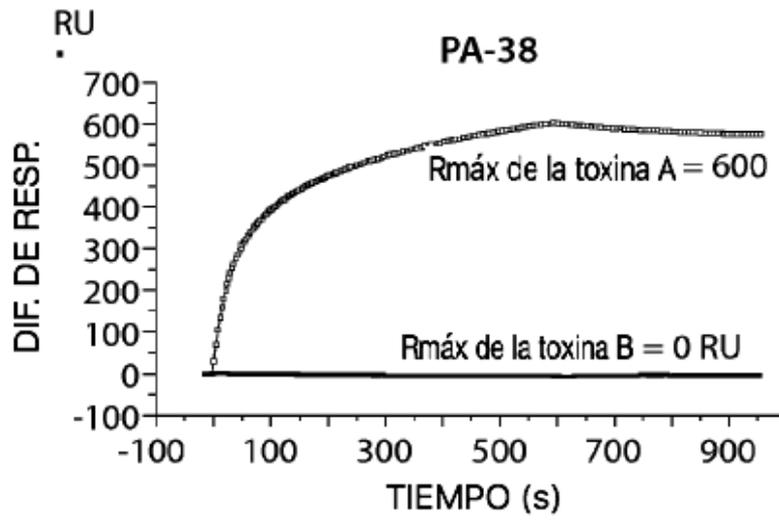


Fig. 2A

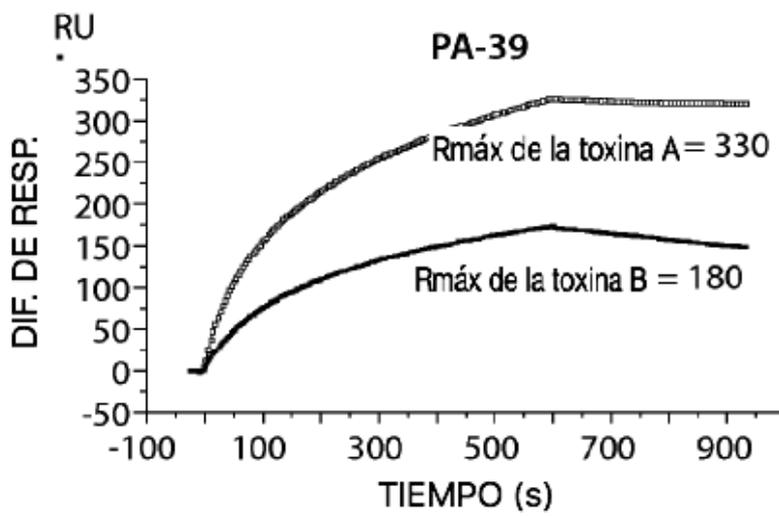


Fig. 2B

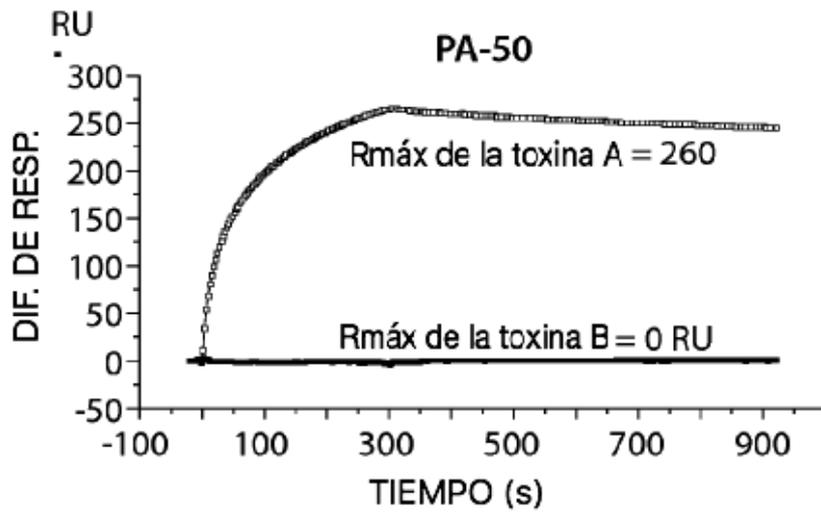


Fig. 2C

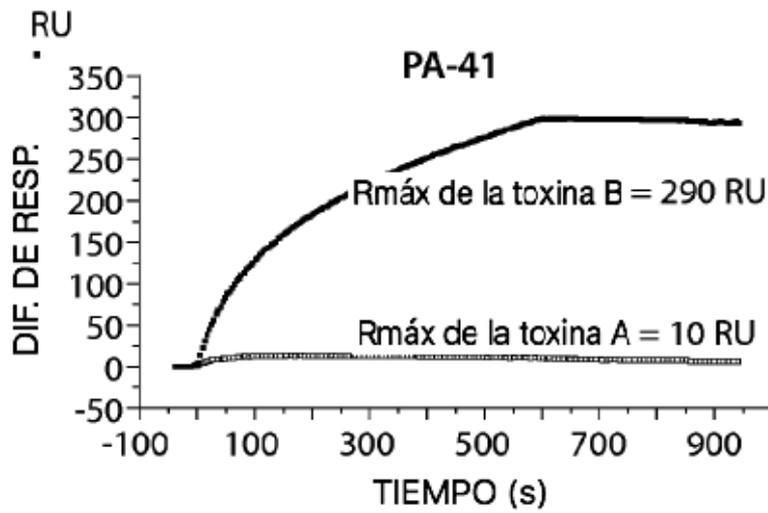


Fig. 2D

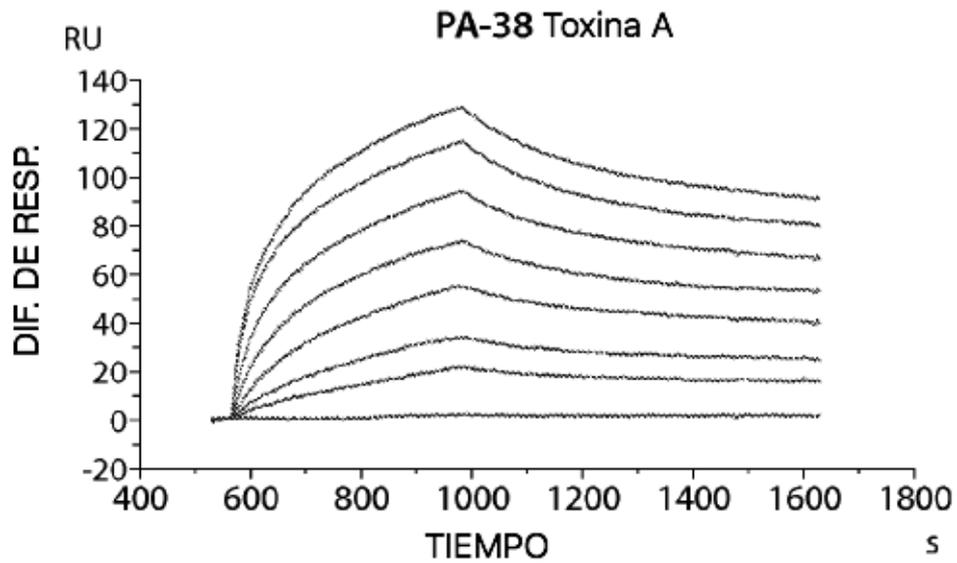


Fig. 3A

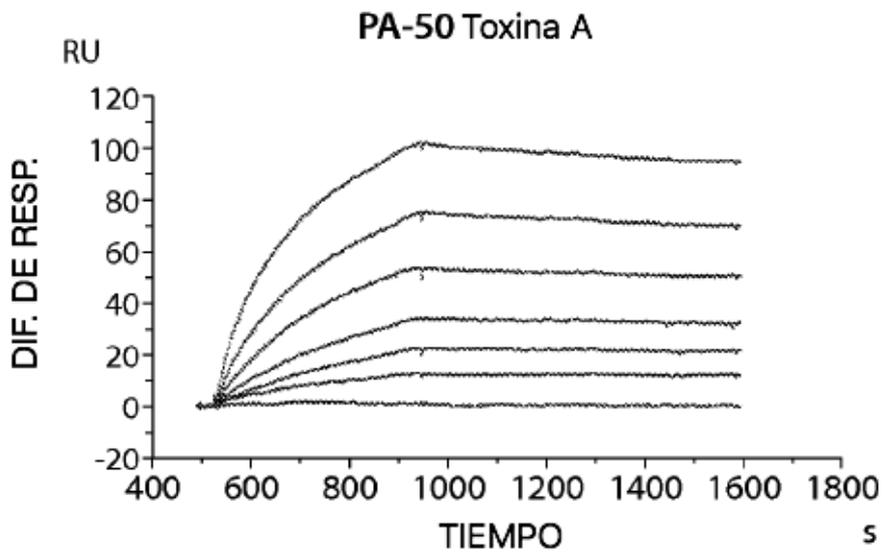


Fig. 3B

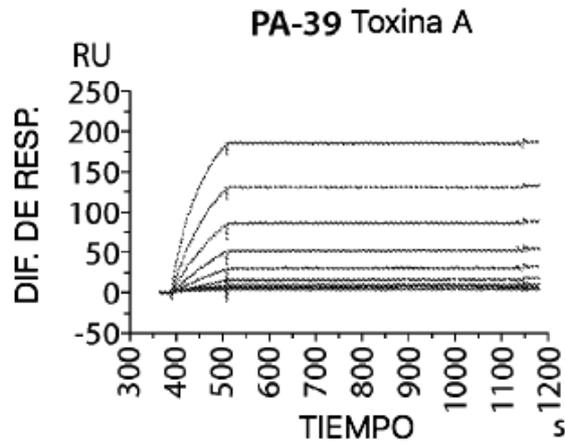


Fig. 3C

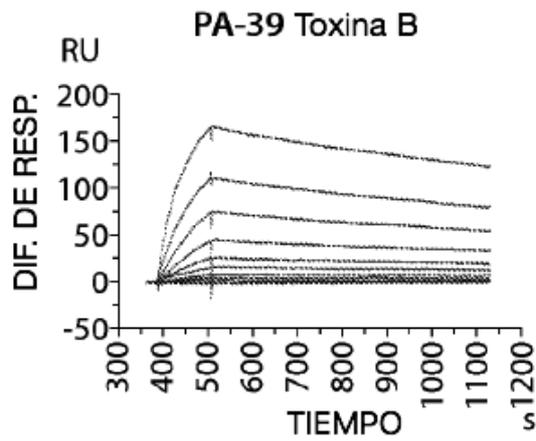


Fig. 3D

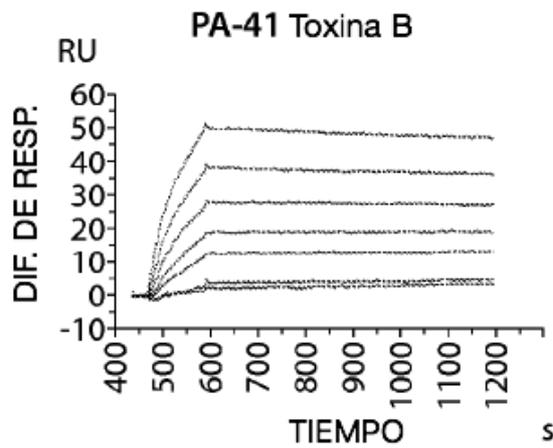


Fig. 3E

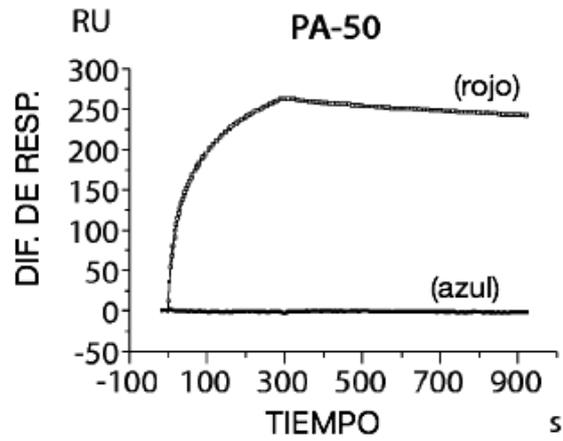


Fig. 3F

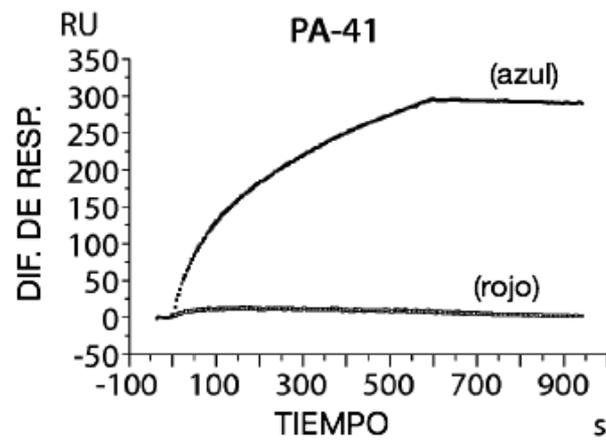


Fig. 3G

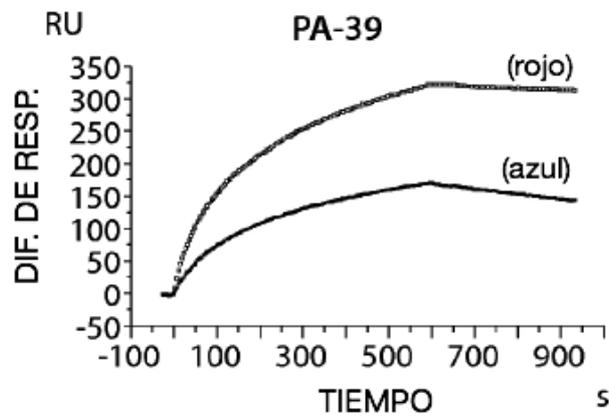


Fig. 3H

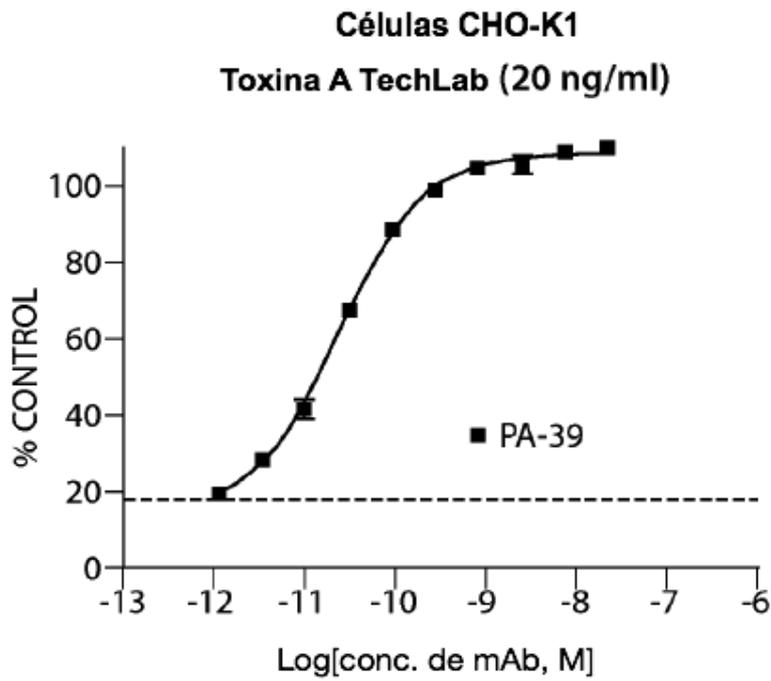


Fig. 4

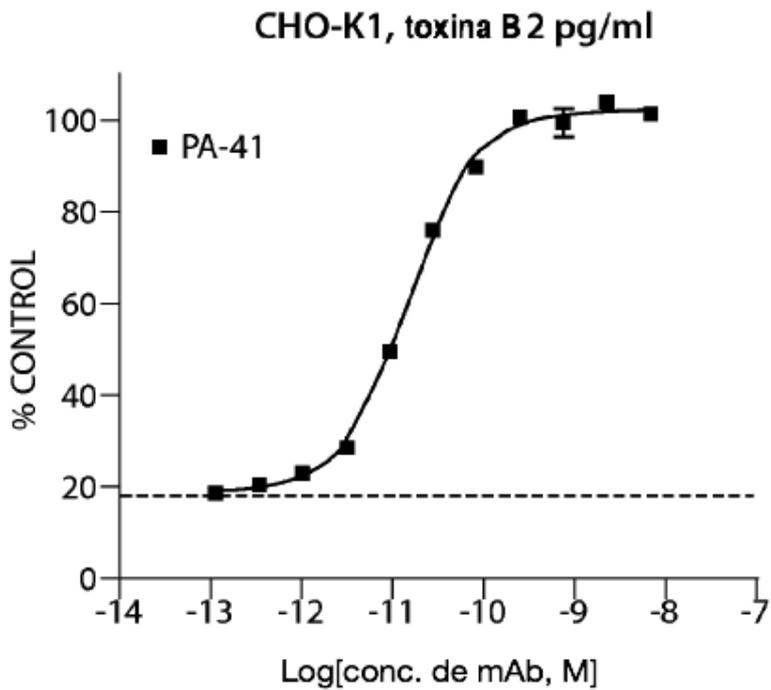


Fig. 5

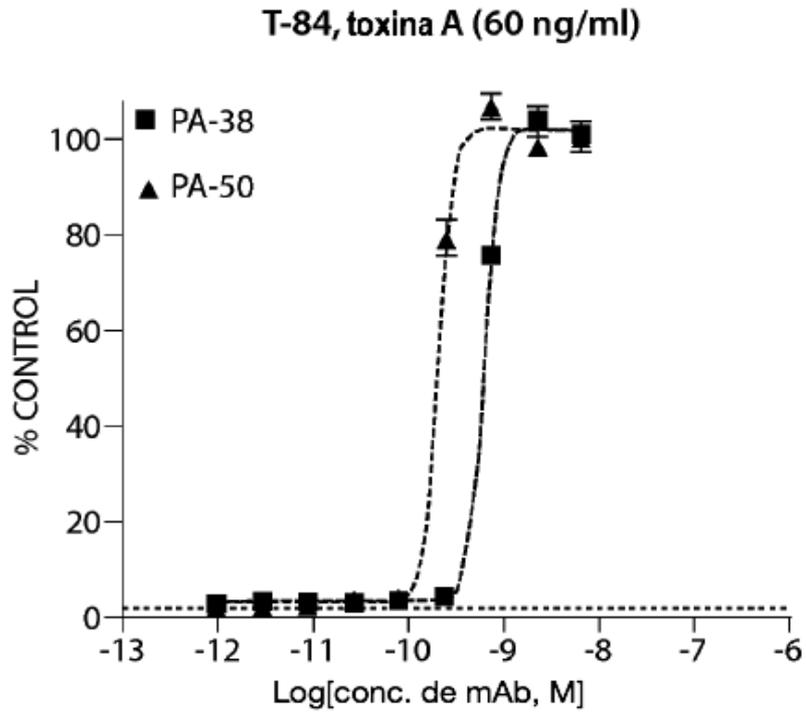


Fig. 6

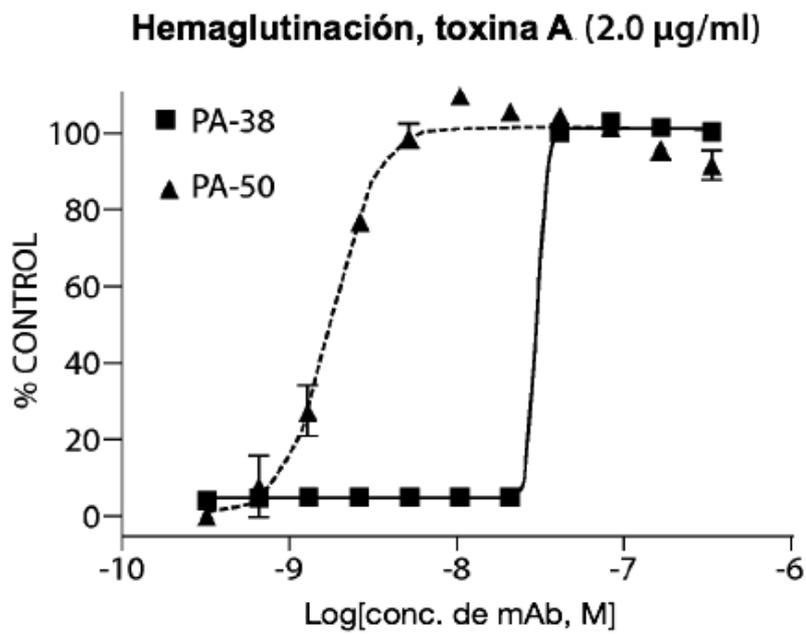


Fig. 7

Permeabilidad de Caco-2, toxina A 25 ng/mL

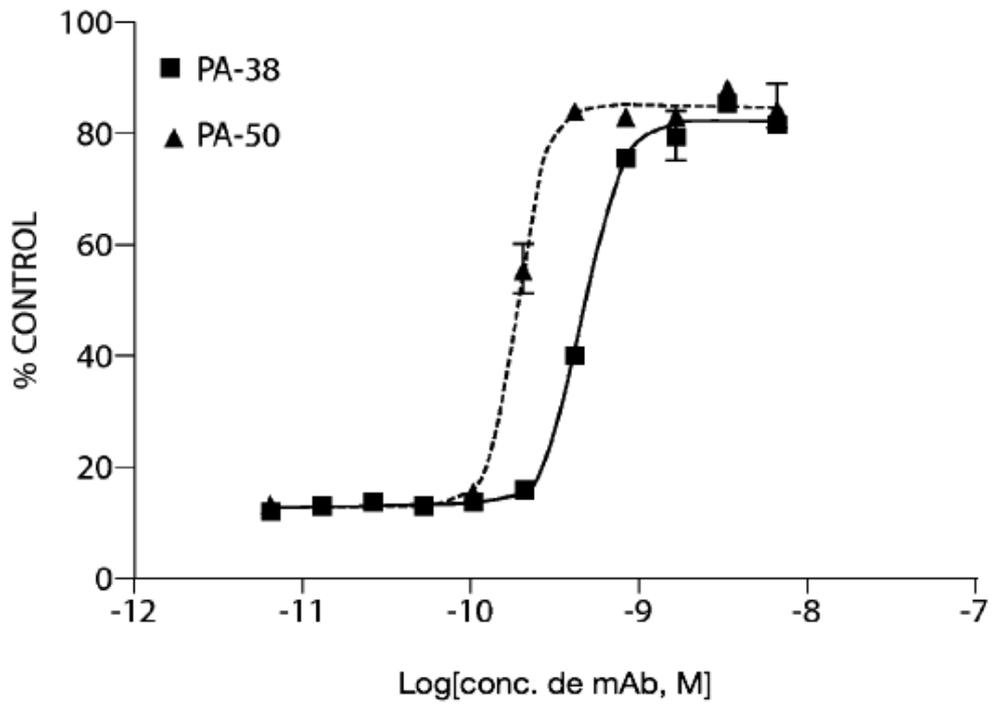


Fig. 8

