

No. 14-082286- -00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:44:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO
ANTICUERPOS CAPACES DE NEUTRALIZAR LAS PRINCIPALES
EXOTOXINAS TCDA Y TCDB DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE UCB PHARMA, S.A

DOMICILIO BRUSELAS, BÉLGICA

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 DE USAQUÉN

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

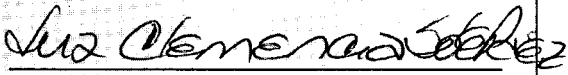


No. 14-082286- -00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:44:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/GB2012/052222	Fecha 2012/09/10
Publicación Internacional No.		WO 2013/038156 A1	Fecha 2013/03/21
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
ANTICUERPOS CAPACES DE NEUTRALIZAR LAS PRINCIPALES EXOTOXINAS TCDA Y TCDB DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 039/040, A61P 031/004, C07K 016/012			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
UCB PHARMA, S.A			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		60 Allée de la Recherche, B-1070	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Bruselas, Bélgica.	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Bruselas	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
PAÍS DE RESIDENCIA		Bélgica.	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Bélgica.
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. HUMPHREYS		David Paul	Británico
2. LIGHTWOOD		Daniel John	Británico
3. TYSON		Kerry Louise	Británico
4. KNIGHT		David Edward Ormonde	Británico
5. HERVÉ		Karine Jeannine Madeleine	Francesa
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Reino Unido		Berkshire	c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido
2. Reino Unido		Berkshire	c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido
3. Reino Unido		Berkshire	c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido
4. Reino Unido		Berkshire	c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido
5. Reino Unido		Berkshire	c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido

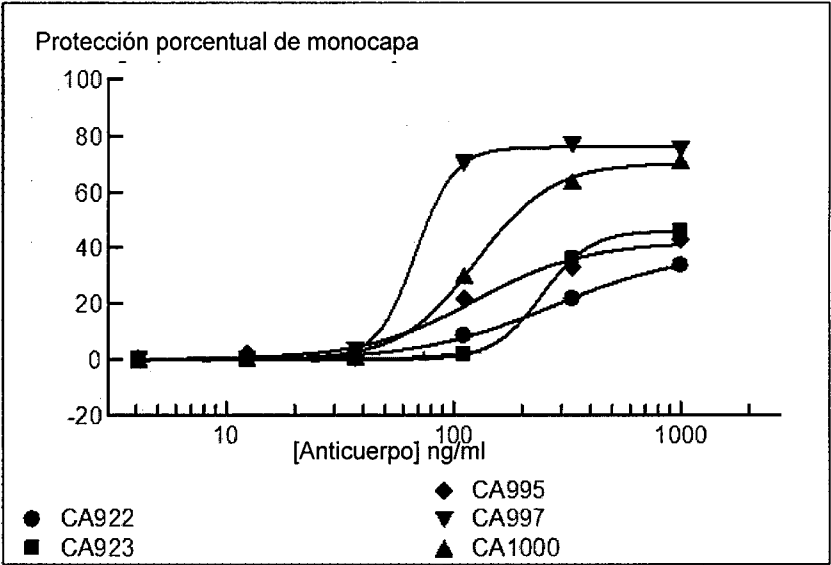
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. U.S.A.		US	61/535,532 2011/09/16
2. U.S.A		US	61/638,731 2012/04/26
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 14-0039758 Nº 14-0039737	Fecha 2014/04/11 Fecha 2014/04/11
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma 	
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555	

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 85 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 41 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 69 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de UCB PHARMA S.A. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria(seis (6) inventores) ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$515.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 31 reivindicaciones adicionales a 10 por \$961.000.

FIGURA CARACTERISTICA

Figura 62A

Análisis TEER Caco-2 - TcdA





HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN		
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. COMPSON 7. PAGE 8. PAYNE 9. FISHER 10. MACKENZIE 11. COX		Joanne Elizabeth Matthew Jon Timothy Andrew Charles Nicola Louise Brendon Matthew	Británica Británico Británico Británico Británico Británico	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido		Berkshire		Reino Unido
7. c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido		Berkshire		Reino Unido
8. c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido		Berkshire		Reino Unido
9. c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido		Berkshire		Reino Unido
10. c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido		Berkshire		Reino Unido
11. c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido		Berkshire		Reino Unido
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

PI02-F06 vr4 (2012-04-19)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2013/038156 A1

(43) International Publication Date
21 March 2013 (21.03.2013)

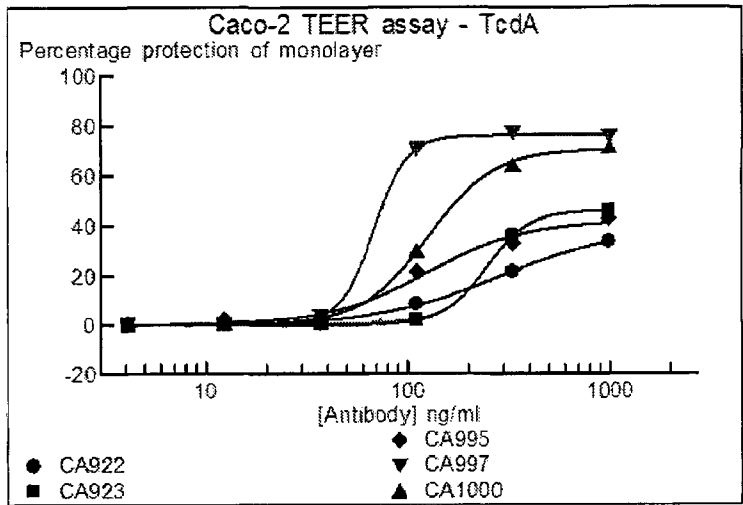
- (51) International Patent Classification:
C07K 16/12 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/GB2012/052222
- (22) International Filing Date:
10 September 2012 (10.09.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/535,532 16 September 2011 (16.09.2011) US
61/638,731 26 April 2012 (26.04.2012) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UCB PHARMA S.A. [BE/BE]; 60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels (BE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): HUMPHREYS, David Paul [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). LIGHTWOOD, Daniel John [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). TYSON, Kerry Louise [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). KNIGHT, David Edward Ormonde [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208

- Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). HERVÉ, Karine Jeannine Madeleine [FR/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). COMPSON, Joanne Elizabeth [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). PAGE, Matthew Jon Timothy [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). PAYNE, Andrew Charles [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). FISHER, Nicola Louise [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). MACKENZIE, Brendon [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB). COX, Matthew [GB/GB]; c/o IPD, UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB).
- (74) Agent: THOMPSON, John; UCB Celltech, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE (GB).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,

[Continued on next page]

(54) Title: NEUTRALISING ANTIBODIES TO THE MAJOR EXOTOXINS TCDA AND TCDB OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Figure 62A



(57) Abstract: This present invention describes the derivation and selection of antibodies capable of neutralising the major exotoxins; TcdA and TcdB of Clostridium difficile. The invention also describes novel neutralisation and antigen binding properties of individual Mabs and mixtures thereof.

**Anticuerpos capaces de neutralizar las principales exotoxinas TcdA y TcdB
de *Clostridium difficile***

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

Las dos principales exotoxinas TcdA y TcdB se han establecido como los principales determinantes de patogenicidad de *Clostridium difficile* en un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo*. Cepas no toxígenas son no patógenas a los animales y al hombre (1, 2). A la fecha, todavía no se ha establecido un entendimiento claro del papel de una toxina binaria (3).

Las dos toxinas son entero- y citotóxicas, pero el balance de evidencia sugiere que TcdA es una enterotoxina más poderosa que TcdB, mientras se observa que TcdB es típicamente ~1000x más citotóxica que TcdA (4). Aunque las dos toxinas son capaces de inducir una respuesta inflamatoria, TcdA contribuye aparentemente a la migración de la TcdB más inflamatoria a mayor profundidad en la mucosa intestinal (5).

In toto, una gran colección de datos generados durante más de 30 años respaldan un modelo en el que probablemente ambas toxinas son importantes en el proceso de la enfermedad humana. Es probable que TcdA inicie un daño temprano (es decir, antes de TcdB) y rápido (es decir, 1-3 horas) del intestino a través de la pérdida de uniones intercelulares herméticas (*tight junctions*) y la destrucción de las puntas vellosas y, por consiguiente, diarrea, probablemente a través de la pérdida de fluido inducida por albúmina. Este daño a la integridad del revestimiento intestinal le permite a TcdB ejercer su potencia molar superior (normalmente se cita que TcdB es 1000x más citotóxica que TcdA) más rápida y efectivamente (es decir, dianas celulares alternativas, más profundas en el tejido y dañando órganos a los que accede sistémicamente). Cualquiera de las dos toxinas puede ser efectiva sola *in vitro* en células y tejidos humanos o animales. Cualquiera de las dos toxinas puede ser efectiva sola *in vivo* en animales, dependiendo de otros factores desencadenantes tales como daño mecánico, sobrecarga de barrera y sensibilidades específicas del hospedero. Actualmente es claro que en hámsteres por lo menos una cualquiera de TcdA o TcdB sola transmitida por una infección intestinal por *Clostridium difficile* puede causar la muerte (1). Está bien establecido que las cepas A-B+ son capaces de ocasionar síntomas y muerte en humanos (6,7). No obstante, la mayoría (~95%) de las cepas clínicas son A+B+; en consecuencia, los fármacos dirigidos a tratar las infecciones por *Clostridium difficile* (CDI – *Clostridium difficile*

infections) tienen que ser capaces de neutralizar las actividades de ambas toxinas y eliminarlas efectivamente.

Muy comúnmente la CDI es una infección intrahospitalaria de pacientes mayores o aquellos con co-morbilidades complicadas. Sin embargo, se ha observado un aumento en las infecciones adquiridas en comunidad. La infección está casi siempre asociada con el uso de antibióticos de amplio espectro o es inducida por los mismos. Se calcula que los gastos asociados con la asistencia médica superan \$1 billón anual tan solo en los Estados Unidos. Estos gastos se deben principalmente a pacientes que tienen estadías hospitalarias más prolongadas. Las terapias actuales conllevan el uso de antibióticos tales como clindamicina, vancomicina o fidaxomicina que eliminan las células de *Clostridium difficile* en el intestino. Las terapias actuales abordan la infección bacteriana pero no se ocupan o evitan directamente la significativa patogénesis causada por TcdA y TcdB, las cuales son los principales contribuyentes a los síntomas y mortalidad de la CDI.

Los síntomas de la CDI en humanos incluyen diarrea moderada a intensa, colitis pseudomembranosa (PMC – *pseudomembranous colitis*) y colitis fulminante o el denominado megacolon tóxico. La muerte se produce en 5-15% de los pacientes que reciben la mejor atención actual. Por consiguiente, en la actualidad no existe una terapia específica disponible a los pacientes para evitar el daño y la lesión causados por toxinas de *C. difficile* luego de la infección.

Suscitar una respuesta de un anticuerpo mediante la vacunación y la administración parenteral de anticuerpos policlonales y monoclonales ha demostrado ser capaz de proteger animales de los síntomas de diarrea y muerte (8-15). Estudios anteriores en hámsteres sugirieron que los anticuerpos contra la TcdA sola constituían todo lo que era necesario para la protección. No obstante, el uso de cepas inactivadas funcionalmente de TcdA o TcdB demuestra que cualquiera de las dos toxinas es capaz de causar la enfermedad en hámsteres, pero que las dos toxinas juntas son más efectivas (1).

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos monoclonales (Mabs) pueden brindar eficacia, seguridad, ventajas de fabricación y ventajas regulatorias sobre los anticuerpos policlonales derivados del suero, o sueros hiper-inmunes derivados del suero. Por estas razones, usualmente los Mabs son la opción preferida para productos terapéuticos.

Ha habido un número de intentos para generar Mabs protectores contra TcdA y TcdB. Los más avanzados de estos en la clínica es una mezcla de 2 Mabs IgG1, uno contra cada TcdA y TcdB, originalmente llamados CDA1 y MDX1388, desarrollados por MBL y Medarex. Se demostró que no eran capaces de proteger completamente a hámsteres en modelos de infecciones agudas o recurrentes (15). Esta combinación de Mab se está desarrollando en la actualidad como MK3415A por Merck Inc. En un estudio de fase II

humano, MK3415A tuvo como resultado una reducción estadísticamente significativa en la recurrencia de la enfermedad ($p = 0,006$) (véase asimismo Lowy *et al.*, NEJM (2010) 362: 197-205), pero no afectó la duración / intensidad de la diarrea o los índices de mortalidad (16). Esto puede significar que estos anticuerpos pueden ser únicamente útiles para prevenir la recurrencia de la infección. La recurrencia de la infección se produce en aproximadamente el 25% de los pacientes. En consecuencia, es probable que haya una población significativa de pacientes en la cual estos anticuerpos no son efectivos.

Con el fin de poder tener una influencia positiva sobre la diarrea (por ejemplo como resultado de daño agudo a las uniones intercelulares herméticas del intestino debido a TcdA) y la muerte (por ejemplo resultante de un estado nutricional deficiente prolongado, estrés por deshidratación e iniciación de una cascada inflamatoria, daño anatómico extendido al revestimiento intestinal y posiblemente daño a órganos distantes, debido a la toxina sistémica TcdB más que a TcdA), se necesitan Mabs con afinidad superior, neutralización de las toxinas, prevención superior de la pérdida de la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER – *trans-epithelial electrical resistance*), decoración de antígenos y eliminación inmunitaria del antígeno.

Resumen de la Presente Invención

La presente invención proporciona Mab(s) con un nivel muy alto de potencia *in vitro* e *in vivo*, los cuales poseen el potencial de tener un impacto sobre la duración e intensidad de la diarrea y el índice de mortalidad en humanos que sufren de infección por *Clostridium difficile*.

En una modalidad se provee un anticuerpo monoclonal específico del antígeno TcdA o TcdB, en donde el anticuerpo tiene una alta afinidad para el antígeno diana y es apropiado para reducir la duración y/o intensidad de la diarrea y la morbilidad en un paciente con infección por *Clostridium difficile* o en riesgo de la citada infección.

En una modalidad se provee un Mab específico de TcdA o TcdB, o una población de por lo menos dos Mabs, siendo al menos uno de los cuales específico de TcdA y al menos uno de los cuales específico de TcdB, en donde la EC_{50} del anticuerpo, o cada uno de ellos, o la combinación de los anticuerpos es 200ng/ml o menos, por ejemplo 150ng/ml o menos, tal como 100ng/ml.

Los anticuerpos de la presente divulgación son útiles porque son capaces de ofrecer un medio para tratar la intensidad y duración de los síntomas de una infección primaria tal como la diarrea en un paciente, o prevenir la muerte y no solo evitar la reoccurrencia de los síntomas de la enfermedad.

En por lo menos algunas modalidades, los anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación no muestran reducción en la potencia en la presencia de altas concentraciones de toxina.

Descripción Detallada de la Presente Invención

Específico, tal como se emplea aquí, tiene como finalidad referirse a un anticuerpo que únicamente reconoce el antígeno del cual es específico, o un anticuerpo que tiene una afinidad de unión significativamente más alta al antígeno del cual es específico, comparada con la unión antígenos de los cuales no es específico, por ejemplo una afinidad de unión de 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces más alta.

La afinidad de unión puede medirse por análisis estándar tales como resonancia de plasmón superficial, tal como BIAcore.

En una modalidad la EC₅₀ es menor que 75, 70, 60, 65, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5 ng/ml de infección por *Clostridium difficile* en análisis de cultivo celular y el paciente. Esta es significativamente menor (más potente) que anticuerpos conocidos, y se cree que es un factor importante en cuanto a por qué los anticuerpos de la presente divulgación tienen un impacto significativo y positivo en la supervivencia de sujetos que reciben tratamiento.

Tal como se emplea aquí, potencia es la capacidad del anticuerpo de provocar una respuesta biológica apropiada, por ejemplo la neutralización de los efectos perjudiciales de la toxina, con una dosis o concentración dada. Ejemplos de potencia incluyen la neutralización máxima porcentual de la actividad de la toxina (magnitud de la protección), la concentración relativa mínima de Mab a antígeno (v.g., EC₅₀), la velocidad y la durabilidad de la actividad de neutralización.

En análisis de cultivo celular, la neutralización podría observarse como una o más de las siguientes: prevención de la unión de toxina a células, inmunoprecipitación de toxina de la solución, prevención de la pérdida de la forma y configuración celular, prevención de la pérdida de estructuras citoesqueléticas, prevención de la pérdida de uniones intercelulares herméticas de la monocapa celular y resistencia eléctrica trans-epitelial, prevención de muerte celular, apoptosis y producción de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF α , IL-1 β , IL-6 y MIP1 α .

En estudios de sección y explante tisular la neutralización puede observarse, por ejemplo, como la prevención de necrosis y/o acumulación de fluidos edematosos.

En análisis *in vivo* puede observarse la neutralización como una o más de las siguientes: prevención de la acumulación de fluidos en asas ileales ligadas y prevención de la necrosis de tejido intestinal, diarrea, formación de pseudomembrana de muerte de animales.

Por consiguiente, en una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

QASQ ¹ SISNALA	SEQ ID NO: 1
SASSLAS	SEQ ID NO: 2
QYTHYSHTSKNP	SEQ ID NO: 3
GFTISSYYMS	SEQ ID NO: 4
IISSGGHFTWYANWAKG	SEQ ID NO: 5
AYVSGSSFN ² GYAL	SEQ ID NO: 6

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

En una modalidad las secuencias 4 a 6 están en una cadena pesada del anticuerpo.