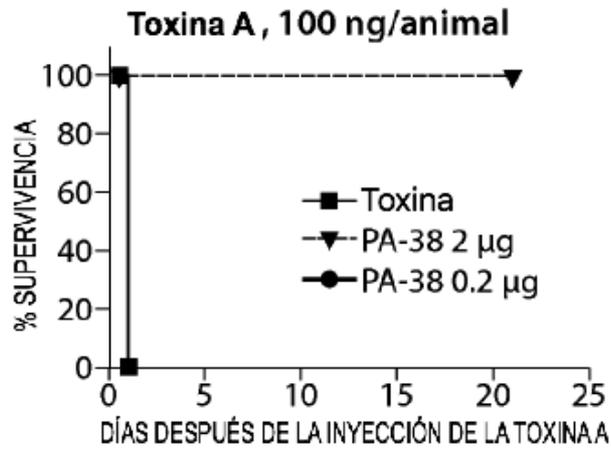


Fig. 9A

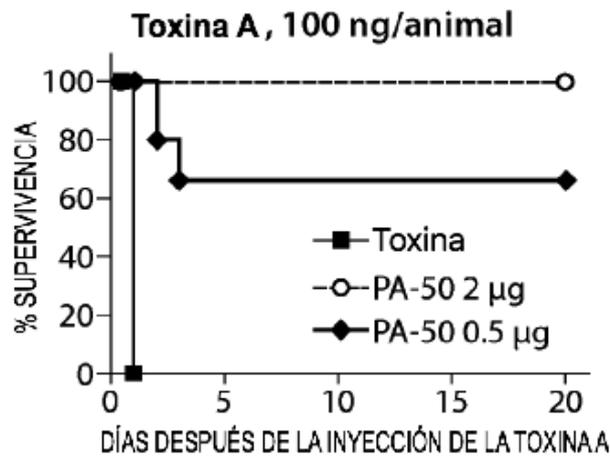


Fig. 9B

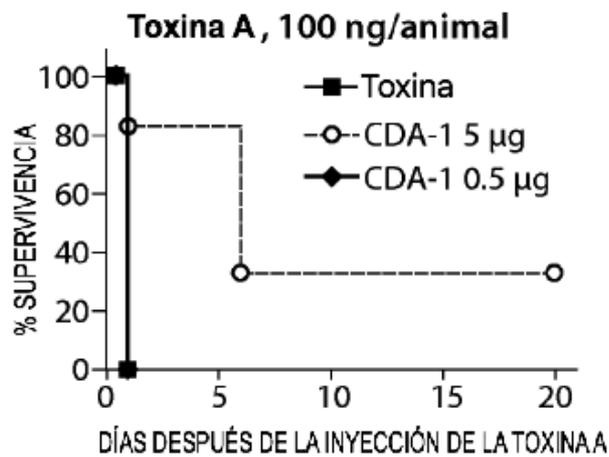


Fig. 9C

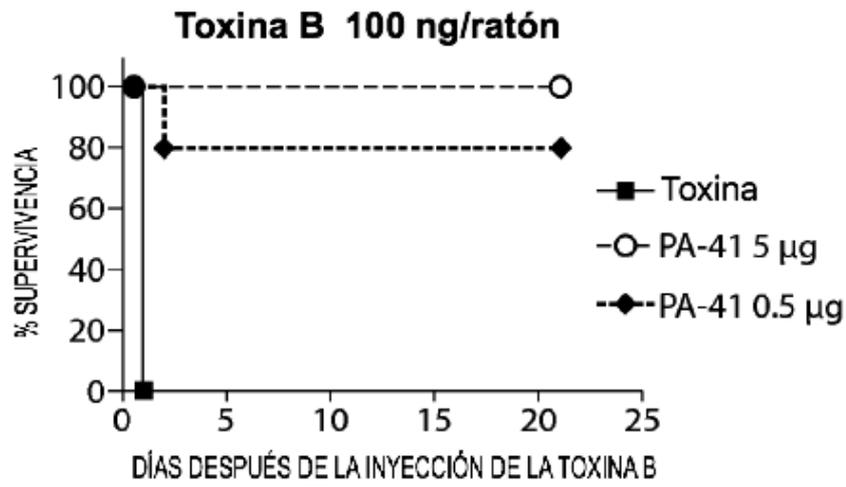


Fig. 10

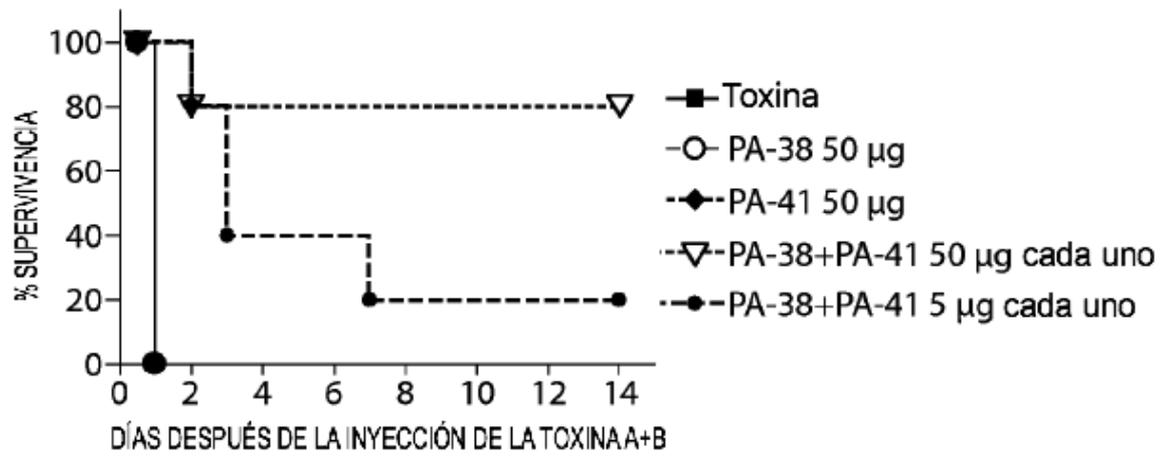


Fig. 11

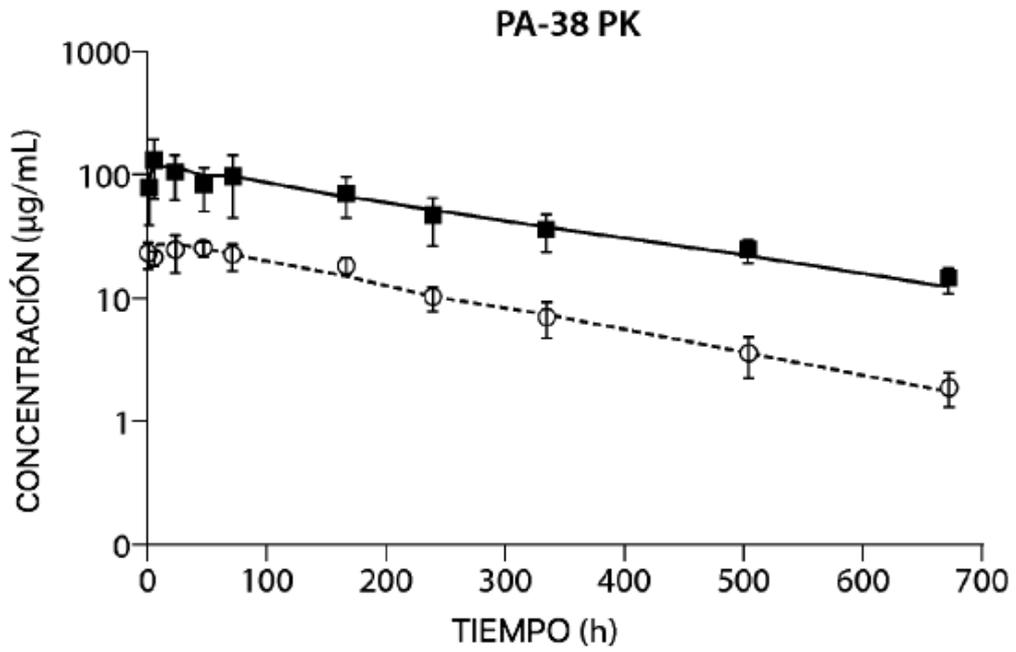


Fig. 12A

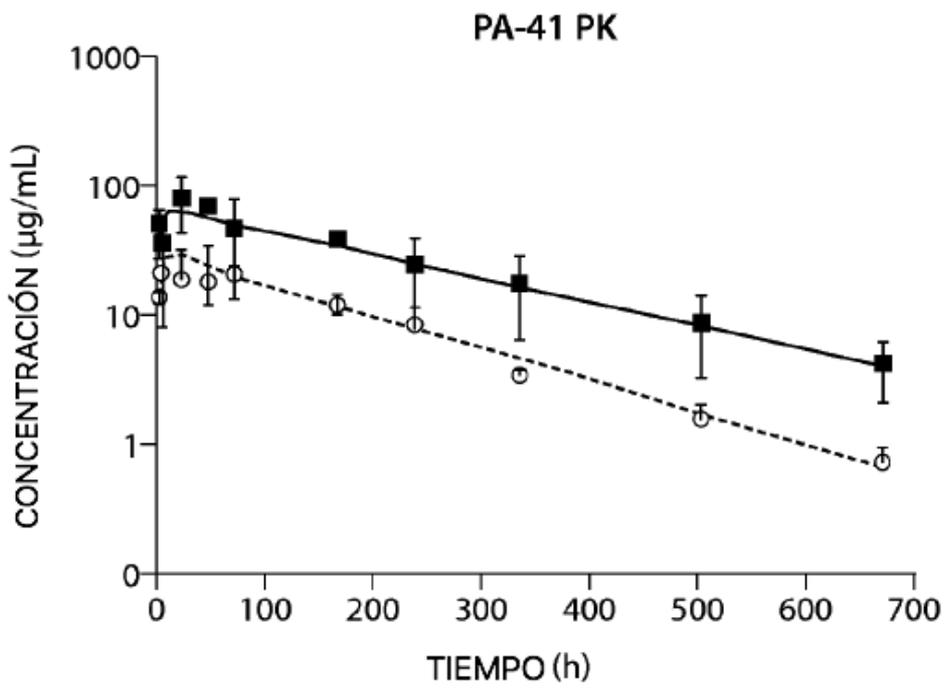


Fig. 12B

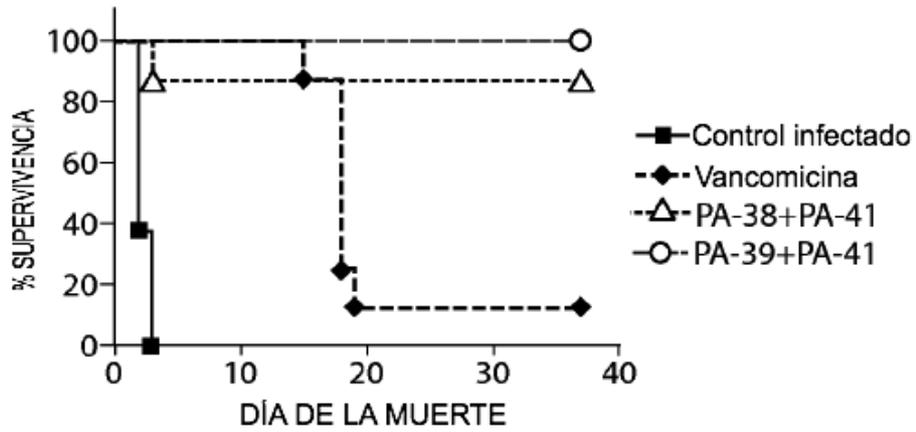


Fig. 13

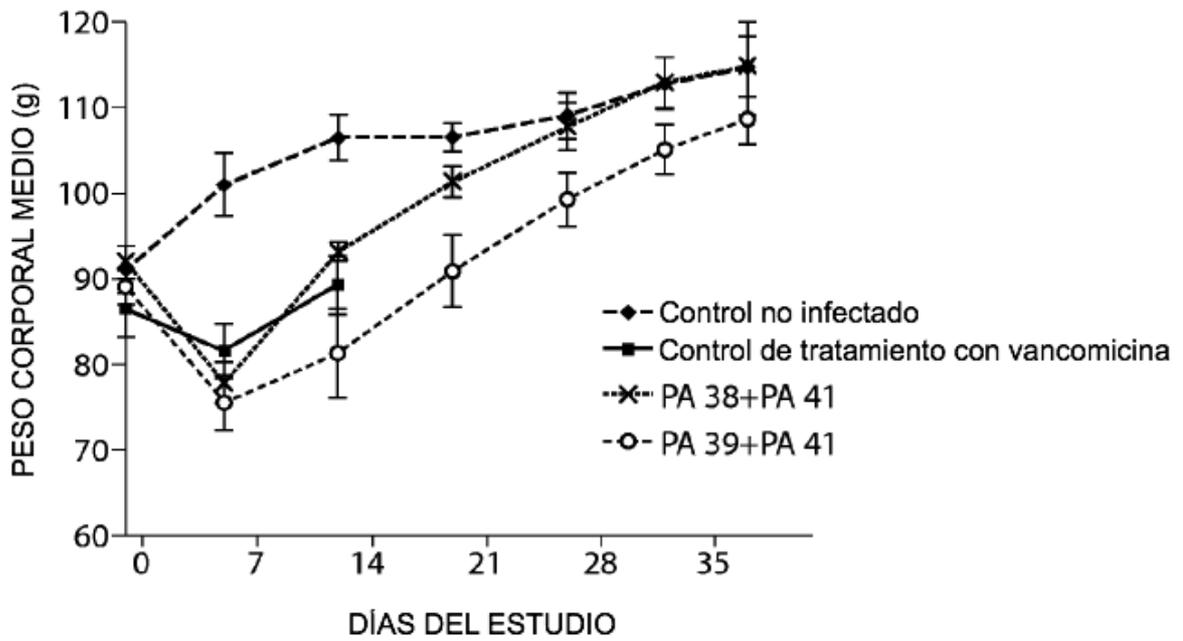


Fig. 14

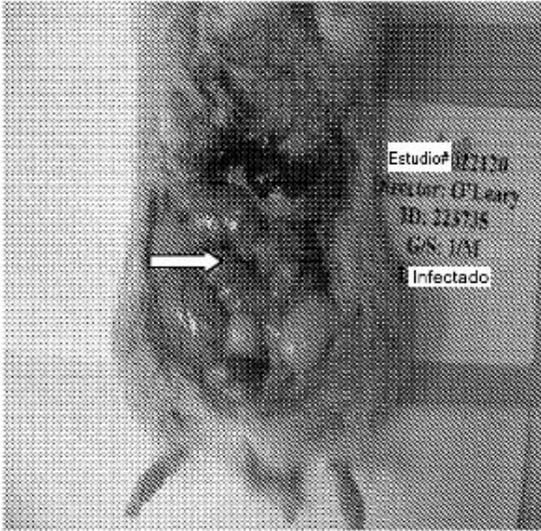


Fig. 15A

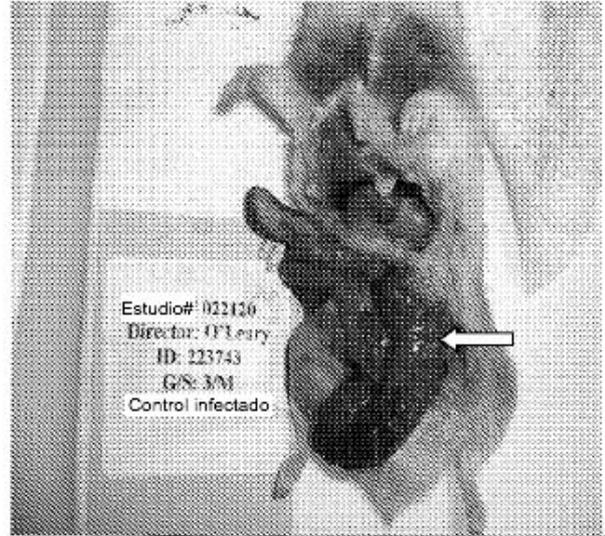


Fig. 15B

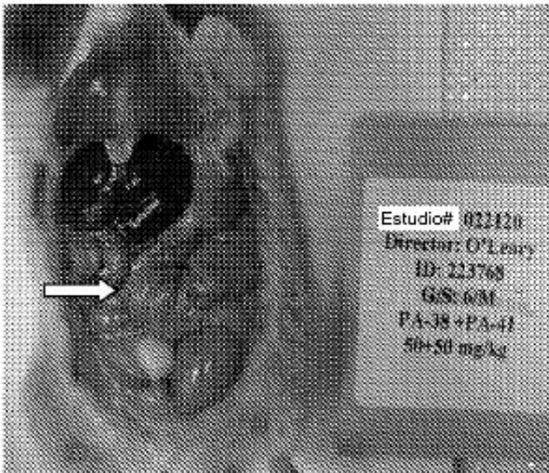


Fig. 15C

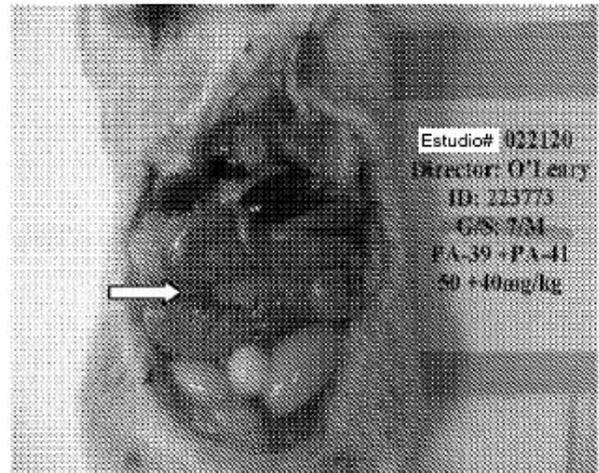


Fig. 15D

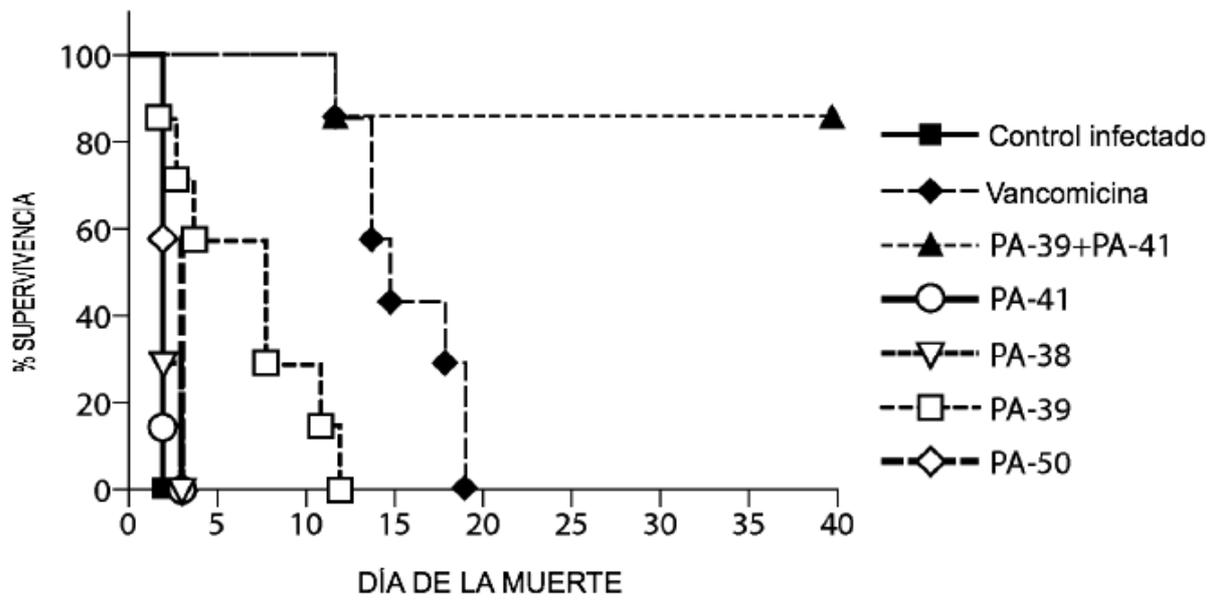


Fig. 16A

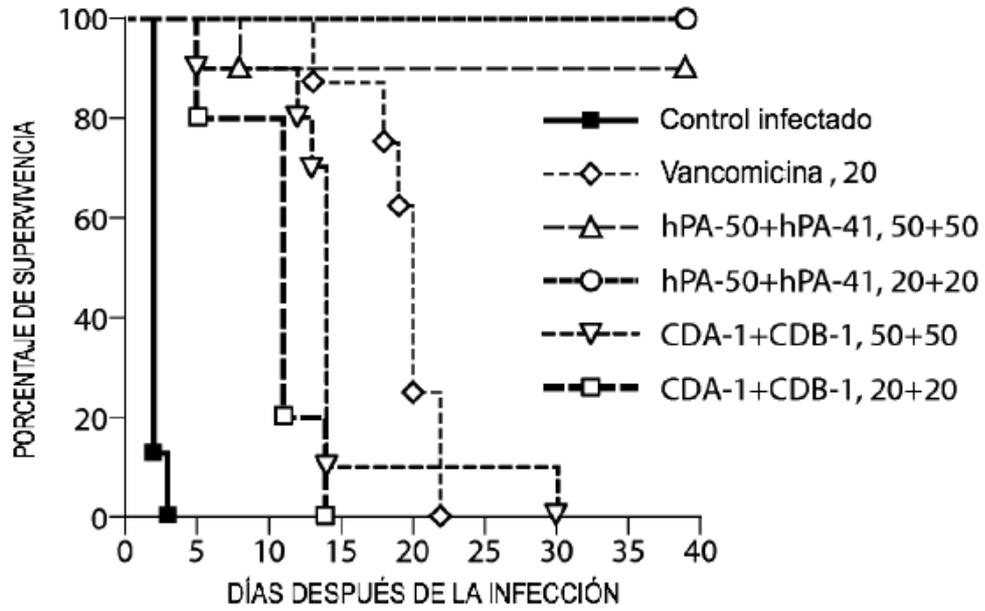


Fig. 16B-1

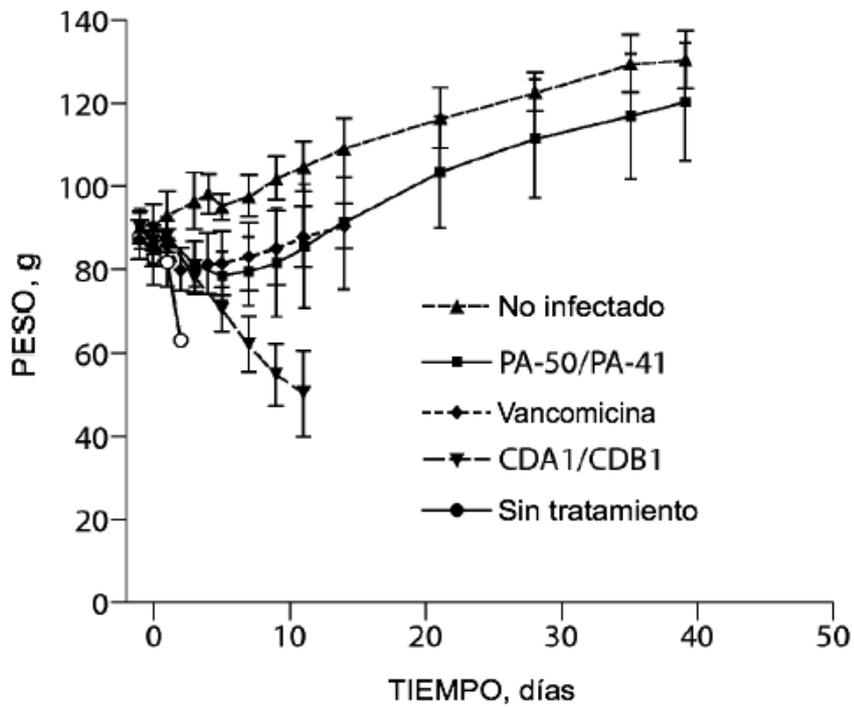


Fig. 16B-2

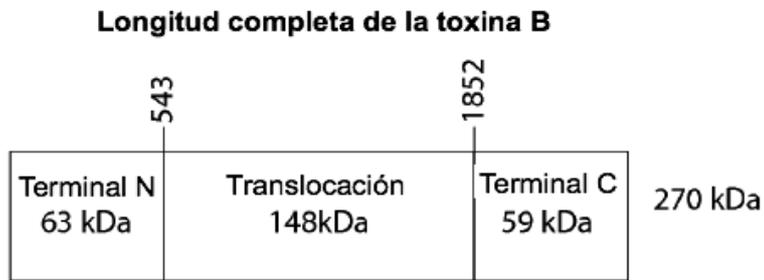


Fig. 17A

**SDS-PAGE reductor/
Azúl de Coomassie**