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

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

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

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

DPVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQ¹SISNALAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLASGVPSRFK
GSGSGTEFTLTIS²SLQPD³DFATYYCQYTHYSHTSKNPFGGGTKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas, y el constructo se denomina aquí como 922.g1 VK (gL1).

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 7 se muestra en Figura 1 y SEQ ID NO: 8 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS⁴CAASGFTISSYYMSWVRQAPGKGLEWIGI⁵IISSGGHFTWYANW
AKGRFTISSDSTTVYLQMNSLRDEDTATYFCARAYVSGSSFN⁶GYALWGQGT⁷LVTVS

en donde las CDRs están subrayadas y el constructo se denomina aquí como 922.g1 VH (gH1)

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 9 se muestra en Figura 1 y SEQ ID NO: 10 allí.

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

Por consiguiente, en una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

QASQISISNYLA	SEQ ID NO: 11
SASTLAS	SEQ ID NO: 12
QYSHYGTGVFGA	SEQ ID NO: 13
AFSLSNYYS	SEQ ID NO: 14
IISSGSNALKWYASWPKG	SEQ ID NO: 15
NYVGSGSYGMDL	SEQ ID NO: 16

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

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

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

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

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

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

DVVMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQISISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYSASTLASGVPSRFK
GSGSGTQFTLTISLQPEDVATYYCQYSHYGTGVFGAFGGGTKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas y el constructo se denomina aquí como CA923.g1 gL1

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 17 se muestra en Figura 1 y SEQ ID NO: 18 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASAFSLSNYYSWVRQAPGKGLEWIGIISSGSNALKWYAS
WPKGRFTISKDSTTVYLQMNSLRAEDTATYFCARNYVGSGSYGMDLWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas y el constructo se denomina aquí como CA923.g1 gH1

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 19 se muestra en Figura 2 y SEQ ID NO: 20 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO 17: y SEQ ID NO: 19.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

- QASQSISSYFS SEQ ID NO: 21
- GASTLAS SEQ ID NO: 22
- QCTDYSGIYFGG SEQ ID NO: 23
- GFSLSYYMS SEQ ID NO: 24
- IISGSSSTFTWYASWAKG SEQ ID NO: 25
- AYVGSSSYGFDP SEQ ID NO: 26

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

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

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

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

En una modalidad SEQ ID NO: 21 es CDR L1, SEQ ID NO: 22 es CDR L2, SEQ ID NO; 23 es CDR L3, SEQ ID NO: 24 es CDR H1, SEQ ID NO: 25 es CDR H2 y SEQ ID NO; 26 es CDR H3.

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

DVVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSYFSWYQQKPGKAPQLLIYGASTLASGVPSRFK
GSGSGTELTLTISLQPD^{DF}FATYYCQCTDYSGIYFGGFGGGTKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas y el constructo se denomina aquí como CA993.g1 gL1

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 27 se muestra en Figura 2 y SEQ ID NO: 28 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC^{AS}GFSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWIGIISGSSSTFTWYA
SWAKGRFTISKTSTTVYLQMNSLKTEDTATYFCARAYVGSSSYGFDPWGQGT^{LV}TVS

en donde las CDRs están subrayadas y el constructo se denomina aquí como CA993.g1 gH1

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 29 se muestra en Figura 2 y SEQ ID NO: 30 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 29.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

En una modalidad las secuencias 31 a 33 están en una cadena ligera del anticuerpo.

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

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

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

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

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

DVVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSINNYFSWYQQKPGKAPKLLIYGAANLASGVPSRFK
GSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYSCQNNYGVHIYGAAFGGGTKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 37 se muestra en Figura 3 y SEQ ID NO: 38 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSNYDMIWVRQAPGKLEYIGFINTGGITYYASWA
KGRFTISRDSSTVYLQMNSLRAEDTATYFCARVDDYIGAWGAGLWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 39 se muestra en Figura 3 y SEQ ID NO: 40 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 39.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

En una modalidad las secuencias 41 a 43 están en una cadena ligera del anticuerpo. En una modalidad las secuencias 44 a 46 están en una cadena pesada del anticuerpo.

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

En una modalidad SEQ ID NO: 44 es CDR H1, SEQ ID NO: 45 es CDR H2 y SEQ ID NO: 46 es CDR H3.

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

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

ALVMTQSPSSFSASTGDRVITITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFS
GSGSGTEYTLTISCLQSEDFATYYCLLGVYGYSNDDGIAFGGGTKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 47 se muestra en Figura 3 y SEQ ID NO: 48 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLSSHMCWVRQAPGKLEYIGVIYHFGSTYYANWA
TGRFTISKDSTTVYLQMNSLRAEDTATYFCARASIAGYSAFDPWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 49 se muestra en Figura 4 y SEQ ID NO: 50 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 49.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina A) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

En una modalidad las secuencias 51 a 53 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una modalidad las secuencias 54 a 56 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una modalidad SEQ ID NO: 51 es CDR L1, SEQ ID NO: 52 es CDR L2 y SEQ ID NO: 53 es CDR L3.

En una modalidad SEQ ID NO: 54 es CDR H1, SEQ ID NO: 55 es CDR H2 y SEQ ID NO: 56 es CDR H3.

En una modalidad SEQ ID NO: 51 es CDR L1, SEQ ID NO: 52 es CDR L2, SEQ ID NO: 53 es CDR L3, SEQ ID NO: 54 es CDR H1, SEQ ID NO: 55 es CDR H2 y SEQ ID NO: 56 es CDR H3.

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

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLASGVPSRFK
GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQGNAYTSNSHDNAFGGGKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 57 se muestra en Figura 4 y SEQ ID NO: 58 allí.

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

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCTVSGIDLSSDAVGWVRQAPGKLEYIGIIATFDSTYYASWA
KGRFTISKASSTTVYLQMNSLRAEDTATYFCARTGSWYYISGWGSYYYGMDLWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 59 se muestra en Figura 4 y SEQ ID NO: 60 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 59.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

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

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

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

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

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

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

DTVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTLMHWFQQKPGQAPKLLIYLASNLESGVPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTWNDPWTFGGGTKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 67 se muestra en Figura 5 y SEQ ID NO: 68 allí.

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

EVELLESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYGMAWVRQAPTKGLEWVTSISSSGGSTYYRDS
VKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDTATYYCTTVIRGYVMDAWGQGTLLTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 69 se muestra en Figura 5 y SEQ ID NO: 70 allí.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

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

En una modalidad las secuencias 74 a 76 están en una cadena pesada del anticuerpo.

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

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

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

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

DTQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASGSVSTLMHWYQQKPGKAPKLLIYKASNLASGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCHQSWNSDTFGQGTRLEIK

en donde las CDRs están subrayadas

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 77 se muestra en Figura 5 y SEQ ID NO: 78 allí.

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

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMAVVRQAPGKGLEWVATINYDGRTHYRDS
VKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTSIISRSHYFDCWGQGTLLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 79 se muestra en Figura 5 y SEQ ID NO: 80 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 79.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

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

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

En una modalidad SEQ ID NO: 81 es CDR L1, SEQ ID NO: 82 es CDR L2 y SEQ ID NO: 83 es CDR L3.

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

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

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

DVQLTQSPSFSLASVGDRVITITCKASKSISNHLAWYQEKPGKANKLLIHSGSTLQSGTPSRFS
GSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYDEYPYTFGQGRLEIKRT

en donde las CDRs están subrayadas.

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

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 87 se muestra en Figura 6 y SEQ ID NO: 88 allí. En una modalidad se omiten los codones que codifican los dos últimos aminoácidos (RT).

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

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLQSYTISWVRQPPGKGLEWIAAISGGGSTYYNLPL
KSRVTISRDTSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRPRWYPRSYFDYWGRGTLTVS

en donde las CDRs están subrayadas

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 89 se muestra en Figura 6 y SEQ ID NO: 90 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO 87: y SEQ ID NO: 89.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

RASQRISTSIH	SEQ ID NO: 91
YASQSIG	SEQ ID NO: 92
QOSYSSLYT	SEQ ID NO: 93
GFTFSDSYMA	SEQ ID NO: 94
SISYGGTIIQYGDSVKG	SEQ ID NO: 95
RQGTIARYLDF	SEQ ID NO: 96

En una modalidad las secuencias 91 a 93 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una modalidad las secuencias 94 a 96 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una modalidad SEQ ID NO: 91 es CDR L1, SEQ ID NO: 92 es CDR L2 y SEQ ID NO: 93 es CDR L3.

En una modalidad SEQ ID NO: 94 es CDR H1, SEQ ID NO: 95 es CDR H2 y SEQ ID NO: 96 es CDR H3.

En una modalidad SEQ ID NO: 91 es CDR L1, SEQ ID NO: 92 es CDR L2, SEQ ID NO: 93 es CDR L3, SEQ ID NO: 94 es CDR H1, SEQ ID NO: 95 es CDR H2 y SEQ ID NO: 96 es CDR H3.

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

NIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRISTSIHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSIGIPARFS
GSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQOSYSSLYTFGQGTKLEIK

en donde las CDRs están subrayadas

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 97 se muestra en Figura 6 y SEQ ID NO: 98 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDSYMAWVRQAPGKGLEWIASISYGGTIIQYGD
SVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRQGTIARYLDFWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 99 se muestra en Figura 7 y SEQ ID NO: 100 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO 97: y SEQ ID NO: 99.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

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

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

En una modalidad SEQ ID NO: 101 es CDR L1, SEQ ID NO: 102 es CDR L2 y SEQ ID NO: 103 es CDR L3.

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

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

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

ATQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESVSTLLHWYQQKPGKAPKLLIYKASNLASGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQSWNSPPTFGQGTKLEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 107 se muestra en Figura 7 y SEQ ID NO: 108 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLEWVAIINYDASTTHYRDS
VKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRYGRSHYFDYWGQGTLLTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 109 se muestra en Figura 7 y SEQ ID NO: 110 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 107 y SEQ ID NO: 109.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

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

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

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

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

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

En una modalidad se provee una región variable, tal como una región variable de cadena ligera con la siguiente secuencia (anticuerpo 1114, anticuerpo anti-toxina B de injerto 8; secuencia de región variable de cadena ligera) SEQ ID NO: 117:

DTVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVSTLLHWYQQKPGKAPKLLIYKASNLASGVPSRFS
GSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCHQSWNSPPTFGQGTKLEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 117 se muestra en Figura 8 y SEQ ID NO: 118 allí.

En una modalidad se provee una región variable, tal como una región variable de cadena pesada con la siguiente secuencia (anticuerpo 1114, anticuerpo anti-toxina B de injerto 8; secuencia de región variable de cadena pesada) SEQ ID NO: 119:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKGLEWVAIIINYDASTTHYRDS
VKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRYGRSHYFDYWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 119 se muestra en Figura 8 y SEQ ID NO: 120 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 119.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

KASQNIYMYLN	SEQ ID NO: 121
NTNKLHT	SEQ ID NO: 122
LQHKSFYPT	SEQ ID NO: 123
GFTFRDSFMA	SEQ ID NO: 124
SISYEGDKTYYGDSVKG	SEQ ID NO: 125
LTITTS GDS	SEQ ID NO: 126

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

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

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

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

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

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYMYLNWYQQKPGKAPKRLIYNTNKLHTGVPSRFS
GSGSGTEYTLTISSLPEDFATYYCLQHKSFYPTFGQGTKLEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 127 se muestra en Figura 8 y SEQ ID NO: 128 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDSFMAWVRQAPGKGLEWVASISYEGDKTYYGDS
VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTITTS GDSWGQGTMTVSS

en donde las CDRs están subrayadas.

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

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 129 se muestra en Figura 9 y SEQ ID NO: 130 allí. En una modalidad se omite el codón AGC que codifica el último aminoácido S.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 127 y SEQ ID NO: 129.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

En una modalidad las secuencias 131 a 133 están en una cadena ligera del anticuerpo.

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

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

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

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

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

DTQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQHVGTNVDWYQQKPGKVPKLLIYGASIRYTGVPDRFT
GSGSGTDFLTITISLQPEDVATYYCLQYNYPYTTFGQGTKLEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 137 se muestra en Figura 8 y SEQ ID NO: 138 allí.

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

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFIFSNFGMSWVRQAPGKGLEWVASISPSGGNAYYRDS
VKGRFTISRDNSKTTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCTRRAYSSPFAFWGQGTTLTVSS

en donde las CDRs están subrayadas.

En una modalidad se omite el último aminoácido (S) de SEQ ID NO: 139.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 139 se muestra en Figura 8 y SEQ ID NO: 140 allí. En una modalidad se omite el codón AGC que codifica el último aminoácido S.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 137 y SEQ ID NO: 139.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

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

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

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

En una modalidad SEQ ID NO: 141 es CDR L1, SEQ ID NO: 142 es CDR L2 y SEQ ID NO: 143 es CDR L3.

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

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

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

DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASKSISNHLAWYQEKPGKANKLLIHSGSTLQPGT
PSRFGSGSGGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYDEYPYTFGQGTREIK

SEQ ID NO: 147

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 147 se muestra en Figura 9 y SEQ ID NO: 148 allí.

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

EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLNSYTITWVRQPPGKLEWIAAISGGGSTYFNSAL
KSRVTISRDTSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRPRWYPRSYFDYWGRGTLTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 149 se muestra en Figura 9 y SEQ ID NO: 150 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO 147: y SEQ ID NO: 149.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

KASQNVGNNVA	SEQ ID NO: 151
YASNRFT	SEQ ID NO: 152
QRVYQSTWT	SEQ ID NO: 153
GFSLTSYVH	SEQ ID NO: 154
CIRTGGNTEYQSEFKS	SEQ ID NO: 155
GNYGfAY	SEQ ID NO: 156

En una modalidad las secuencias 151 a 153 están en una cadena ligera del anticuerpo.

En una modalidad las secuencias 154 a 156 están en una cadena pesada del anticuerpo.

En una modalidad SEQ ID NO: 151 es CDR L1, SEQ ID NO: 152 es CDR L2 y SEQ ID NO: 153 es CDR L3.

En una modalidad SEQ ID NO: 154 es CDR H1, SEQ ID NO: 155 es CDR H2 y SEQ ID NO: 156 es CDR H3.

En una modalidad SEQ ID NO: 151 es CDR L1, SEQ ID NO: 152 es CDR L2, SEQ ID NO: 153 es CDR L3, SEQ ID NO: 154 es CDR H1, SEQ ID NO: 155 es CDR H2 y SEQ ID NO: 156 es CDR H3.

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

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNVAWYQHKGKAPKLLIYYASNRFTGVPSRFT
GGGYGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRVYQSTWTFGQGTKVEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 157 se muestra en Figura 9 y SEQ ID NO: 158 allí.

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

EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYYVHWVRQPPGKGLEWMGCIRTGGNTEYQSEF
KSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGFAYWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 159 se muestra en Figura 9 y SEQ ID NO: 160 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 157 y SEQ ID NO: 159.

En una modalidad se provee un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-toxina B) que comprende una CDR, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs, seleccionadas de:

KASQNINKYLD SEQ ID NO: 161

NIQSLHT SEQ ID NO: 162

FQHNSGW SEQ ID NO: 163

GFTFTQAAMF SEQ ID NO: 164

RISTKSNNFATYYPD SVKG SEQ ID NO: 165

PAYYYDGTVPFAY SEQ ID NO: 166

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

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

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

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

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

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINKYLDWYQQKPGKVPKLLIYNIQSLHTGIPSRFS
 GSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCFQHNSGWTFGQGRLEIK

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 167 se muestra en Figura 10 y SEQ ID NO: 168 allí.

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTQAAMFWVRQASGKGLEGIARISTKSNNFATYYP
DSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCTAPAYYYDGTVPFAYWGQGTLVTVS

en donde las CDRs están subrayadas.

La secuencia polinucleotídica que codifica SEQ ID NO: 169 se muestra en Figura 10 y SEQ ID NO: 170 allí.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende regiones variables mostradas en SEQ ID NO: 167 y SEQ ID NO: 169.

En una modalidad se provee anticuerpo que comprende 6 CDRs seleccionadas independientemente de SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 161, 162, 163, 164, 165 y 166.

En una modalidad se provee un anticuerpo anti-TcdA que comprende 6 CDRs seleccionadas independientemente de SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 53, 54, 55 y 56.

En una modalidad se provee un anticuerpo anti-TcdB que comprende 6 CDRs seleccionadas independientemente de SEQ ID NOs 61, 62, 63, 64, 65, 66, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 161, 162, 163, 164, 165 y 166.

En una modalidad se provee un anticuerpo que comprende dos regiones variables seleccionadas independientemente de SEQ ID NOs: 7, 9, 17, 19, 27, 29, 37, 39, 47, 49, 57, 59, 67, 69, 77, 79, 87, 89, 97, 99, 107, 109, 117, 119, 127, 129, 137, 139, 147, 149, 157 y 159.

En una modalidad se provee un anticuerpo que comprende dos regiones variables seleccionadas independientemente de SEQ ID NOs: 7, 9, 17, 19, 27, 29, 37, 39, 47, 49, 57 y 59.