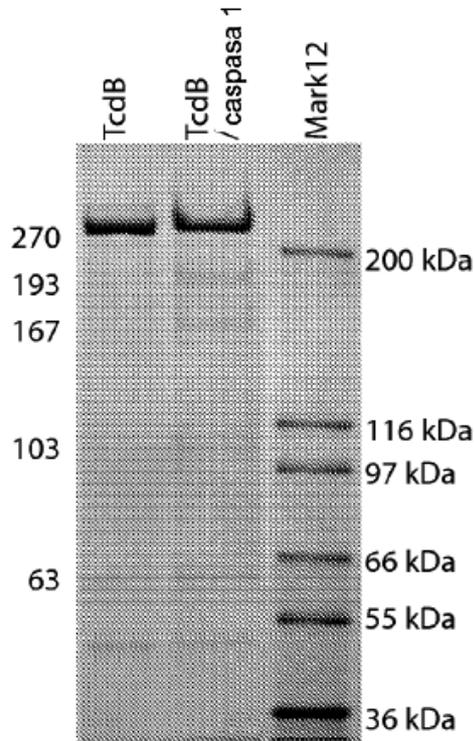


Fig. 17B

Posibles fragmentos de la toxina B del tratamiento con caspasa 1

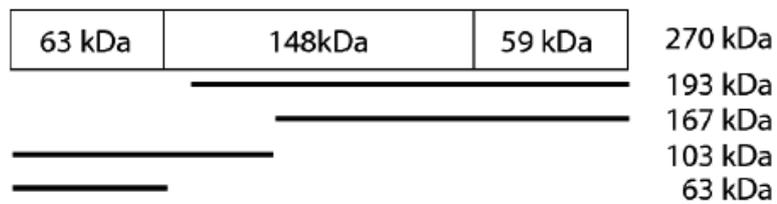


Fig. 17C

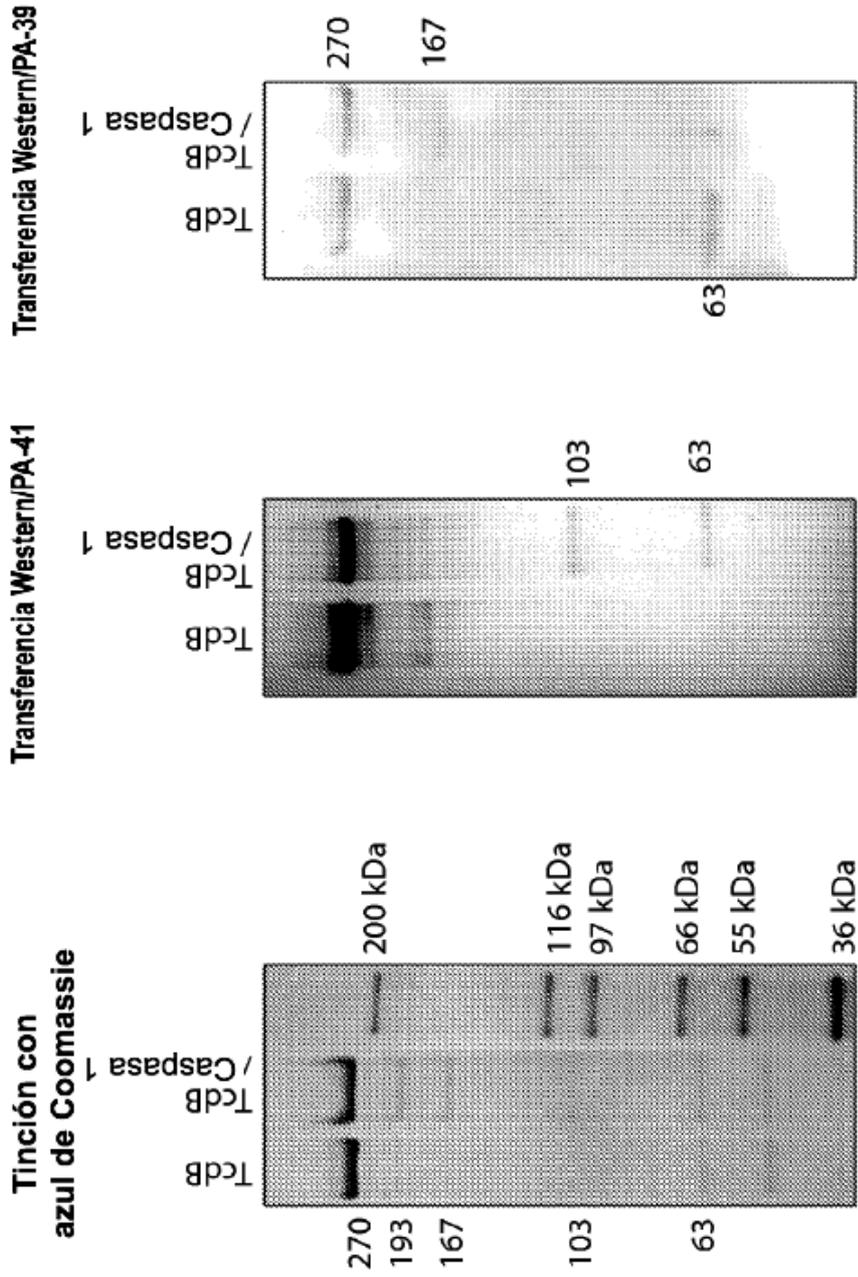


Fig. 18C

Fig. 18B

Fig. 18A

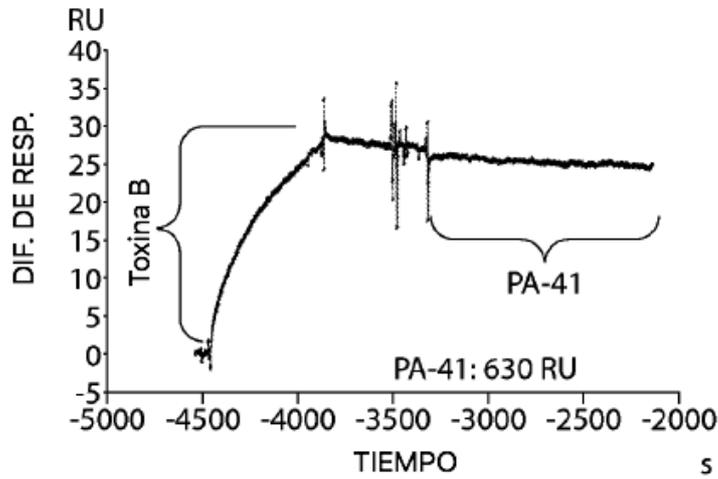


Fig. 19A

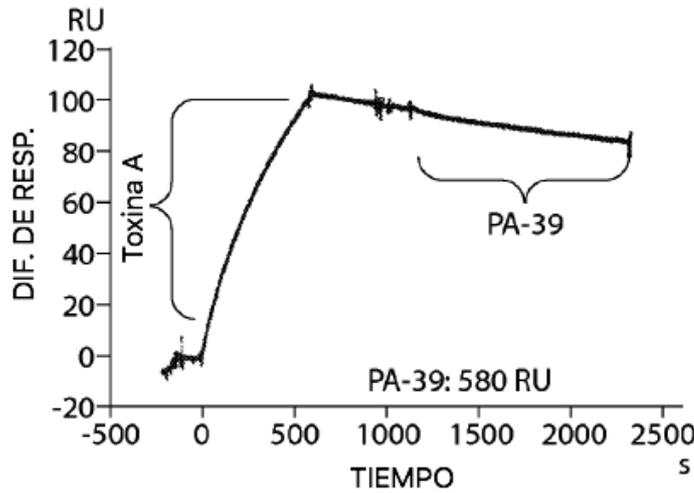


Fig. 19B

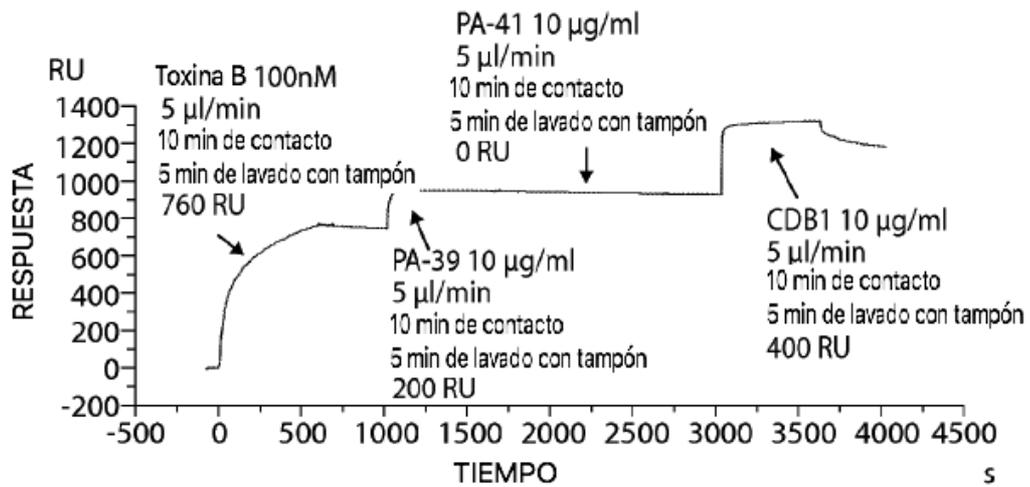


Fig. 19C

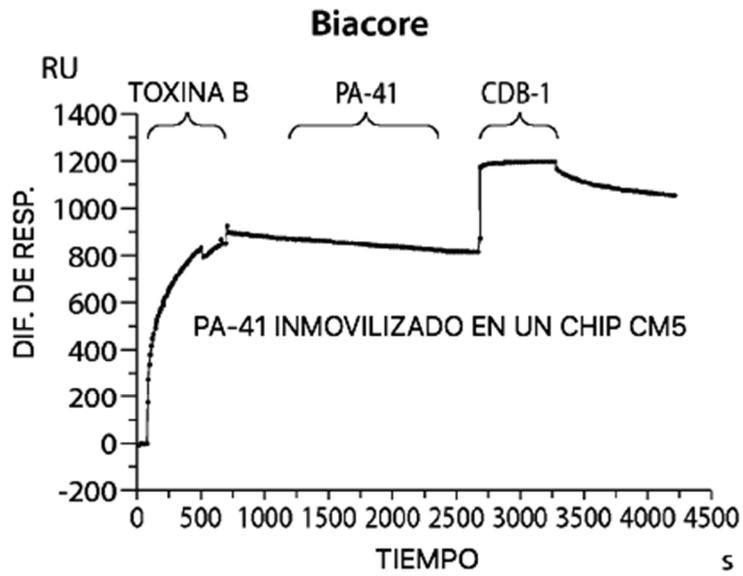


Fig. 19D

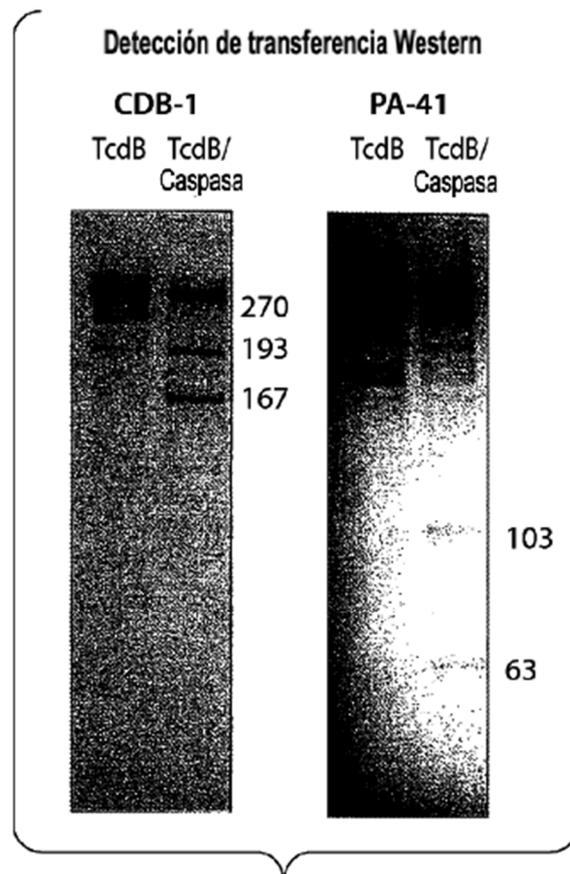


Fig. 19E

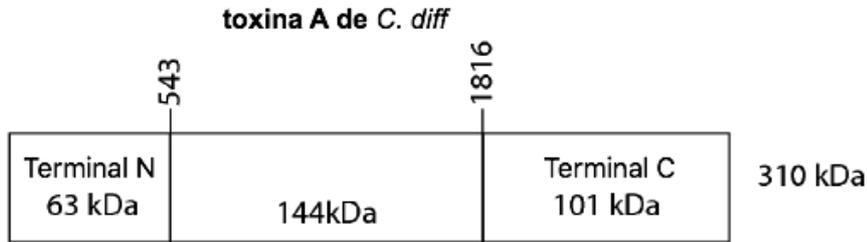


Fig. 20A

SDS-PAGE/Tinción de Coomassie

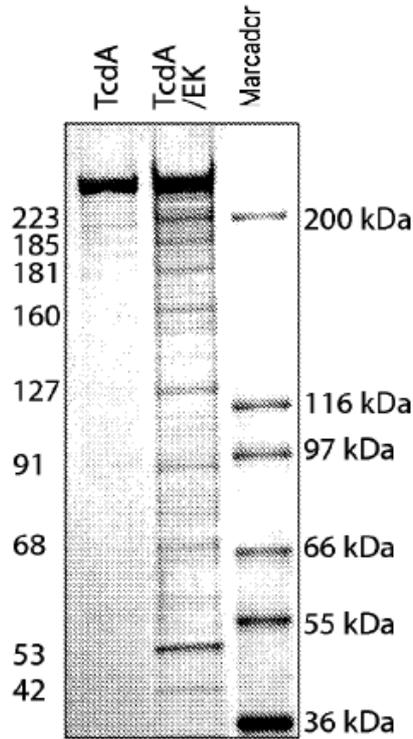


Fig. 20B

Posibles sitios de escisión con EK en a toxina A de *C. diff*



- Terminal C que contiene los fragmentos: 223, 181, 160, 91 y 68 kDa
- Terminal N que contiene los fragmentos: 223, 185 y 127 kDa
- Fragmentos que necesitan más identificación: 160, 53 y 42 kDa

Fig. 20C

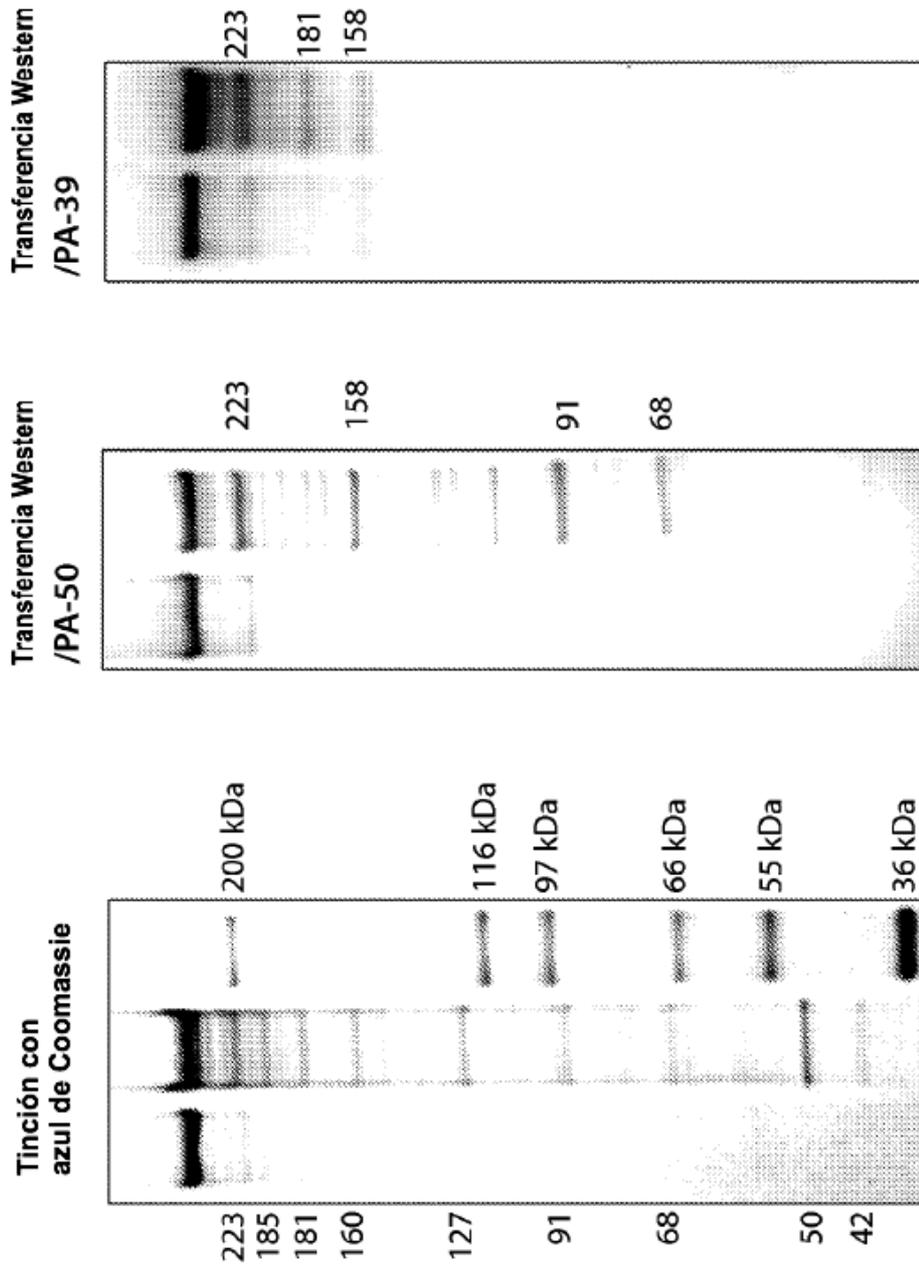


Fig. 21C

Fig. 21B

Fig. 21A

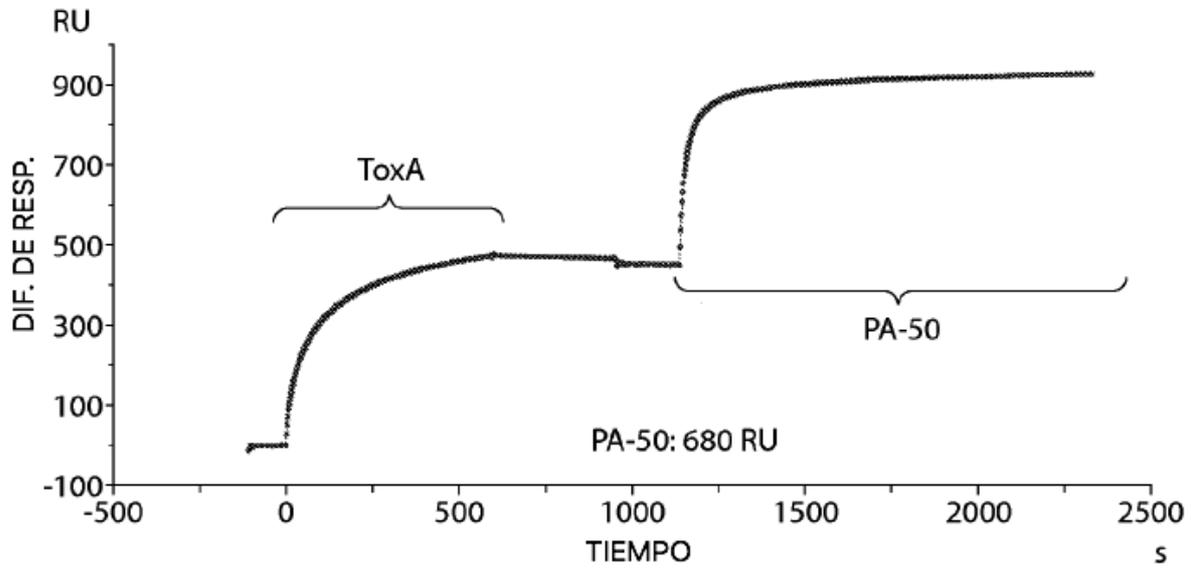


Fig. 22A-1

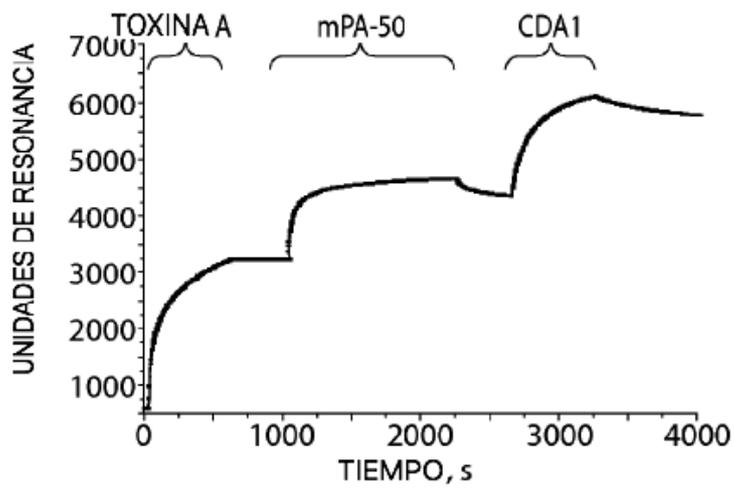


Fig. 22A-2

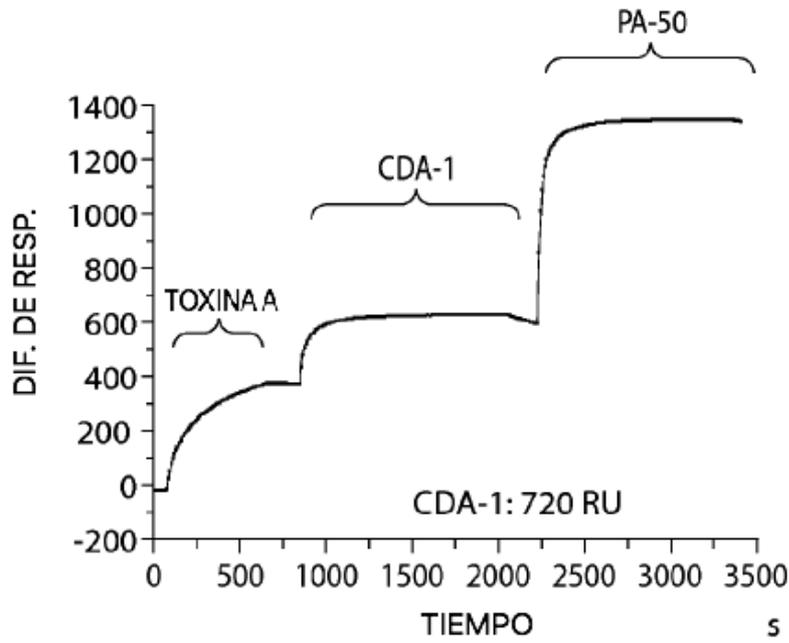


Fig. 22B

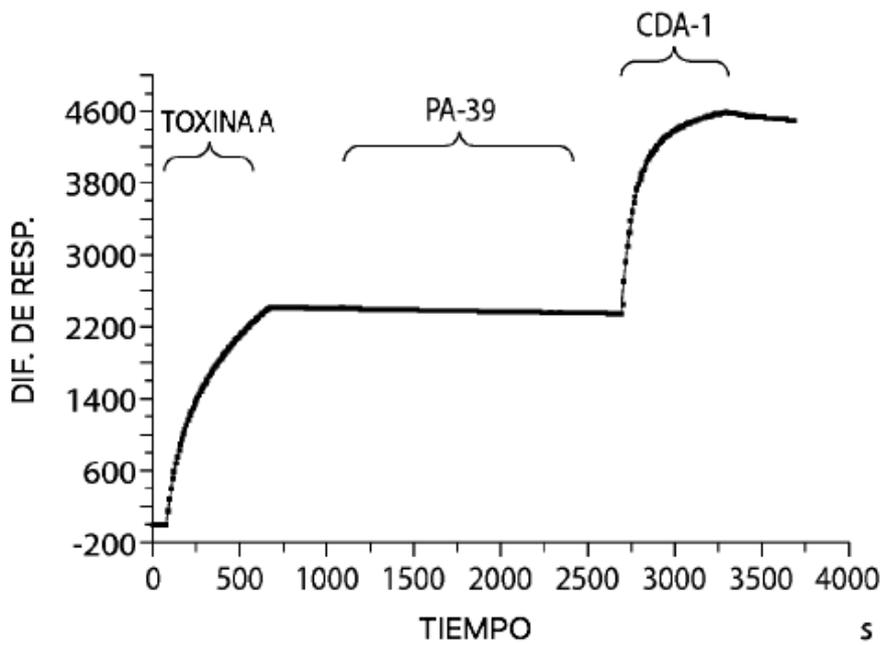


Fig. 22C

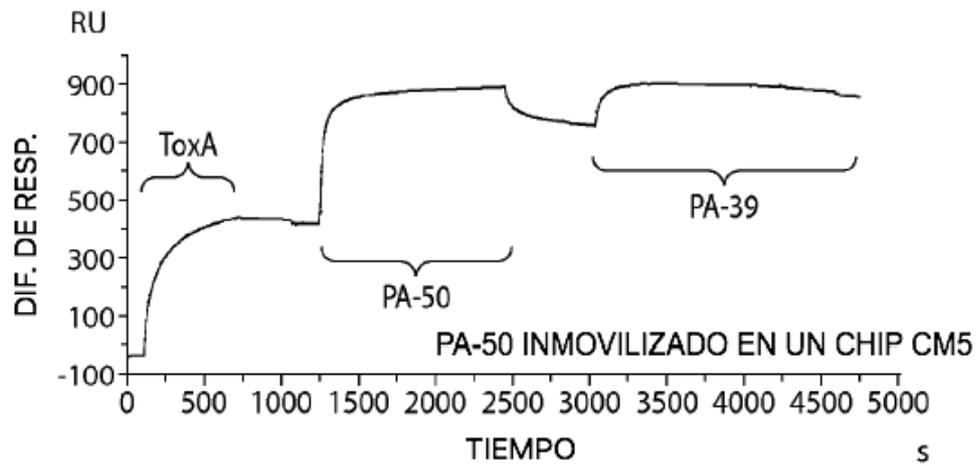


Fig. 22D

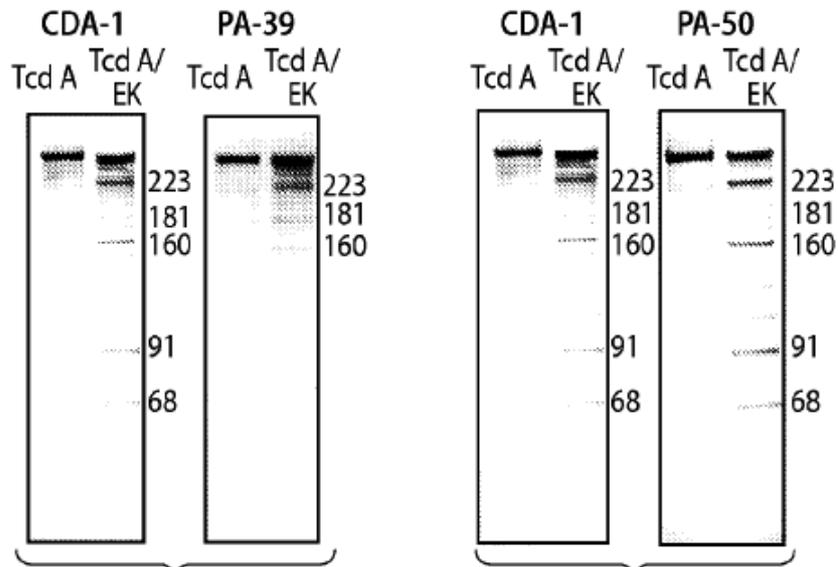


Fig. 22E

Fig. 22F

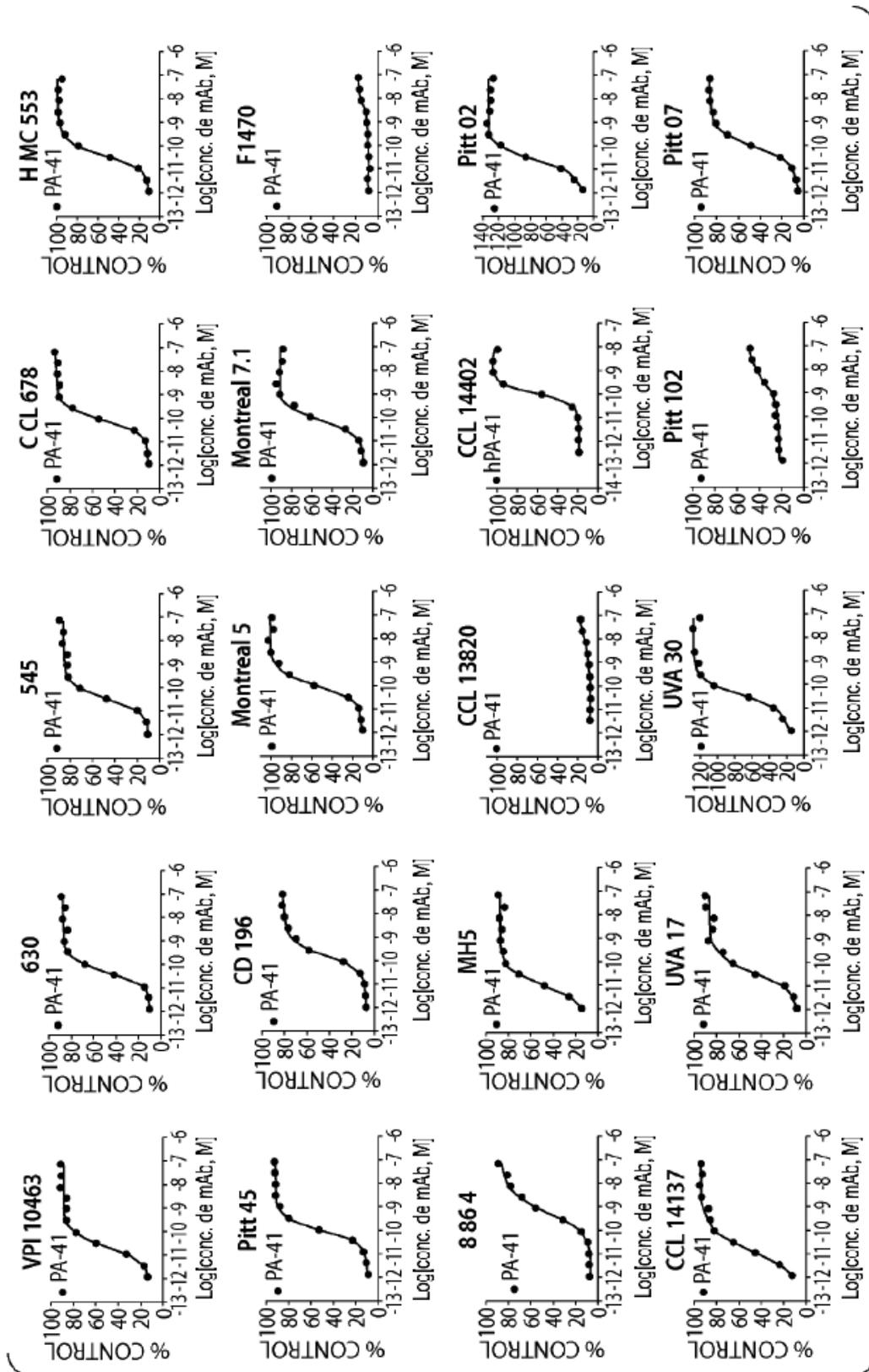


Fig. 23A

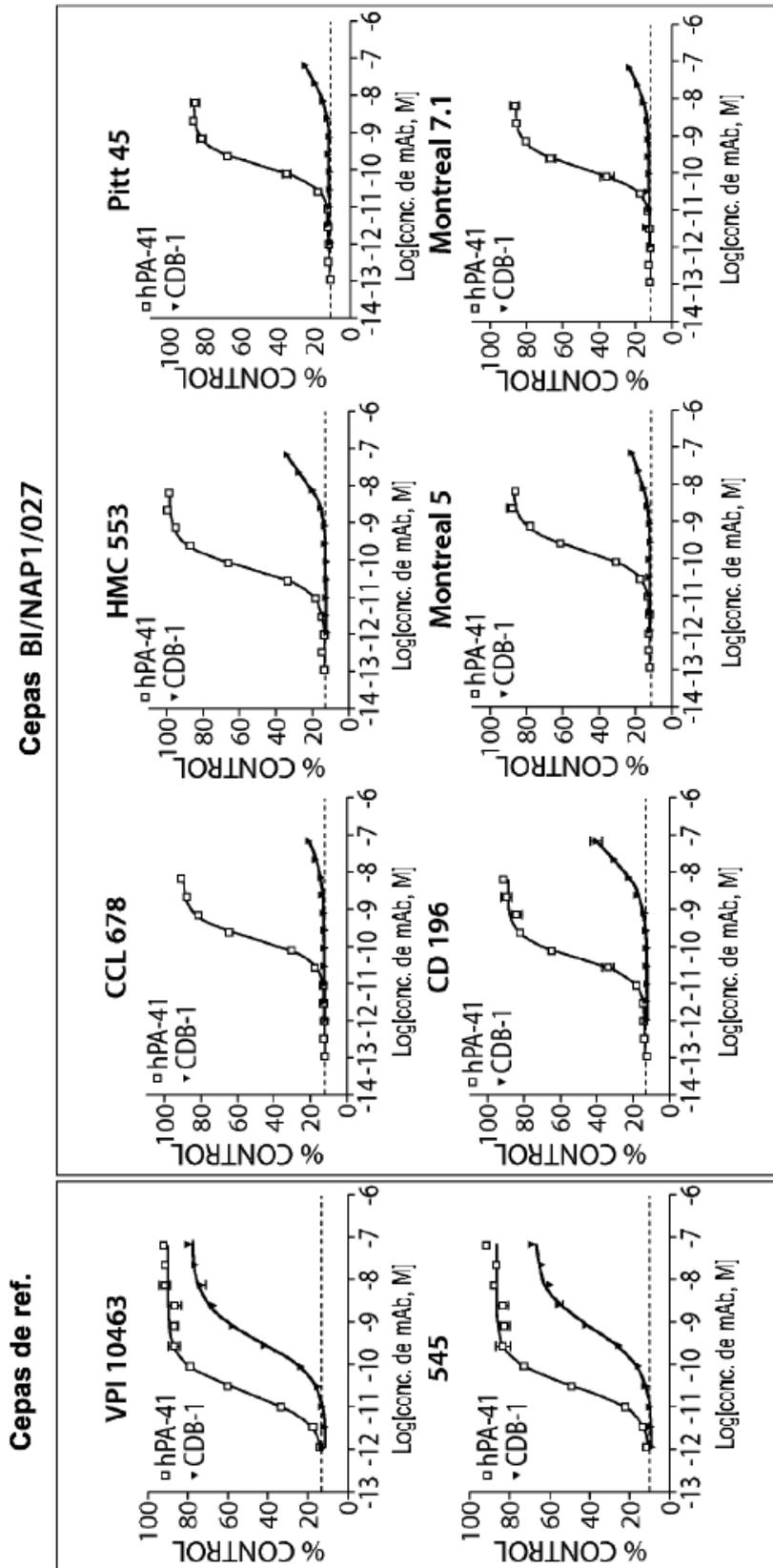