En una modalidad se provee un anticuerpo que comprende dos regiones variables seleccionadas independientemente de SEQ ID NOs: 67, 69, 77, 79, 87, 89, 97, 99, 107, 109, 117, 119, 127, 129, 137, 139, 147, 149, 157 y 159.

En una modalidad los anticuerpos de acuerdo con la invención son humanizados.

En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos se dirigen a la porción de "unión celular" C terminal de la toxina TcdA y/o TcdB.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención es apropiado para neutralizar la toxina A o la toxina B.

Neutralizar, tal como se emplea aquí, tiene como finalidad referirse a la eliminación o reducción de efectos nocivos/perjudiciales de la toxina diana, por ejemplo por lo menos una reducción del 50% en el efecto nocivo relevante.

Los inventores han establecido, usando comparaciones internas entre anticuerpos descubiertos en esta solicitud y por comparación con anticuerpos bien descritos en el arte (Babcock et al., 2006; Lowy et al., 2010), que algunos anticuerpos tienen la característica deseable de mantener una neutralización efectiva (por ejemplo, una EC_{50} baja y una protección % alta) incluso con concentraciones de toxina elevadas. Otros anticuerpos, incluyendo aquellos descritos en el arte, no mantienen una neutralización efectiva de la toxina con concentraciones de toxina elevadas.

Concentraciones de toxina efectivas pueden definirse como una 'dosis letal' (LD - *lethal dose*) en estudios de valoración cuantitativa en la ausencia de anticuerpos neutralizantes. Los análisis de neutralización se conducen típicamente con una LD de 50% de eliminación celular completa (*es decir*, una LD_{50}), pero pueden conducirse más rigurosamente con una LD_{80} .

Igualmente pueden realizarse análisis bajo condiciones considerablemente más desafiantes tales como LD_{90} , LD_{95} y/o LD_{max} (LD_{max} es la cantidad de toxina máxima que puede incluirse en un análisis, limitada por el volumen del análisis y la concentración / solubilidad de toxina máxima). Tales análisis apuntan a imitar las etapas tempranas de la infección de humanos cuando el crecimiento de *C. difficile* en el intestino es alarmante y la diarrea y otros síntomas lo llevan a uno a plantear la hipótesis de que las concentraciones de toxina están en su nivel máximo. Los presentes inventores creen que los anticuerpos que efectivamente neutralizan las actividades perjudiciales de la toxina bajo condiciones de concentración de toxina elevada tienen un valor clínico especial para el control de síntomas en infecciones humanas. En una modalidad, el anticuerpo o anticuerpos de la presente divulgación tienen por ejemplo valores EC_{50} útiles, por ejemplo, bajos y/o protección % elevada de muerte celular para una o más de las LD_{80} , LD_{90} , LD_{95} y/o LD_{max} . En una modalidad la EC_{50} en la una o más de las últimas situaciones es 15ng/ml o menos, por ejemplo 10ng/ml o menos, tal como 5ng/ml o menos, en particular 1ng/ml o menos. En una modalidad la protección % de muerte celular es >90%, o >75% o >50%.

Por consiguiente, en una modalidad la presente divulgación provee un anticuerpo o una combinación de anticuerpos que mantienen la neutralización de la toxina incluso en la presencia de niveles elevados de toxina, por ejemplo como se mide en un análisis provisto aquí.

El efecto dañino de la toxina, por ejemplo, puede medirse en un análisis apropiado *in vitro*. En una modalidad la neutralización se mide en un análisis dado en Ejemplo 1 más

adelante. Se provee igualmente un anticuerpo o anticuerpos identificados en un análisis de neutralización, por ejemplo en donde la potencia del anticuerpo se mantiene en la presencia de niveles elevados de toxina.

Toxina A se usa indistintamente con TcdA.

Toxina B se usa indistintamente con TcdB.

En una modalidad un anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo.

En una modalidad un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención es capaz de neutralizar TcdA con potencia y afinidad muy altas.

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

Avidéz, tal como se emplea aquí, se refiere a la fuerza combinada de múltiples afinidades de unión.

En una modalidad un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención es capaz de neutralizar TcdA con potencia y afinidad muy alta, y avidéz elevada y valencia alta de unión.

Valencia de unión, tal como se emplea aquí, se refiere a la capacidad de un anticuerpo monoclonal de unirse a un antígeno muchas veces. En consecuencia, una alta valencia de unión tiene como resultado niveles elevados de decoración de antígeno con anticuerpos y / o niveles elevados de entrecruzamiento de moléculas de toxina, lo cual se considera ventajoso.

Mabs anti-TcdA de acuerdo con la presente divulgación pueden ser apropiados para neutralizar los efectos tempranos de TcdA, por ejemplo, en células, tales como las pérdidas de uniones intercelulares herméticas.

Unión intercelular hermética, tal como se emplea aquí, tiene como finalidad referirse a una zona impermeable de conexión entre células en una monocapa o estructura de tejido anatómico. La pérdida de fluido no ocurre cuando las uniones intercelulares herméticas conservan su integridad funcional y estructural. La pérdida de uniones intercelulares herméticas es una indicación de que la célula ha sido comprometida por la toxina y está bien documentada como un paso temprano en los efectos tóxicos de TcdA y TcdB (25) y se traduce en una pérdida de fluido que contiene suero, inmunoglobulina y iones (26, 3). Se cree que la pérdida de uniones intercelulares herméticas constituye un primer paso en la iniciación de la diarrea en humanos.

El sistema de análisis TEER puede usarse para medir la pérdida de uniones intercelulares herméticas *in vitro*. TEER es un acrónimo de análisis de resistencia eléctrica trans-epitelial y se emplea generalmente para medir la permeabilidad de una capa celular diferenciada representativa de un revestimiento endotelial del intestino. No obstante, en el contexto de la detección (*screening*) para anticuerpos, la pérdida TEER puede emplearse para

identificar anticuerpos que desaceleran o previenen el daño a las uniones intercelulares herméticas y, por consiguiente, es un sustituto para la protección contra el daño tisular que lleva a la diarrea.

A menudo se emplean células Caco-2, ya que estas se derivan de células del colon humano y se conocen por formar monocapas diferenciadas con células conectadas por uniones intercelulares herméticas. En el comercio se encuentra disponible un kit de Becton-Dickinson denominado *The Caco-2 BioCoat HTS plate system* (BD Biosciences / 354802). Las instrucciones en el kit son apropiadas para experimentación en el presente contexto. La resistencia de la membrana cambia cuando la membrana se ha visto comprometida.

Generalmente el anticuerpo se pre-incubará con la toxina antes de la adición al sistema TEER para establecer si el anticuerpo puede prevenir o desacelerar el daño a la membrana causado por la toxina. El análisis puede llevarse a cabo durante un período apropiado, por ejemplo 24 horas, tomando mediciones en ciertos puntos de tiempo. Los presentes inventores han establecido que un punto de tiempo de 4 horas es particularmente crítico para anticuerpos terapéuticamente útiles.

La concentración de toxina empleada en el análisis TEER está generalmente en el intervalo de 100-200ng/ml, muy preferiblemente 125ng/ml

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

En una modalidad la EC₅₀ del anticuerpo en el análisis TEER empleada en la citada condición es por lo menos 200ng/ml, por ejemplo menos que 100ng/ml, tal como alrededor de 60-80ng/ml.

En una modalidad se provee un anticuerpo anti-TcdA o un anticuerpo anti-TcdB apropiado para uso como un agente terapéutico en el tratamiento o prevención de la infección por *C. difficile*, en donde el citado anticuerpo se detectó y seleccionó empleando un análisis TEER.

En un aspecto se provee un método de detectar un anticuerpo en un análisis TEER con respecto a la capacidad de desacelerar o prevenir la pérdida de uniones intercelulares herméticas. En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos detectados son anticuerpos anti-TcdA. En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos detectados son anticuerpos anti-TcdB. En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos detectados son una combinación de anticuerpos anti-TcdA y anti-TcdB. En una modalidad el método comprende el paso de identificar un anticuerpo o anticuerpos apropiados y expresar cantidades apropiadas de los mismos. En una modalidad el método comprende el paso adicional de formular el citado anticuerpo o anticuerpos en una formulación farmacéutica. En una modalidad el método comprende el

paso adicional de administrar el citado anticuerpo o anticuerpos o la citada formulación a un paciente necesitado de ello.

En una modalidad múltiples anticuerpos de la divulgación pueden ser capaces de unirse a la toxina diana (TcdA o TcdB), lo cual puede contribuir a la eliminación inmunitaria de la toxina.

Múltiples anticuerpos, tal como se emplea aquí, tiene como finalidad referirse a múltiples copias de un anticuerpo con la misma secuencia o un anticuerpo con la misma secuencia de aminoácidos, o un anticuerpo específico del mismo antígeno diana, pero con una secuencia de aminoácidos diferente.