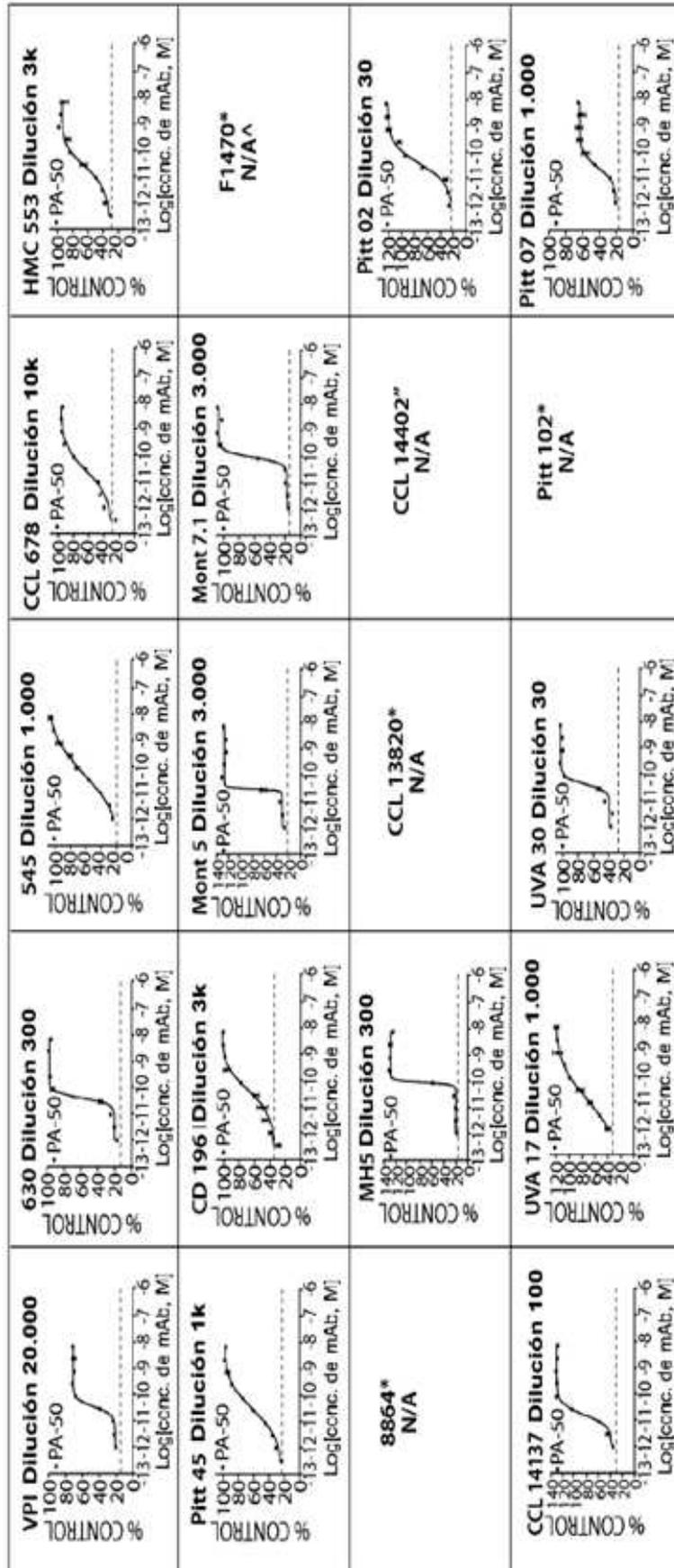


Fig. 23B



*N/A: No aplicable; no se produjo toxina A de las cepas de toxina A de las cepas de toxina A- toxina B+ F1470, 8864, CCL13820 y CCL14402

^El título de la toxina A era muy bajo; no hubo citotoxicidad medible en T-84 usando sobrenadante

No aplicable; no se produjo toxina A a partir de las cepas de toxina A- toxina B+ o la concentración era muy baja **Fig. 24A**

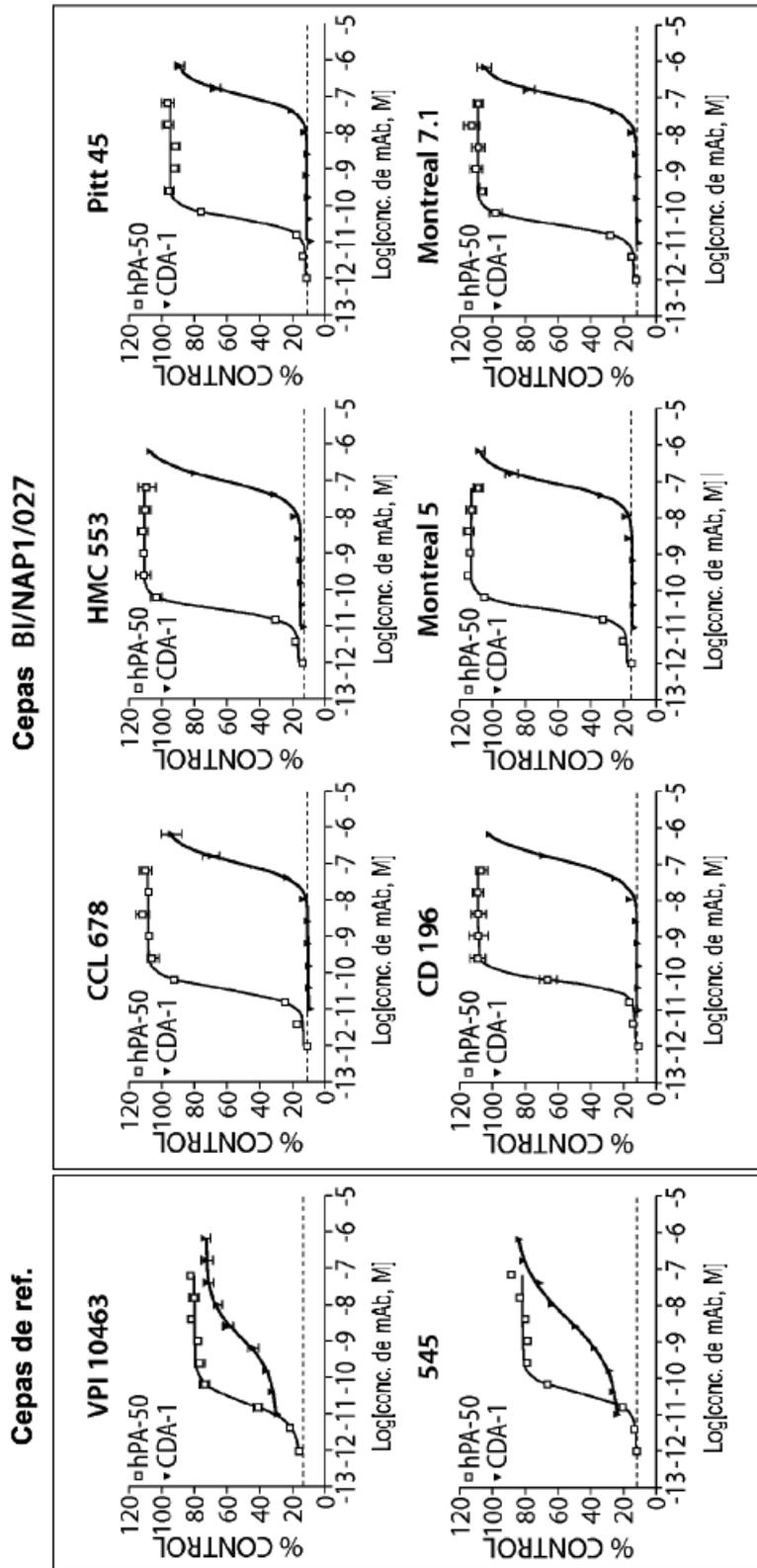
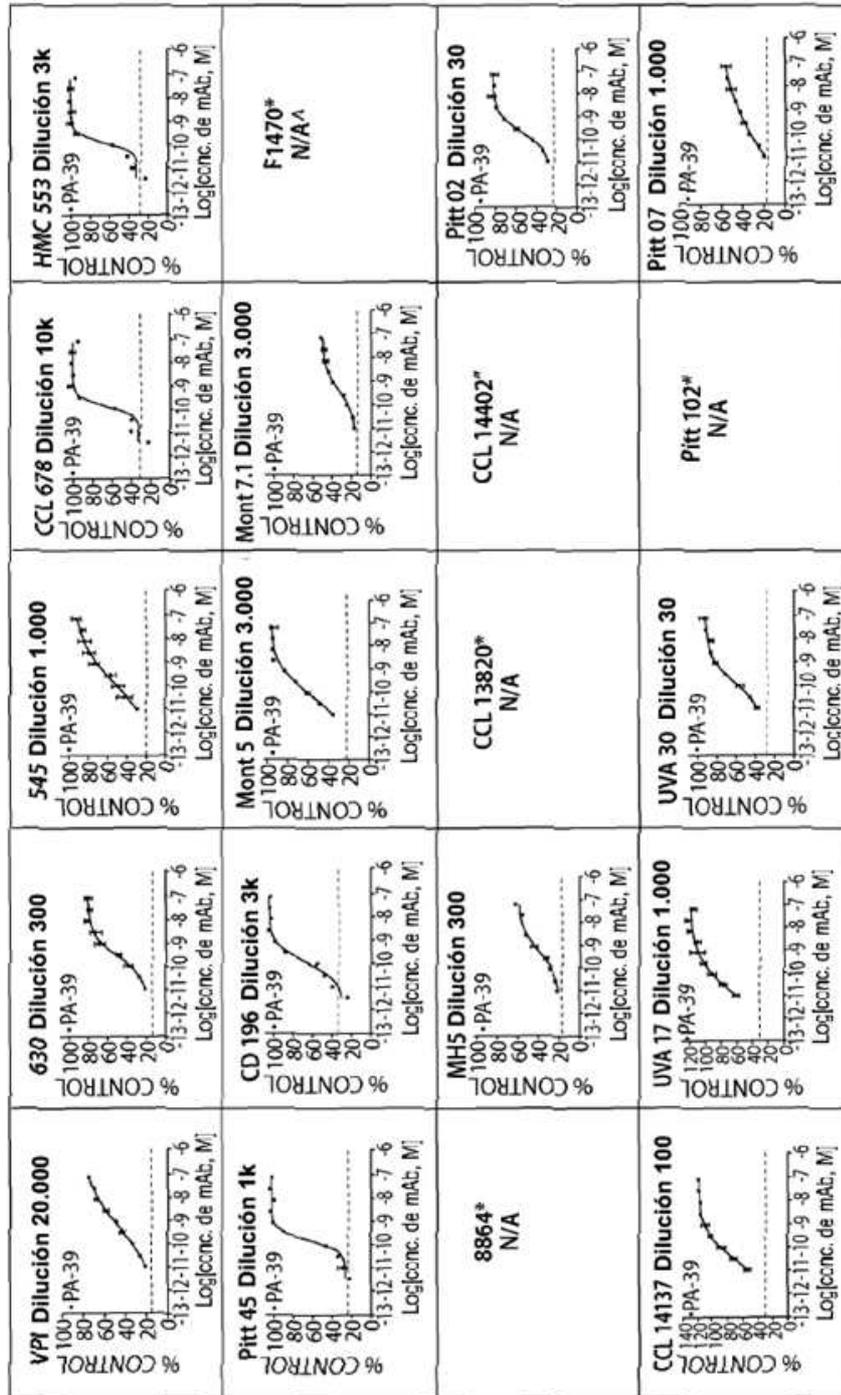


Fig. 24B



*N/A: No aplicable; no se produjo toxina A de las cepas de toxina A-toxina B+ F1470, 8864, CCL13820 y CCL14402

^El título de la toxina A era muy bajo; no hubo citotoxicidad medible en T-84 usando sobrenadante

^No aplicable; no se produjo toxina A a partir de las cepas de toxina A-toxina B+ o la concentración era muy baja

Fig. 25A

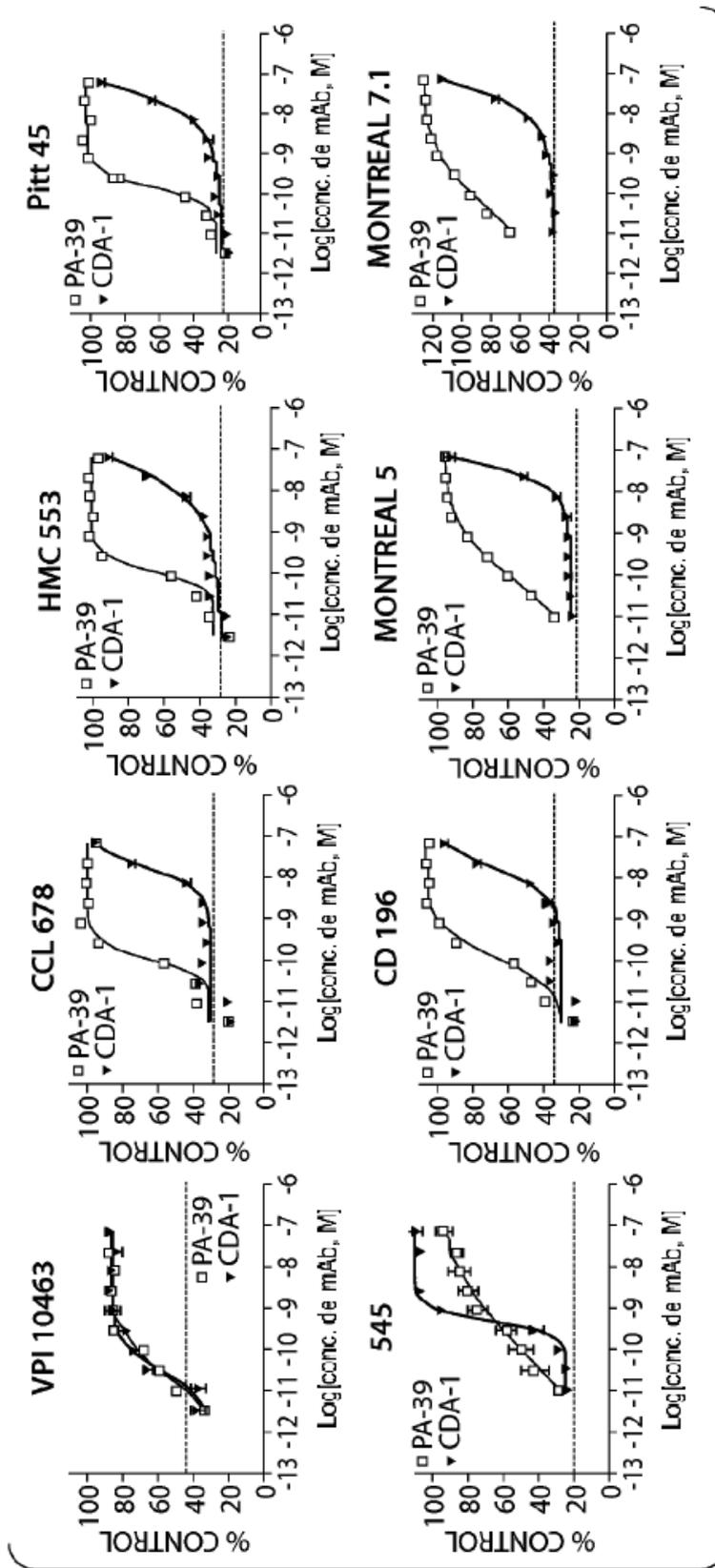


Fig. 25B

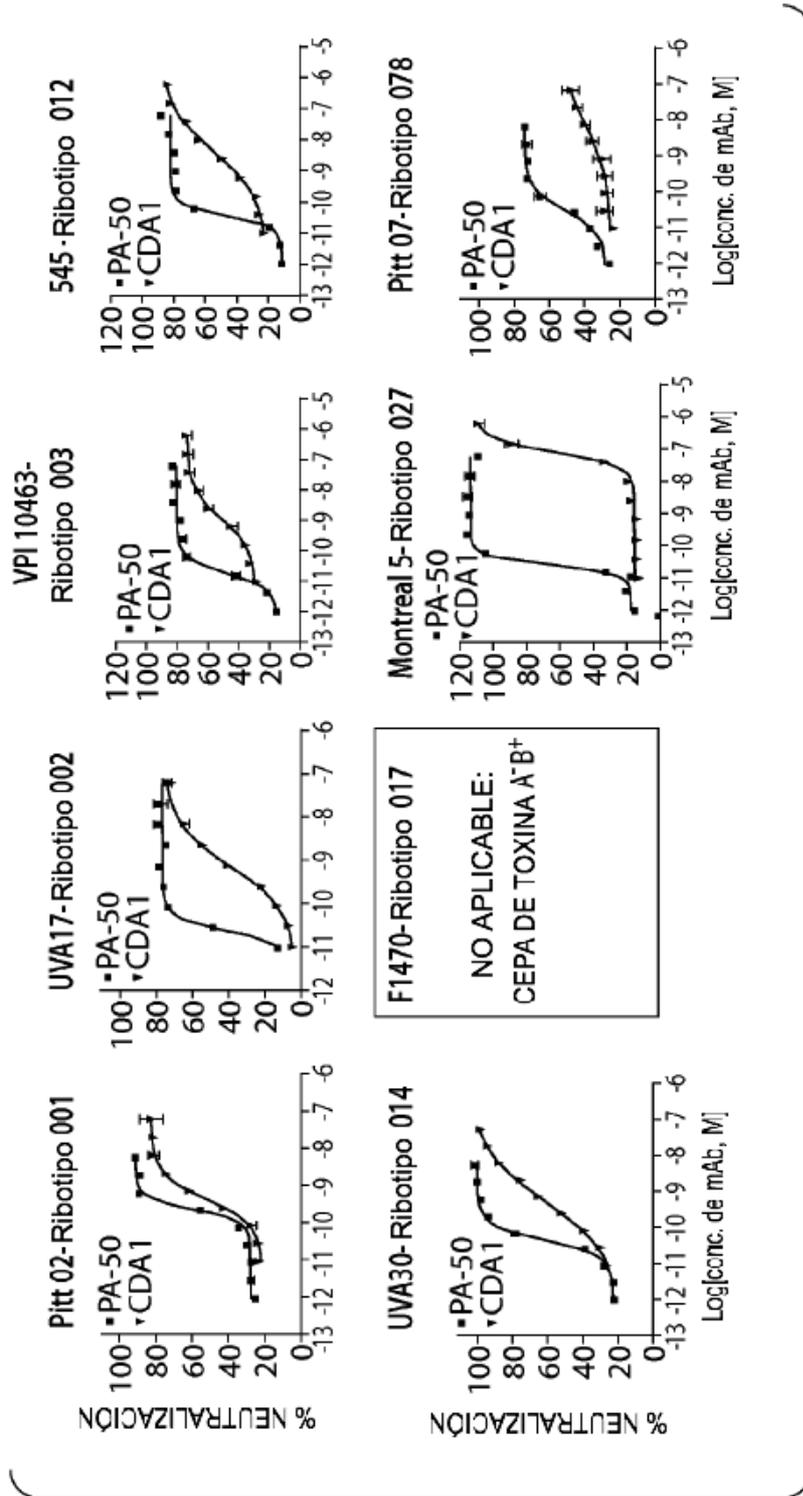


Fig. 25C

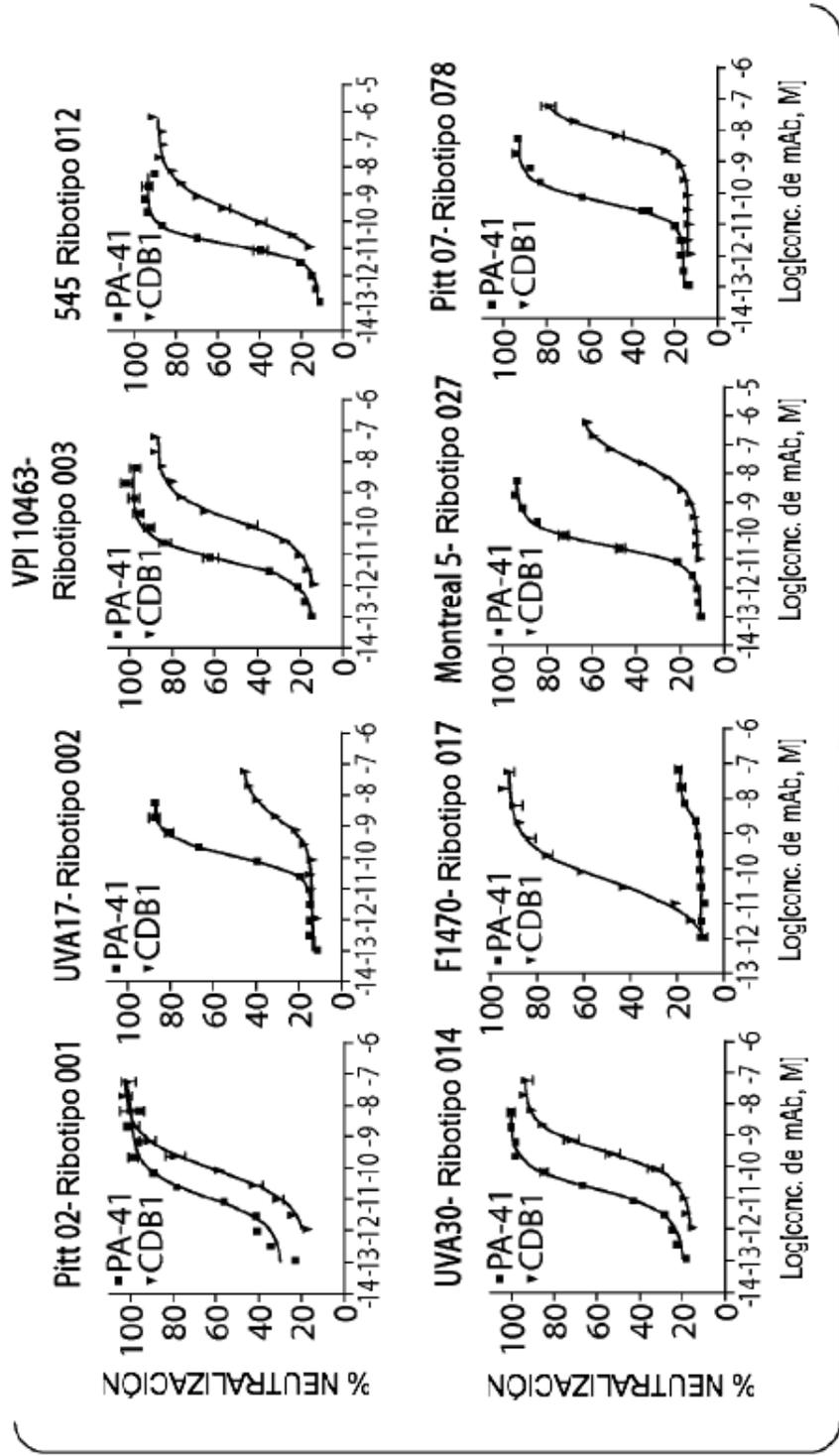


Fig. 25D

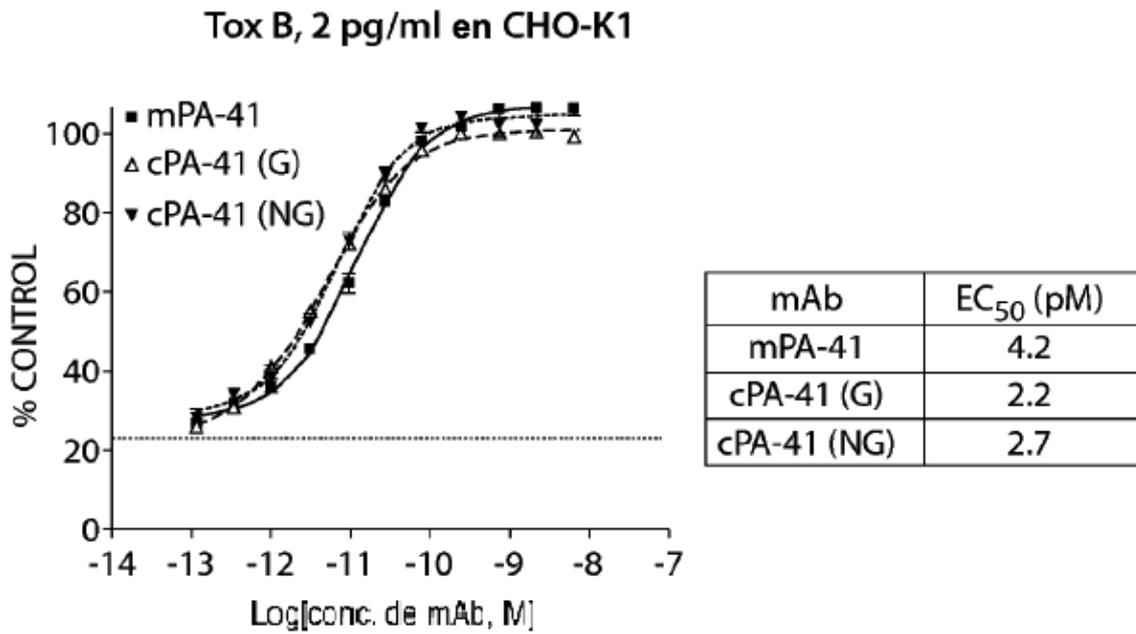


Fig. 26

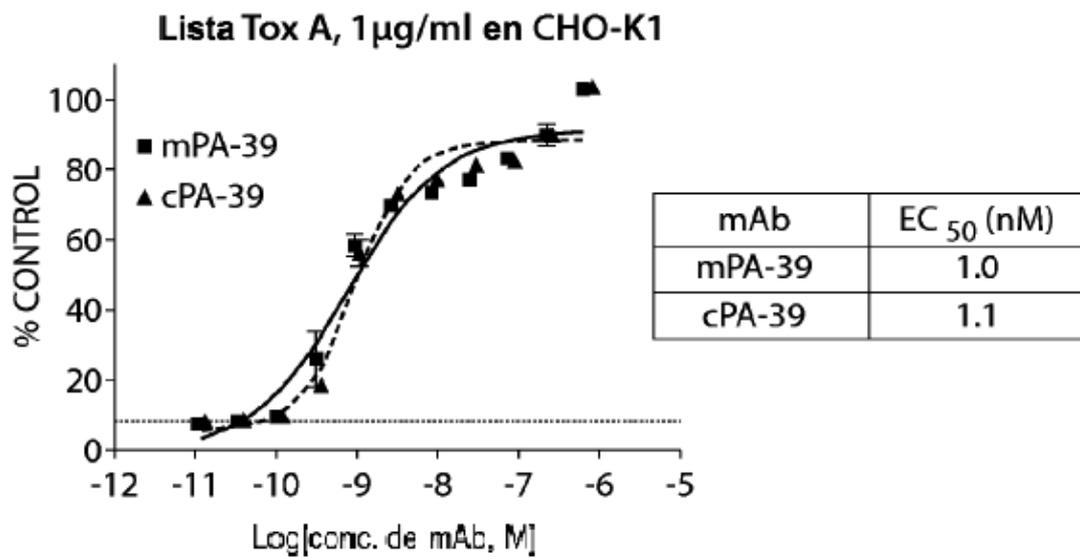


Fig. 27

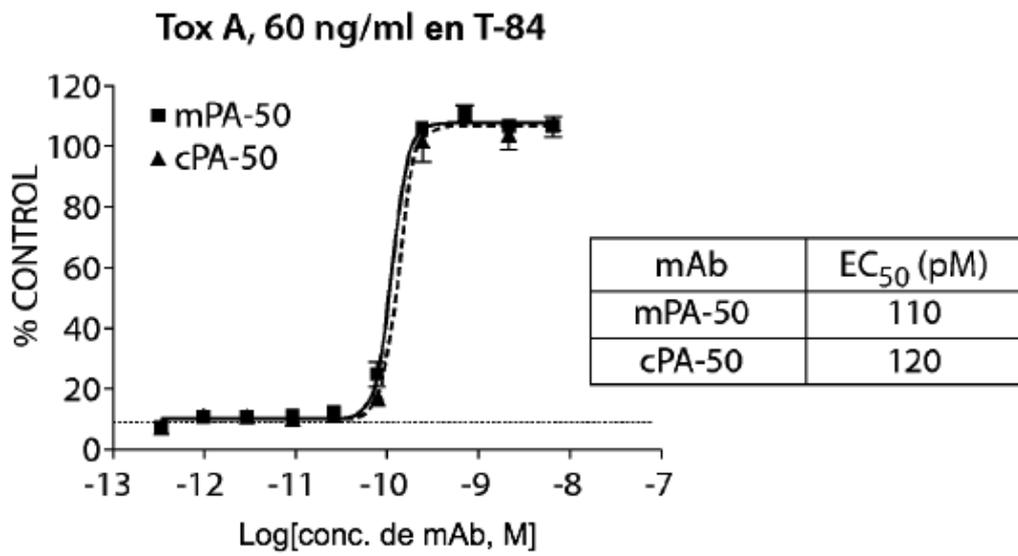


Fig. 28

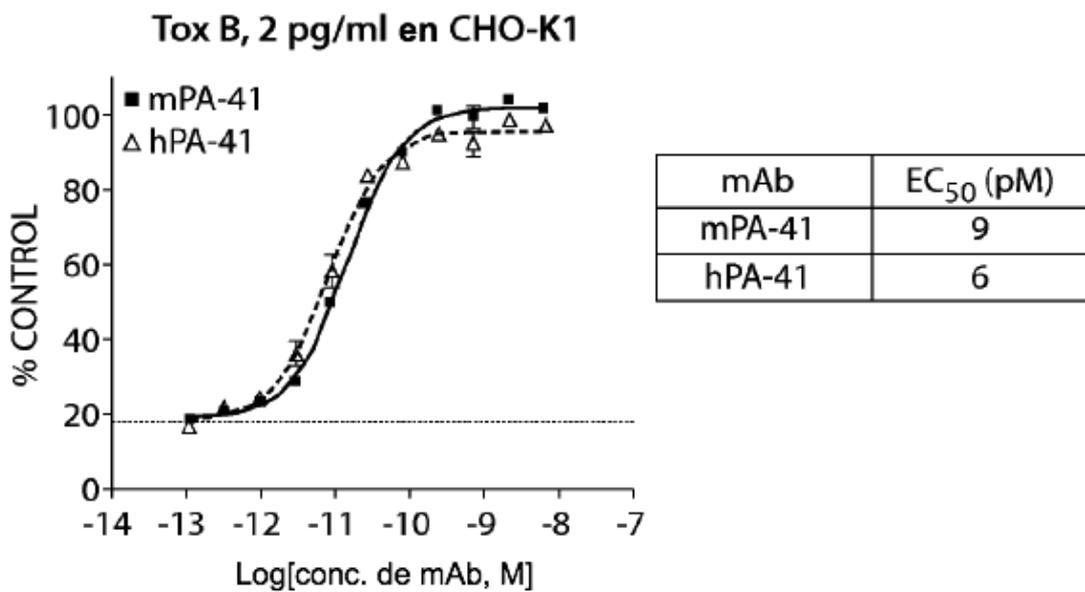


Fig. 29

Toxina A en células CHO-K1 (20 ng/ml)