En una modalidad los anticuerpos de acuerdo con la invención son específicos del antígeno diana, por ejemplo específicos de un epítipo en el antígeno diana.

En una modalidad los anticuerpos de la invención son capaces de unirse al antígeno diana en dos o más localizaciones, por ejemplo dos o tres localizaciones, tales como cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más localizaciones, por ejemplo la toxina puede comprender dominios repetitivos y, en consecuencia, un anticuerpo puede ser específico de un epítipo y, en efecto, que el epítipo puede estar presente en el antígeno varias veces, es decir, en más de una localización. Por consiguiente, los anticuerpos dados pueden unir el mismo epítipo muchas veces en diferentes localizaciones en el antígeno.

En una modalidad el anticuerpo se une al antígeno dado múltiples veces, por ejemplo 2 a 20 veces tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 veces. En una modalidad el anticuerpo une el antígeno dado por lo menos 3 veces. Se cree que esta unión múltiple es importante en la neutralización y/o eliminación de la toxina. Sin querer entrar en limitaciones teóricas, se cree que la unión múltiple, por ejemplo 3 veces más, es decir, por decoración con 3 o más fragmentos Fc es importante en desencadenar una eliminación rápida de la toxina (24) principalmente a través del hígado y el bazo (27, 28).

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

En una modalidad el anticuerpo anti-TcdA se une 12 veces.

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

En una modalidad un anticuerpo anti-TcdA se une en el dominio de unión celular catalítico-terminal de TcdA.

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

En una modalidad un anticuerpo anti-TcdB se une en el dominio de unión celular catalítico-terminal de TcdB.

En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos de acuerdo con la divulgación son capaces de entrecruzar moléculas de toxina, por ejemplo un brazo de la molécula del

anticuerpo une una molécula de la toxina y el otro del anticuerpo une un epítipo en una molécula de toxina diferente, formando así una especie de complejo inmunitario. La formación de este último puede facilitar asimismo la activación del sistema inmunitario para eliminar la toxina relacionada y minimizar así los efectos perjudiciales *in vivo* de la misma.

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

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

En una modalidad anticuerpos contra TcdA pueden tener una EC_{50} en el intervalo de 0,1 – 100ng/ml, tal como 1 a 10ng/ml y una inhibición máxima en el intervalo de 50-100% con concentraciones de toxina de LD_{80-95} , por ejemplo contra toxinas de cepas de ribotipos 003, 027 y 078.

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

En una modalidad anticuerpos contra TcdB pueden tener una EC_{50} en el intervalo de 0,1 – 100ng/ml, tal como 1 a 10ng/ml y una inhibición máxima en el intervalo de 50-100% con concentraciones de toxina de LD_{80-95} , por ejemplo contra toxinas de cepas del ribotipo 003.

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

En una modalidad se proveen combinaciones de anticuerpos de acuerdo con la invención, por ejemplo combinaciones de anticuerpos específicos de TcdA, combinaciones de anticuerpos específicos de TcdB o combinaciones de anticuerpos específicos de TcdA y anticuerpos específicos de TcdB.

Combinaciones de anticuerpos específicos de TcdA se referirán generalmente a combinaciones de anticuerpos dirigidos a diferentes epítipos en el antígeno diana TcdA, o por lo menos con diferentes propiedades de unión.

Combinaciones de anticuerpos específicos de TcdB se referirán generalmente a combinaciones de anticuerpos dirigidos a diferentes epítipos en el antígeno diana TcdB, o por lo menos con diferentes propiedades de unión.

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

En una modalidad se provee una combinación de un anticuerpo anti-TcdA y dos anticuerpos anti-TcdB, por ejemplo en donde el anticuerpo anti-TcdA es 997 y en donde los anticuerpos anti-TcdB son 1125 y 1151.

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

Distintos anticuerpos, tal como se emplea aquí, tiene como finalidad referirse a anticuerpos con diferentes secuencias de aminoácidos, los cuales pueden unir el mismo epítipo o diferentes epítipos en el antígeno diana.

Se provee también por la presente invención una región específica o epítipo de TcdA, el cual se liga a un anticuerpo provisto por la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada dada en SEQ ID NO:49 y la secuencia de cadena ligera dada en SEQ ID NO:47.

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

Esta región específica o epítipo de las toxinas TcdA o TcdB pueden identificarse por cualquier método de mapeo de epítipos apropiados conocido en el arte, en combinación con uno cualquiera de los anticuerpos provistos por la presente invención. Ejemplos de tales métodos incluyen detectar péptidos de longitudes variables, derivados de las toxinas, para unirse al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos pueden producirse sintéticamente o por digestión proteolítica del polipéptido de la toxina. Péptidos que unen el anticuerpo pueden identificarse, por ejemplo, por análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, pueden usarse espectrometría NMR o cristalografía de rayos X para identificar el epítipo ligado por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, puede usarse el fragmento epitópico que une un anticuerpo de la presente invención, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos antagonistas adicionales que unen el mismo epítipo.

Anticuerpos que interbloquean (*cross-block*) la unión de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser similarmente útiles en neutralizar la actividad de la toxina.

Por consiguiente, la presente invención provee asimismo una anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para TcdA o TcdB, el cual interbloquea la unión de uno cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente a TcdA o TcdB y/o se interbloquea de unir estas toxinas por uno cualquiera de esos anticuerpos. En una modalidad, tal anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito aquí más arriba. En otra modalidad el anticuerpo neutralizante interbloqueante se une a un epítipo que bordea y/o se traslapa con el epítipo ligado por un anticuerpo descrito aquí anteriormente. En otra modalidad el anticuerpo neutralizante interbloqueante de este aspecto de la invención no se une al mismo epítipo que un anticuerpo de la presente invención o un epítipo que bordea y/o se traslapa con el citado epítipo.

Anticuerpos interbloqueantes pueden identificarse usando cualquier método apropiado en el arte, por ejemplo utilizando análisis ELISA de competición o BIAcore, en donde la unión del anticuerpo interbloqueante dirigido a TcdA o TcdB impide la unión de un anticuerpo de la presente invención o *viceversa*.

En una modalidad se provee un método de generar un anticuerpo anti-TcdA o anti-TcdB, en particular un anticuerpo neutralizante y/o un anticuerpo que interbloquea la unión de un anticuerpo descrito aquí, incluyendo el citado método los pasos de inmunizar un hospedero con un antígeno apropiado, por ejemplo un antígeno mostrado en una cualquiera de las SEQ ID Nos. 173 a 194 o una combinación de las anteriores. El citado método puede comprender igualmente uno o más de los siguientes pasos, por ejemplo identificar un anticuerpo de interés (en particular usando un análisis funcional tal como el análisis TEER), expresar el anticuerpo de interés y, opcionalmente, formular el anticuerpo como una composición farmacéuticamente aceptable.

En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación provee un método de inmunizar un hospedero con una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID Nos. 173 a 194 o una combinación de las anteriores.

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

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

En una modalidad anticuerpos de acuerdo con la invención o una combinación de los mismos tienen una EC_{50} de 200ng/ml o menos, por ejemplo 150ng/ml o menos, tal como 100ng/ml o menos, tal como en el intervalo de 0,1 a 10ng/ml.

No se requiere que los anticuerpos componentes individuales de mezclas tengan una EC_{50} en el citado intervalo, con la condición de que cuando se usen en combinación con uno o más anticuerpos, la combinación tenga una EC_{50} en el citado intervalo.

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

Los anticuerpos y combinaciones de acuerdo con la presente invención pueden tener además una o más de las siguientes propiedades ventajosas: tasa de desaceleración, alta afinidad, potencia elevada, la capacidad de unirse múltiples veces al antígeno diana, neutralizar la toxina mediante un mecanismo que reduce la pérdida de actividad TEER medible, estimular o promover la respuesta inmunitaria del hospedero, catalizar o contribuir a la eliminación inmunitaria del patógeno (o toxina) y/o educar el sistema inmunitario para responder apropiadamente al patógeno (o toxina).

Los residuos en los dominios variables del anticuerpo se numeran convencionalmente de acuerdo con un sistema diseñado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (en adelante "Kabat *et al.*, (supra)"). Este sistema de numeración se utiliza en el presente capítulo descriptivo excepto donde se indica lo contrario.

Las designaciones de residuos de Kabat no siempre corresponden directamente a la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia lineal actual de aminoácidos puede contener aminoácidos adicionales o menos que en la numeración estricta de Kabat, correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, sea una región base (*framework*) o una región determinante de complementariedad (CDR – *complementarity determining region*), de la estructura de dominio variable básica. La numeración correcta de Kabat de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Las CDRs del dominio de cadena pesada variable se localizan en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. *Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)), la espira equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, 'CDR-H1', tal como se emplea aquí, tiene como finalidad referirse a los residuos 26 a 35, como se describe por una

combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de la espira topológica de Clothia.