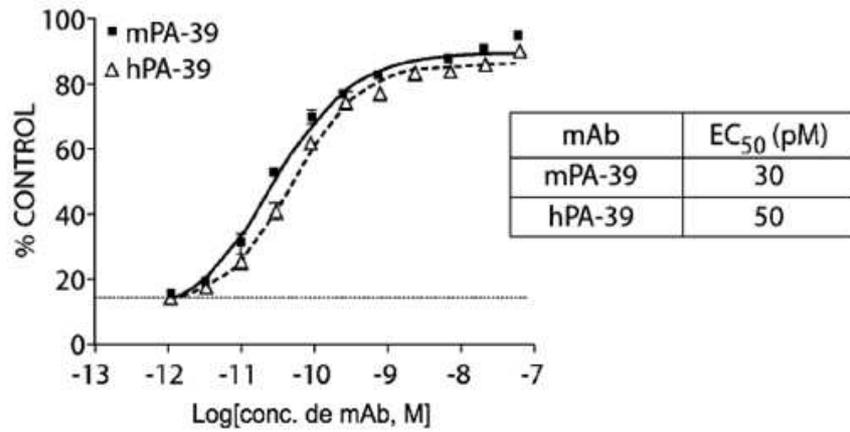


Fig. 30

Toxina A en células T-84 (60 ng/ml)

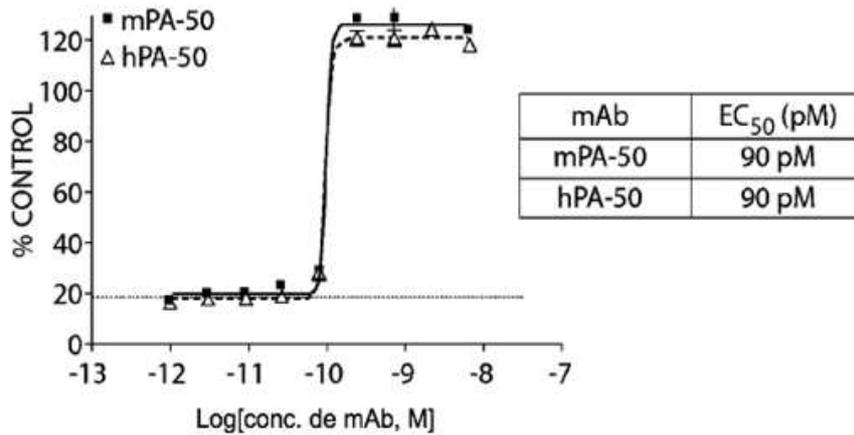


Fig. 31A

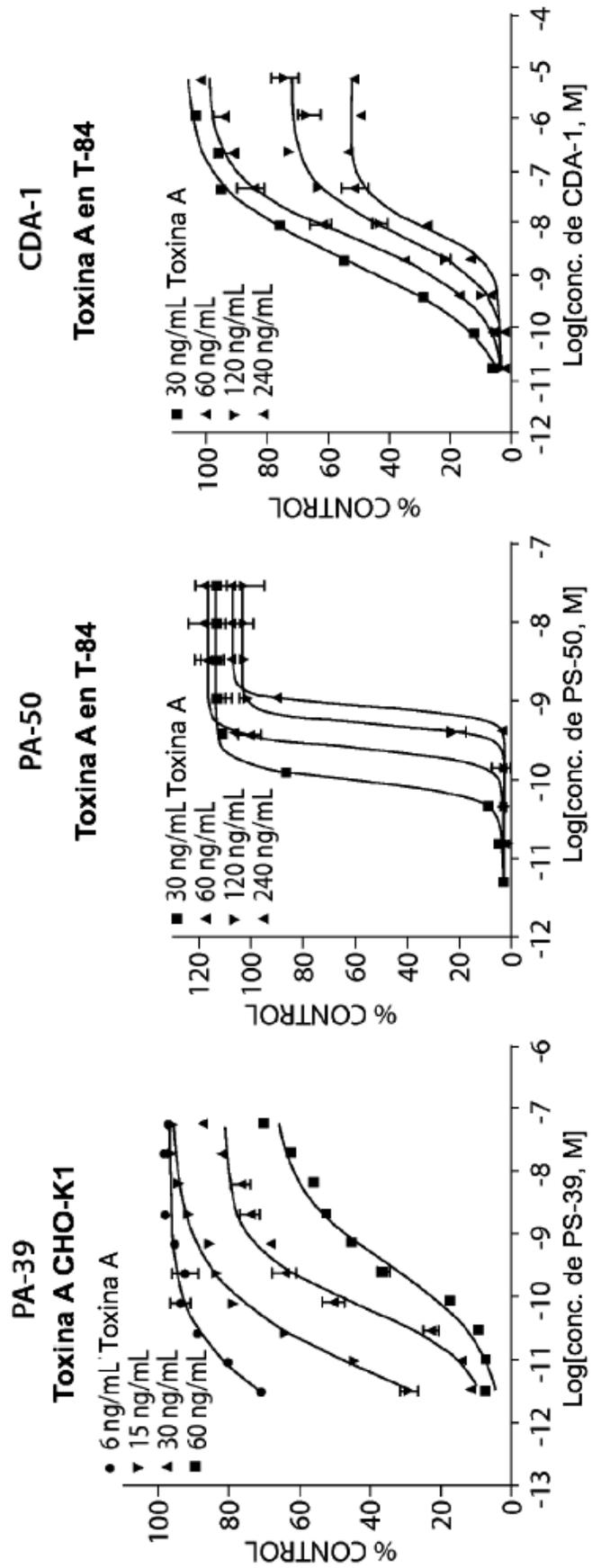


Fig. 31B

Fig. 31C

Fig. 31D

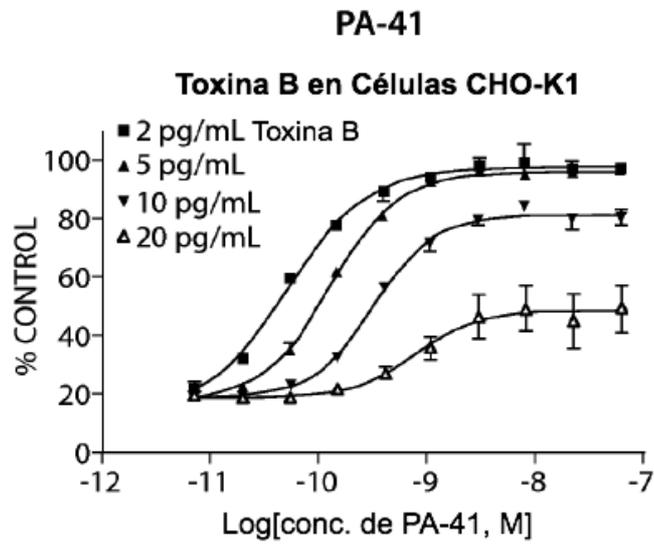


Fig. 31E

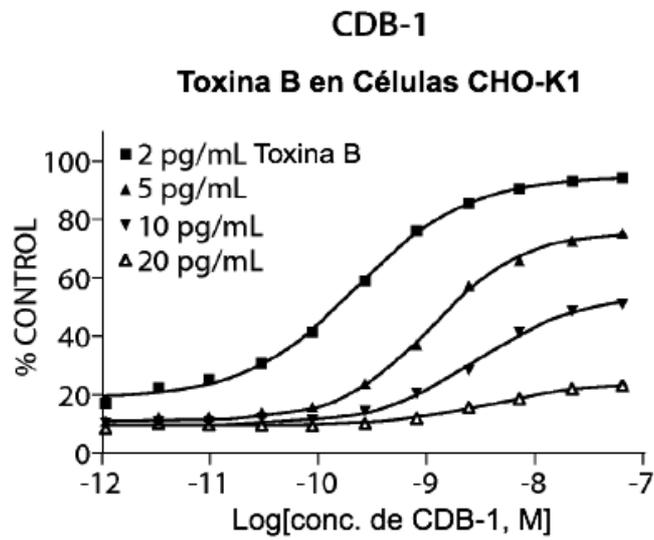


Fig. 31F

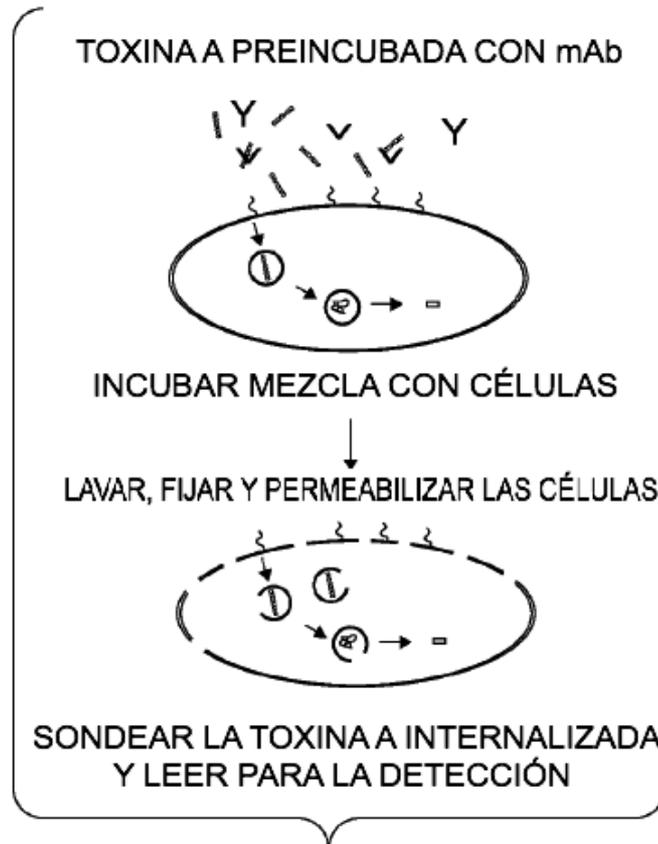


Fig. 31G

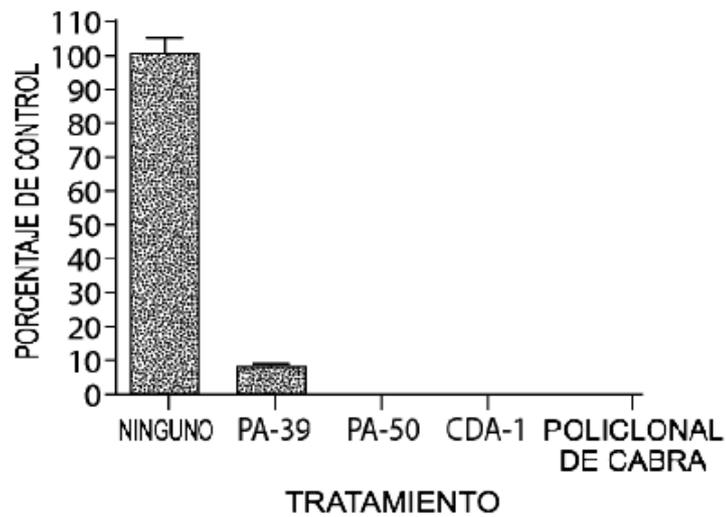


Fig. 31H

```

          1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF NDHNIHWVRQ

4           5           6           7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APGQGLEWIG YIYPYIGTTVY NQKFKSKATL TVDTSTSTAY

          1           1
8           9           0           1
0122223456789 0123456789 0123456789 0123
MELRSLRSDDTAV YYCSRWGHRG FPYWGQGLV TVSS
(SEQ ID NO:1)
```

Fig. 32A

```

          1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF NDHNIHWVRQ

4           5           6           7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APGQGLEWIG YIYPYIGTTVY NQKFKSKATL TVDNSTSTAY

          1           1
8           9           0           1
0122223456789 0123456789 0123456789 0123
MELRSLRSDDTAV YYCSRWGHRG FPYWGQGLV TVSS
(SEQ ID NO:2)
```

Fig. 32B

```

      1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQNV GTNVAWYQQK

4           5           6           7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGKAPKALIY SASYRYSQVS SRFSGSGSGT DFTLTISLQ

      1
8           9           0
0123456789 0123456789 01234567
PEDFAVYYCQ QYYSYPYTFG QGTKLEIK
(SEQ ID NO:3)
```

Fig. 33A

```

      1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQNV GTNVAWYQQK

4           5           6           7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGKAPKVLIIY SASYRYSQVS SRFSGSGSGT DFTLTISLQ

      1
8           9           0
0123456789 0123456789 01234567
PEDFAVYYCQ QYYSYPYTFG QGTKLEIK
(SEQ ID NO:4)
```

Fig. 33B

ES 2 757 675 T3

```

      1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TDYNMDWVRQ

      4           5           6           7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APGQRLEWIG DINPKYDIIGH NPKFMGKATL TVDKSASTAY

      8           9           1           1
01222234567890 123456789 00123456789 0123
MELSSLRSEDTAV YYCARSDRGW YFDVWGQGLV TVSS
(SEQ ID NO:5)
```

Fig. 34A

```

      1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TDYNMDWVRQ

      4           5           6           7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APGQRLEWIG DINPKYDIIGH NPKFMGKATI TVDKSASTAY

      8           9           1           1
01222234567890 123456789 00123456789 0123
MELSSLRSEDTAV YYCARSDRGW YFDVWGQGLV TVSS
(SEQ ID NO:6)
```

Fig. 34B

```

      1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASSSV NYMNWYQQKP

      4           5           6           7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
GQAPRPRIYA TSNLAGVPA RFSGSGSGTD YTLTISSLEP

      8           9           1
0123456789 0123456789 01234
EDFAVYYCQQ WSSRTFGGGT KVEIK
(SEQ ID NO:7)
```

Fig. 35

ES 2 757 675 T3

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYPF TNYFMHWVRQ

4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
APGQRLEWIG RINPYNGATS YSLNFRDKAT LTLDKSASTA

1 1
8 9 0 1
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
YMELSSLRSE DTAVYYCARS TITSPLLDWF GQGLVTVSS
(SEQ ID NO:8)

Fig. 36A

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYPF TNYFMHWVRQ

4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
APGQRLEWIG RINPYNGATS YSLNFRDKAT ITLTKSASTA

1 1
8 9 0 1
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
YMELSSLRSE DTAVYYCARS TITSPLLDWF GQGLVTVSS
(SEQ ID NO:9)

Fig. 36B

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
EIVLTQSPA TSLSPGERA TLSCRASQSV GTSIHWYQQK

4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGQAPRLLIK FASESISGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLLE

1
8 9 0
0123456789 0123456789 01234567
PEDFAVYYCQ QSNKWPFTFG QGTKLEIK
(SEQ ID NO:10)

Fig. 37

ES 2 757 675 T3

1 atg gat ttt caa gtt cag ata ttc tcc ttt ctt ctc att agc gcc
 M D F Q V Q I F S F L L I S A
 46 agt gtg att atg tca aga ggg gag att gtc ctg aca cag agt ccc
 S V I M S R G E I V L T Q S P
 91 gcc aca ctt agc ctg tcc ccc gga gag cgt gct aca ctc tct tgt
 A T L S L S P G E R A T L S C
 136 cgc gct tcc agc tct gtc aac tac atg aac tgg tat cag cag aaa
 R A S S S V N Y M N W Y Q Q K
 181 ccc ggt cag gcc cct aga ccc cgg atc tat gcc aca tct aat ctt
 P G Q A P R P R I Y A T S N L
 226 gcc tcc gga gtg cct gcc cga ttc agc ggg agc gga agt ggt acc
 A S G V P A R F S G S G S G T
 271 gat tac acc ctc aca atc tct agc ttg gaa cca gag gac ttt gca
 D Y T L T I S S L E P E D F A
 316 gtc tat tac tgc caa cag tgg tct agt cgc act ttc ggt ggt ggc
 V Y Y C Q Q W S S R T F G G G
 361 acc aaa ttg gag atc aag agg act gtc gct gcc cca agt gtg ttc
 T K L E I K R T V A A P S V F
 406 atc ttt cct cca tcc gat gag cag ctg aag agt gga acc gca tcc
 I F P P S D E Q L K S G T A S
 451 gtg gtt tgc ctg ctg aac aac ttt tac cct cgg gaa gct aaa gtg
 V V C L L N N F Y P R E A K V
 496 cag tgg aag gtg gac aat gca ctg cag tcc ggc aat agc cag gag
 Q W K V D N A L Q S G N S Q E
 541 tca gta acc gaa caa gat tcc aag gac tcc acc tac tct ctc tca
 S V T E Q D S K D S T Y S L S
 586 tct acc ttg acc ctg tca aag gcc gac tat gaa aaa cac aag gtt
 S T L T L S K A D Y E K H K V
 631 tac gca tgt gag gta act cat caa ggg ctt agc tct cca gtc act
 Y A C E V T H Q G L S S P V T
 676 aag agc ttt aac agg ggc gaa tgc tag (SEQ ID NO:17)
 K S F N R G E C (SEQ ID NO:16)

Fig. 38A

ES 2 757 675 T3

1 atg gaa tgg tcc ggc gtg ttc atc ttt ttg ctg tca gtc acc gct
 M E W S G V F I F L L S V T A
 46 ggc gtg cac tct caa gtc cag ctt gtt cag agc gga gca gaa gtg
 G V H S Q V Q L V Q S G A E V
 91 aag aag cca ggg gcc agc gtc aag gtt tct tgt aaa gcc agt ggt
 K K P G A S V K V S C K A S G
 136 tat acc ttt act gat tac aac atg gat tgg gta cgt cag gca ccc
 Y T F T D Y N M D W V R Q A P
 181 gga caa cgg ctg gag tgg att ggc gac atc aat ccc aaa tac gac
 G Q R L E W I G D I N P K Y D
 226 att atc ggc cat aac cct aag ttt atg gga aag gct acc att aca
 I I G H N P K F M G K A T I T
 271 gta gat aag tct gct tcc acc gct tac atg gag ctc tcc tct ctg
 V D K S A S T A Y M E L S S L
 316 cgc agt gag gat acc gca gtg tac tat tgc gcc agg agt gac cga
 R S E D T A V Y Y C A R S D R
 361 ggc tgg tat ttc gac gtt tgg ggg cag ggt aca ttg gtg act gtg
 G W Y F D V W G Q G T L V T V
 406 tca agc gcc agc aca aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc
 S S A S T K G P S V F P L A P
 451 tct agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg
 S S K S T S G G T A A L G C L
 496 gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca
 V K D Y F P E P V T V S W N S
 541 ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag
 G A L T S G V H T F P A V L Q
 586 tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc
 S S G L Y S L S S V V T V P S
 631 agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag
 S S L G T Q T Y I C N V N H K
 676 ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt
 P S N T K V D K R V E P K S C

Fig. 38B

721 gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg
D K T H T C P P C P A P E L L

766 ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc
G G P S V F L F P P K P K D T

811 ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac
L M I S R T P E V T C V V V D

856 gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac
V S H E D P E V K F N W Y V D

901 ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag
G V E V H N A K T K P R E E Q

946 tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac
Y N S T Y R V V S V L T V L H

991 cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac
Q D W L N G K E Y K C K V S N

1036 aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa
K A L P A P I E K T I S K A K

1081 ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg
G Q P R E P Q V Y T L P P S R

1126 gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa
E E M T K N Q V S L T C L V K

1171 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg
G F Y P S D I A V E W E S N G

1216 cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc
Q P E N N Y K T T P P V L D S

1261 gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc
D G S F F L Y S K L T V D K S

1306 agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag
R W Q Q G N V F S C S V M H E

1351 gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg
A L H N H Y T Q K S L S L S P

1396 ggt aaa tga (SEQ ID NO:15)
G K (SEQ ID NO:14)

Fig. 38B continuación

ES 2 757 675 T3

1 atg gaa tct cag act caa gtg ttt gtg tac atg ttg ctg tgg ctg
 M E S Q T Q V F V Y M L L W L
 46 agc ggc gtt gac ggt gac att cag atg acc caa agc ccc tca agt
 S G V D G D I Q M T Q S P S S
 91 ctt tct gct agc gtg ggg gac agg gtg acc ata aca tgc aaa gcc
 L S A S V G D R V T I T C K A
 136 agc caa aat gtg ggg act aac gtt gcc tgg tat cag cag aaa cca
 S Q N V G T N V A W Y Q Q K P
 181 ggt aaa gca ccc aag gct ctg atc tac agt gca agt tat cga tac
 G K A P K A L I Y S A S Y R Y
 226 tcc ggc gtg tcc tct cgg ttt tct ggc tct ggg agc gga acc gat
 S G V S S R F S G S G S G T D
 271 ttc act ctg acc att agt tca ctc caa cca gaa gat ttc gca gtc
 F T L T I S S L Q P E D F A V
 316 tac tat tgt cag cag tac tat agt tac cca tat aca ttt gga cag
 Y Y C Q Q Y Y S Y P Y T F G Q
 361 ggc acc aag ctg gaa atc aag aga acc gtt gcc gct cct tca gta
 G T K L E I K R T V A A P S V
 406 ttc atc ttc cct ccc tcc gat gag cag ttg aag tcc ggc aca gca
 F I F P P S D E Q L K S G T A
 451 agc gtc gta tgc ctt ttg aac aat ttc tat cca cgc gag gcc aaa
 S V V C L L N N F Y P R E A K
 496 gtg caa tgg aag gtc gac aac gct ctg cag tca ggc aac tcc caa
 V Q W K V D N A L Q S G N S Q
 541 gag tca gtc aca gag cag gac agc aaa gat tcc act tat tct ctc
 E S V T E Q D S K D S T Y S L
 586 tct tct aca ctc act ctg agc aag gcc gac tat gag aag cat aag
 S S T L T L S K A D Y E K H K
 631 gtt tac gcc tgc gaa gtg acc cac cag gga ttg agt tcc cct gtc
 V Y A C E V T H Q G L S S P V
 676 act aag tcc ttt aac cgt ggg gag tgt tag (SEQ ID NO:21)
 T K S F N R G E C (SEQ ID NO:20)

Fig. 39A

1 atg gag tgg tcc gga gtg ttc atc ttt ctg ctc tct gtt acc gct
 M E W S G V F I F L L S V T A
 46 ggc gta cat agc caa gtc cag ctt gtc cag tct ggc gcc gag gtc
 G V H S Q V Q L V Q S G A E V
 91 aag aaa cca ggg gcc agc gtg aaa gtt agt tgt aag gca tcc ggc
 K K P G A S V K V S C K A S G
 136 tat acc ttc aac gat cac aat atc cac tgg gta cga cag gct cca
 Y T F N D H N I H W V R Q A P
 181 ggc caa ggg ctg gaa tgg att ggt tac ata tac cct tac att gga
 G Q G L E W I G Y I Y P Y I G
 226 aca aca gtg tat aac cag aag ttc aaa tcc aag gca act ctt act
 T T V Y N Q K F K S K A T L T
 271 gtg gat aca tca acc tca act gcc tac atg gaa ttg aga tcc ctg
 V D T S T S T A Y M E L R S L
 316 agg agt gac gac act gct gtc tat tac tgc agt cgg tgg gga cat
 R S D D T A V Y Y C S R W G H
 361 cgc ggc ttt cct tat tgg ggt cag ggg aca ctc gtt act gtg agc
 R G F P Y W G Q G T L V T V S
 406 tct gcc agt acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tct
 S A S T K G P S V F P L A P S
 451 agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc
 S K S T S G G T A A L G C L V
 496 aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc
 K D Y F P E P V T V S W N S G
 541 gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc
 A L T S G V H T F P A V L Q S
 586 tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc
 S G L Y S L S S V V T V P S S
 631 agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc
 S L G T Q T Y I C N V N H K P
 676 agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg cca gca cag
 S N T K V D K R V G E R P A Q
 721 gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc tgc ctg
 G G R V S A G S Q A Q R S C L

Fig. 39B

766 gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa ggc agg
D A S R L C S P S P G Q Q G R

811 ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc act cat
P R L P L H P E A S A R P T H

856 gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag
A Q G E G L L A F S P G S G Q

901 gca cag gct agg tgc ccc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac
A Q A R C P E P K S C D K T H

946 aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca
T C P P C P A P E L L G G P S

991 gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc
V F L F P P K P K D T L M I S

1036 cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa
R T P E V T C V V V D V S H E

1081 gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
D P E V K F N W Y V D G V E V

1126 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg
H N A K T K P R E E Q Y N S T

1171 tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg
Y R V V S V L T V L H Q D W L

1216 aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca
N G K E Y K C K V S N K A L P

1261 gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga
A P I E K T I S K A K G Q P R

1306 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc
E P Q V Y T L P P S R E E M T

1351 aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc
K N Q V S L T C L V K G F Y P

1396 agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac
S D I A V E W E S N G Q P E N

1441 aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc
N Y K T T P P V L D S D G S F

1486 ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag
F L Y S K L T V D K S R W Q Q

1531 ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac
G N V F S C S V M H E A L H N

1576 cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga
H Y T Q K S L S L S P G K

(aa: SEQ ID NO:18)

(na: SEQ ID NO:19)

Fig. 39B continuación

```

1  atg tcc gtt cct act caa gtg ctg gga ctg ctt ctt ctg tgg ctc
   M  S  V  P  T  Q  V  L  G  L  L  L  L  W  L
46 act gac gca agg tgt gag atc gtg ctg acc cag agt cca gcc aca
   T  D  A  R  C  E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T
91  ctc agc ttg tca ccc ggg gaa cgg gct aca ctg tcc tgt cgt gca
   L  S  L  S  P  G  E  R  A  T  L  S  C  R  A
136 tca cag agc gtg ggt aca tca att cac tgg tat cag cag aag ccc
   S  Q  S  V  G  T  S  I  H  W  Y  Q  Q  K  P
181 ggt cag gct ccc aga ctc ctg ata aag ttt gcc tcc gaa tcc att
   G  Q  A  P  R  L  L  I  K  F  A  S  E  S  I
226 tct ggc att cca gcc cgc ttc tcc ggc tcc ggc agt gga act gat
   S  G  I  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D
271 ttc acc ctc acc att agt tct ttg gag cct gaa gat ttt gca gta
   F  T  L  T  I  S  S  L  E  P  E  D  F  A  V
316 tac tac tgt caa cag tct aac aag tgg cct ttt act ttt ggg cag
   Y  Y  C  Q  Q  S  N  K  W  P  F  T  F  G  Q
361 gga act aaa ctg gag atc aag cgc act gtc gct gct cca agc gta
   G  T  K  L  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V
406 ttc atc ttt cct ccc tcc gac gag cag ttg aaa tca ggg aca gcc
   F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A
451 tct gtg gtc tgc ctg ctg aac aat ttc tac cca agg gaa gcc aaa
   S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K
496 gtg cag tgg aag gtc gat aat gca ctt caa tca ggt aat tct caa
   V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q
541 gag agt gtg acc gag cag gat tcc aag gac agt acc tac tct ctc
   E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L
586 agc tca acc ctg acc ctt tct aaa gct gac tat gaa aaa cat aaa
   S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K
631 gtc tac gcc tgc gaa gtg aca cac cag ggt ctg agt agc cct gtt
   V  Y  A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V
676 acc aag agc ttt aac cga ggc gag tgc tag      (SEQ ID NO:25)
   T  K  S  F  N  R  G  E  C      (SEQ ID NO:24)

```

Fig. 40A

1 atg gga tgg agc tgg att ttc ttg ttc ctc ctt tcc ggg act gct
 M G W S W I F L F L L S G T A
 46 ggc gga ctg tcc caa gtc cag ttg gtg cag agc ggc gct gag gtt
 G G L S Q V Q L V Q S G A E V
 91 aag aag ccc ggt gcc tct gtc aaa gtt agt tgc aaa gca agt ggc
 K K P G A S V K V S C K A S G
 136 tac cct ttc aca aac tac ttt atg cac tgg gtg cgc cag gcc cct
 Y P F T N Y F M H W V R Q A P
 181 ggg caa aga ctc gaa tgg atc ggt cgt atc aat cca tac aat ggg
 G Q R L E W I G R I N P Y N G
 226 gca act agt tat tct ctc aac ttc agg gat aag gct acc att aca
 A T S Y S L N F R D K A T I T
 271 ctg gac aag tct gcc tct acc gcc tat atg gag ctg agc tcc ctg
 L D K S A S T A Y M E L S S L
 316 cgg agt gaa gat act gct gtc tat tac tgt gca cga tcc acc ata
 R S E D T A V Y Y C A R S T I
 361 acc tct ccc ctg ctg gac ttt tgg ggc cag ggc aca ctt gtg act
 T S P L L D F W G Q G T L V T
 406 gta tca tca gca tcc aca aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca
 V S S A S T K G P S V F P L A
 451 ccc tct agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc
 P S S K S T S G G T A A L G C
 496 ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac
 L V K D Y F P E P V T V S W N
 541 tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta
 S G A L T S G V H T F P A V L
 586 cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc
 Q S S G L Y S L S S V V T V P
 631 tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac
 S S S L G T Q T Y I C N V N H
 676 aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg cca
 K P S N T K V D K R V G E R P
 721 gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc
 A Q G G R V S A G S Q A Q R S
 766 tgc ctg gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa
 C L D A S R L C S P S P G Q Q
 811 ggc agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc
 G R P R L P L H P E A S A R P

Fig. 40B

856 act cat gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct
T H A Q G E G L L A F S P G S

901 ggg cag gca cag gct agg tgc ccc gag ccc aaa tct tgt gac aaa
G Q A Q A R C P E P K S C D K

946 act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga
T H T C P P C P A P E L L G G

991 ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg
P S V F L F P P K P K D T L M

1036 atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc
I S R T P E V T C V V V D V S

1081 cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg
H E D P E V K F N W Y V D G V

1126 gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac
E V H N A K T K P R E E Q Y N

1171 agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac
S T Y R V V S V L T V L H Q D

1216 tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc
W L N G K E Y K C K V S N K A

1261 ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag
L P A P I E K T I S K A K G Q

1306 ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag
P R E P Q V Y T L P P S R E E

1351 atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc
M T K N Q V S L T C L V K G F

1396 tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg
Y P S D I A V E W E S N G Q P

1441 gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc
E N N Y K T T P P V L D S D G

1486 tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg
S F F L Y S K L T V D K S R W

1531 cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg
Q Q G N V F S C S V M H E A L

1576 cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa
H N H Y T Q K S L S L S P G K

1621 tga

(aa; SEQ ID NO:22)
(na; SEQ ID NO:23)

Fig. 40B continuación

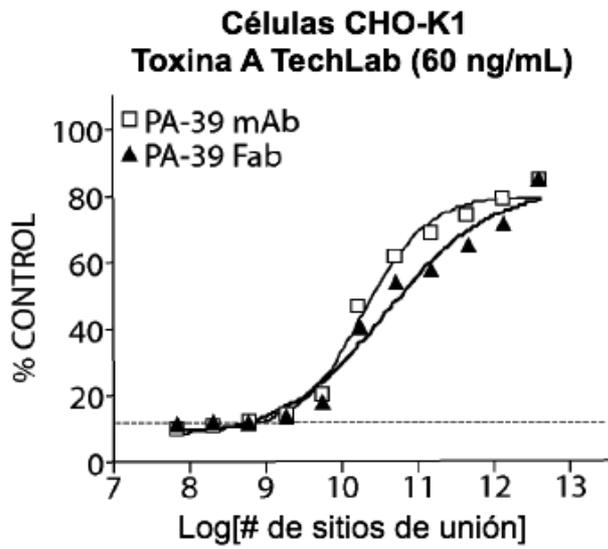


Fig. 41A

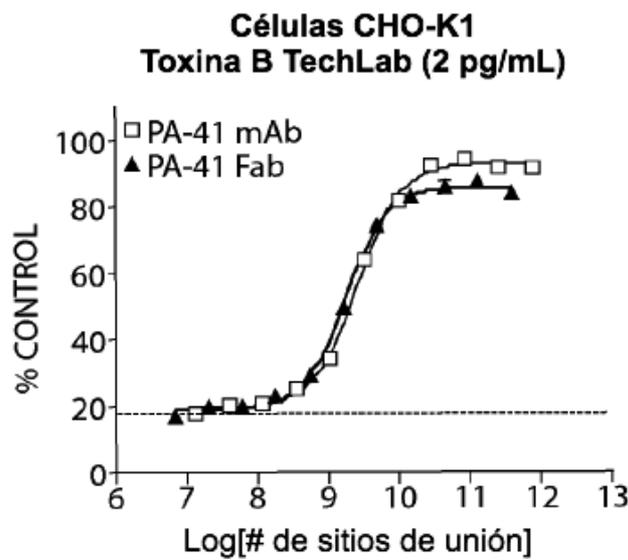


Fig. 41B

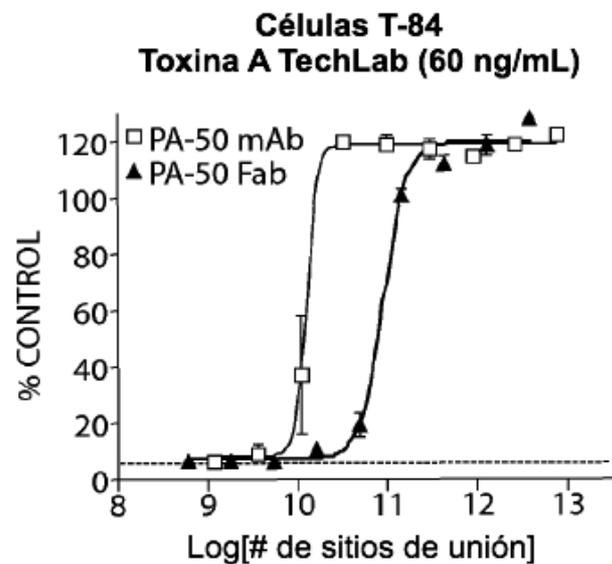


Fig. 41C

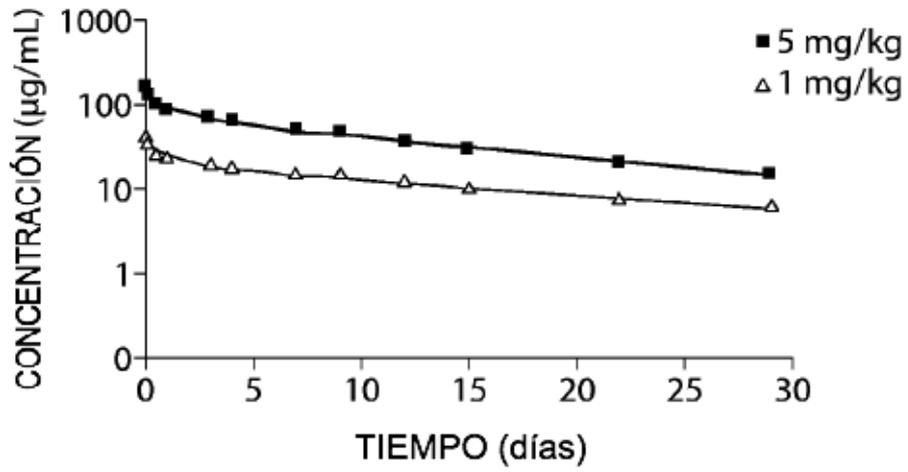


Fig. 42A

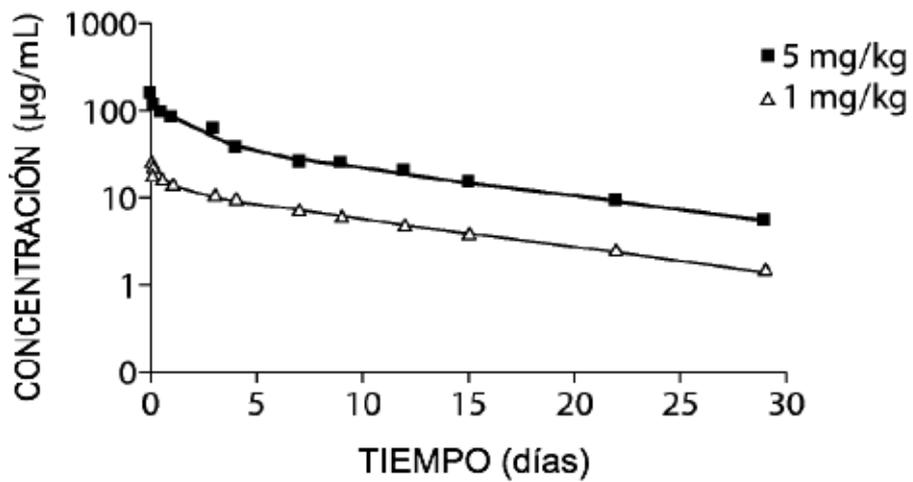


Fig. 42B