Las CDRs del dominio variable de cadena ligera se localizan en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Anticuerpos para uso en la presente invención pueden obtenerse empleando cualquier método apropiado conocido en el arte. El polipéptido/proteína de la toxina A y/o toxina B incluyendo proteínas de fusión, por ejemplo proteínas de fusión toxina-Fc o células (recombinante o naturalmente) que expresan el polipéptido (tal como linfocitos T activados) pueden usarse para producir anticuerpos que reconocen específicamente las toxinas diana. El polipéptido de la toxina puede ser el polipéptido de longitud total o un fragmento biológicamente activo o derivado del mismo.

Polipéptidos pueden prepararse por procesos bien conocidos en el arte de células hospederas producidas por ingeniería genética (*genetically engineered host cells*) que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se utilizan indistintamente, a menos que se especifique lo contrario. La secuencia para TcdA del ribotipo 027 se da en SEQ ID NO: 171 (número de acceso Uniprot C9YJ37) y la secuencia para TcdB del ribotipo 027 se da en SEQ ID NO: 172 (número de acceso Uniprot C9YJ35).

En algunos casos, el polipéptido del antígeno puede ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a una etiqueta de afinidad.

Anticuerpos generados contra el polipéptido del antígeno pueden obtenerse, donde la inmunización de un animal es necesaria, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos rutinarios y bien conocidos, véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden inmunizarse. No obstante, ratones, conejos, cerdos y ratas son generalmente los más apropiados.

Anticuerpos monoclonales pueden prepararse por cualquier método conocido en el arte tal como la técnica del hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica del hibridoma - EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Anticuerpos para uso en la invención pueden generarse también usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales, clonando y expresando cDNAs de región variable de inmunoglobulina, generados de linfocitos individuales seleccionados para la producción de

anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848; WO92/02551; WO2004/051268 y la Solicitud de Patente Internacional número WO2004/106377.

Anticuerpos humanizados (los cuales incluyen anticuerpos injertados en CDR) son moléculas de anticuerpos que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de una especie no humana y una región base de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, v.g., US 5,585,089; WO91/09967). Se entenderá que únicamente puede ser necesario transferir los residuos determinantes de especificidad de las CDRs, en lugar de la CDR entera (véase por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Anticuerpos humanizados pueden contener opcionalmente además uno o más residuos de región base, derivados de la especie no humana, de la cual se derivaron las CDRs.

Tal como se emplea aquí, el término 'molécula de anticuerpo humanizado' se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (incluyendo, si se desea, una o más CDRs modificadas) de un anticuerpo donante (v.g., un anticuerpo monoclonal murino), injertadas en una región base variable de cadena ligera de un anticuerpo aceptor (v.g., un anticuerpo humano). Para una reseña, véase Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una modalidad, en lugar de transferir la CDR entera, tan solo uno o más de los residuos determinantes de especificidad de una cualquiera de las CDRs descritas aquí más arriba se transfieren a la región base del anticuerpo humano (véase por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). En una modalidad únicamente los residuos determinantes de especificidad de una o más de las CDRs descritas aquí más arriba se transfieren a la región base de un anticuerpo humano. En otra modalidad únicamente los residuos determinantes de especificidad de cada una de las CDRs descritas aquí más arriba se transfieren a la región base de un anticuerpo humano.

Cuando las CDRs o los residuos determinantes de especificidad se injertan, cualquier secuencia base de región variable de aceptor apropiado puede usarse prestando atención a la clase/tipo de anticuerpo donador del cual se derivan las CDRs, incluyendo regiones base de ratón, primate y humano. Apropiadamente, el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable, que comprende regiones base de aceptor humano así como una o más de las CDRs provistas aquí.

Por lo tanto, en una modalidad se provee un anticuerpo humanizado que une la toxina A o la toxina B en donde el dominio variable comprende regiones base de aceptor humano y CDRs de donador no humano.

Ejemplos de regiones base humanas que pueden usarse en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., supra). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden utilizarse para la cadena pesada, REI puede usarse para la cadena ligera y EU,

LAY y POM pueden usarse tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, pueden emplearse secuencias de línea germinal humana; estas se encuentran disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, no se requiere necesariamente que las cadenas pesada y ligera del aceptor se deriven del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas que tienen regiones base derivadas de diferentes cadenas.

Igualmente, en un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones base no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, residuos inusuales pueden cambiarse a residuos de ocurrencia más frecuente para esa clase o tipo de cadena aceptora. Alternativamente, residuos seleccionados en las regiones base aceptoras pueden cambiarse de manera que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donador (véase Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Tales cambios deben conservar el mínimo necesario para recobrar la afinidad del anticuerpo donador. Un protocolo para seleccionar residuos en las regiones base aceptoras que pueden necesitar cambiarse se expone en WO 91/09967.

Generalmente las secuencias del anticuerpo divulgadas en el presente capítulo descriptivo son humanizadas.

La invención provee además secuencias que son 80%, 90%, 91%, 92%, 93% 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% similares a una secuencia o anticuerpo divulgado aquí.

"Identidad", tal como se emplea aquí, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", tal como se emplea aquí, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que pueden sustituirse a menudo por otro incluyen, pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
 - lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
 - aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
 - asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y
 - cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales con contenido de azufre).
- Grados de identidad y similitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G.,

eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, the BLAST™ software available from NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención incluyen una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesada y ligera de longitud total o un fragmento de la misma y pueden ser, pero no se limitan a Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticuerpos de dominio único (v.g., VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi-, tri- o tetra-valentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquier de los anteriores (véase por ejemplo Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en el arte (véase por ejemplo Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las Solicitudes de Patente Internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Anticuerpos multi-valentes pueden comprender especificidades múltiples, v.g, pueden ser biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase por ejemplo WO 92/22853 y WO05/113605). Variantes de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos se consideran especialmente en este ejemplo, puesto que el propósito es neutralizar dos proteínas diana independientes: TcdA y TcdB. Regiones variables de anticuerpos divulgados aquí pueden configurarse en tal modo que produzcan una variante de anticuerpo única que sea capaz de unirse a TcdA y TcdB y neutralizarlas.

En una modalidad el anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se provee como una proteína de fusión de anticuerpo de unión a TcdA o TcdB, que comprende una fracción de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAb) enlazados directa o indirectamente a ella, por ejemplo como se describe en WO2009/040562.

En una modalidad la proteína de fusión comprende dos anticuerpos de dominio, por ejemplo como un apareamiento de cadena pesada variable (VH) y cadena ligera variable (VL), conectados opcionalmente por un enlace disulfuro, por ejemplo como se describe en WO2010/035012.

En una modalidad el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma o similar especificidad por el anticuerpo o anticuerpos de dominio único. En una modalidad el

Fab o Fab' tiene una especificidad diferente por el anticuerpo o anticuerpos de dominio único, es decir, la proteína de fusión es multivalente. En una modalidad una proteína de fusión multivalente de acuerdo con la presente invención tiene un sitio de unión a albúmina, por ejemplo un par VH/VL en ella proporciona un sitio de unión a albúmina.

En una modalidad la proteína de fusión multivalente de acuerdo con la invención une TcdA y TcdB.

En una modalidad la proteína de fusión multivalente de acuerdo con la invención une TcdB en múltiples posiciones, por ejemplo tienen distintas regiones de unión específicas para dos epítomos diferentes.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si presentes, pueden seleccionarse tomando en consideración la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humana. En particular, pueden usarse dominios de región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está prevista para usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Alternativamente, pueden emplearse los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está prevista para fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras del anticuerpo, v.g., para neutralizar simplemente o antagonizar un antígeno. Se observará que variantes de secuencia de estos dominios de región constante pueden usarse igualmente. Por ejemplo, pueden utilizarse moléculas de IgG4 en las cuales la serina en la posición 241 se ha cambiado a prolina, como se describe en Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108. Se entenderá asimismo por una persona experta en el arte que los anticuerpos pueden experimentar una variedad de modificaciones postranslacionales. El tipo y magnitud de estas modificaciones depende a menudo de la estirpe celular hospedera usada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glucosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina), debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995).

En una modalidad la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, bien sea kappa o lambda.

Moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, impartiendo así a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga "observada" general dependerá de la secuencia de aminoácidos

absoluta de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoelectrico (pI) es el pH al cual una molécula particular o su superficie accesible a solvente no llevan carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo y fragmentos de la invención pueden producirse mediante ingeniería genética para tener un punto isoelectrico apropiado. Esto puede llevar a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular perfiles de solubilidad y/o estabilidad apropiados y/o características de purificación mejoradas.

Por consiguiente, en un aspecto la invención proporciona un anticuerpo humanizado producido mediante ingeniería genética para tener un punto isoelectrico diferente al del anticuerpo identificado originalmente del cual se deriva. El anticuerpo, por ejemplo, puede producirse por ingeniería genética reemplazando un residuo de aminoácido tal como reemplazando un residuo de aminoácido ácido con uno o más residuos de aminoácidos básicos. Alternativamente, residuos de aminoácidos básicos pueden introducirse o pueden eliminarse residuos de aminoácidos ácidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor pI inaceptablemente alto, pueden introducirse residuos ácidos para bajar el pI, según se requiera. Es importante que, cuando se manipula el pI, hay que tener cuidado de conservar la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. En consecuencia, en una modalidad el anticuerpo o fragmento producido por ingeniería genética tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Programas tales como ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, y http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, pueden usarse para predecir el punto isoelectrico del anticuerpo o fragmento.

Se entenderá que la afinidad de los anticuerpos provistos por la presente invención puede alterarse usando cualquier método apropiado conocido en el arte. La afinidad de los anticuerpos o sus variantes puede medirse usando cualquier método apropiado conocido en el arte, incluyendo BIAcore, empleando una proteína recombinante o natural aislada, apropiada, o una proteína de fusión/polipéptido adecuado.

Por consiguiente, la presente invención se refiere también a variantes de moléculas del anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por TcdA o TcdB, según sea apropiado. Tales variantes pueden obtenerse por un número de protocolos de maduración de afinidad incluyendo mutar las CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), barajado de cadenas (*chain shuffling*) (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), barajado de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), exposición en bacteriófagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al.,

Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) discute estos métodos de maduración de afinidad.

Afinidad mejorada, tal como se emplea aquí en este contexto, se refiere a una mejora sobre la molécula de partida.

Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención puede conjugarse con una o más molécula(s) efectora(s). Se entenderá que la molécula efectora puede comprender una molécula efectora única o dos o más de tales moléculas conectadas, de tal manera que formen una sola fracción que puede fijarse a los anticuerpos de la presente invención. Donde se desea obtener un fragmento de anticuerpo conectado a una molécula efectora, este puede prepararse por procedimientos estándar de ADN químicos o recombinantes, en los cuales el fragmento de anticuerpo se conecta directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en el arte (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 and Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Alternativamente, donde la molécula efectora es una proteína o polipéptido, la conexión puede lograrse empleando procedimiento de ADN recombinantes, por ejemplo como se describe en WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora, tal como se emplea aquí, incluye, por ejemplo, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o existentes en la naturaleza, ácidos nucleicos y sus fragmentos, v.g., ADN, ARN y sus fragmentos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos reporteros tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse por NMR o espectroscopia ESR.

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213, Californio 252, Iridio 192 y Tungsteno 188/Renio 188; o fármacos tales como pero no limitados a, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina pseudomonas, o toxina de la difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, v.g., angiostatina o

endostatina, o un modificador de respuesta biológica, tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables, útiles por ejemplo en diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía por emisión de positrones), y iones de metales paramagnéticos no radiactivos. Véase generalmente la Patente de los Estados Unidos No. 4,741,900 para iones de metales que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico. Enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos apropiados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes apropiados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes apropiados incluyen luciferasa, luciferina, y ecuorina; y núclidos radioactivos apropiados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar el transporte de un anticuerpo a través de la barrera epitelial al sistema inmunitario. Ejemplos de moléculas efectoras apropiadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en WO05/117984.

Donde la molécula efectora es un polímero, este puede ser, en general, un polímero sintético o existente en la naturaleza, por ejemplo un polialquileno de cadena recta o ramificada sustituido opcionalmente, polímero de polialquilenilo o polioalquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, v.g., un homo- o heteropolisacárido.

Sustituyentes opcionales específicos, que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos ya mencionados, incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena recta o ramificada sustituido opcionalmente, poli(propilenglicol) poli(vinilalcohol) o derivados de los anteriores, especialmente poli(etilenglicol) sustituido opcionalmente, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de los anteriores.

Polímeros específicos existentes en la naturaleza incluyen lactosa, amilosa, dextrina, glucógeno o derivados de los anteriores.

"Derivados", tal como se emplea aquí, tiene como finalidad incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos tiol reactivos selectivos, tales como maleimidas y similares. El grupo

reactivo puede enlazarse directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se entenderá que el residuo de un grupo similar formará parte en algunos casos del producto como el grupo enlazante entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero está generalmente en un intervalo de peso molecular promedio de 500Da a 50000Da, por ejemplo de 5000 a 40000Da tal como de 20000 a 40000Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo la capacidad de localizar ciertos tejidos tales como tumores, o ampliar la semivida en circulación (para una reseña véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). En consecuencia, por ejemplo, donde el producto está previsto para salir de la circulación y penetrar el tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5000Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de un peso molecular más alto, por ejemplo que tiene un peso molecular en el intervalo de 20000Da a 40000Da.

Polímeros apropiados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de los anteriores, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de alrededor de 15000Da a alrededor de 40000Da.

En un ejemplo los anticuerpos para uso en la presente invención se fijan a fracciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden fijarse a través de cualquier cadena lateral de aminoácidos disponible o grupo funcional de aminoácidos terminal, localizado en el fragmento del anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden existir naturalmente en el fragmento del anticuerpo o pueden producirse por ingeniería genética en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la fijación a una molécula efectora. Apropiadamente, los aminoácidos adicionales forman una región flexible modificada (*modified hinge region*), que contiene uno o más residuos de cisteína a los cuales puede fijarse la molécula efectora. Pueden usarse múltiples sitios para fijar dos o más moléculas de PEG.

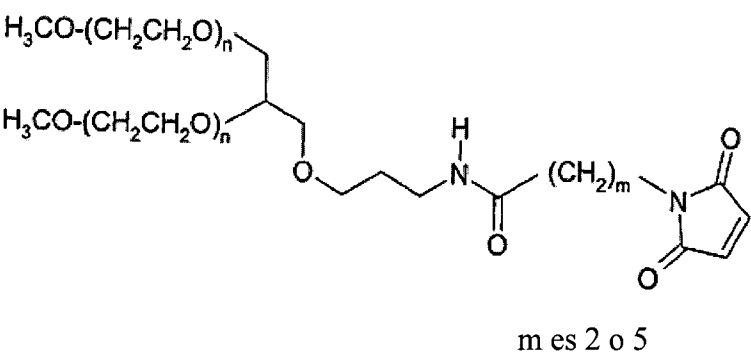
Moléculas de PEG apropiadas se enlazan covalentemente a través de un grupo tiol de por lo menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento del anticuerpo. Cada molécula de polímero fijada al fragmento del anticuerpo modificado puede enlazarse covalentemente al

átomo de azufre de un residuo cisteína, localizado en el fragmento. El enlazamiento covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Donde se usa un grupo tiol, como el punto de fijación, pueden utilizarse moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Como el material de partida puede utilizarse un polímero activado en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero, como se describe más arriba. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol, tal como un ácido α -halocarboxílico o éster, v.g., yodoacetamida, una imida, v.g., maleimida, una sulfona de vinilo o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse en el comercio (por ejemplo de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o pueden prepararse de materiales de partida disponibles en el comercio, empleando procedimientos químicos convencionales. Moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

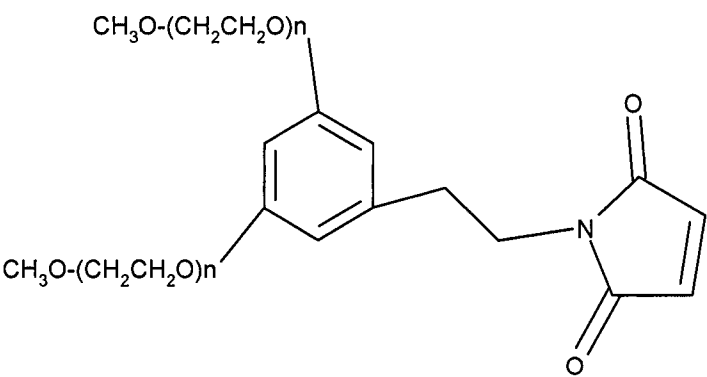
En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado o diFab, el cual se PEGila, es decir, tiene un PEG (poli(etilenglicol)) fijado covalentemente al mismo, v.g., de acuerdo con el método divulgado en EP 0948544 o EP1090037 [véase igualmente "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG se fija a una cisteína en la región flexible. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida enlazado covalentemente a un grupo tiol único en una región flexible modificada. Un residuo lisina puede enlazarse covalentemente al grupo maleimida, y a cada uno de los grupos amina en el residuo lisina puede fijarse un grupo metoxipoli(etilenglicol) polimérico que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000Da. El peso molecular total del PEG fijado al fragmento Fab puede ser por lo tanto aproximadamente 40.000Da.

Moléculas PEG particulares incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etil amida de lisina modificada con N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) MW 20.000), también conocida como PEG2MAL40K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

Fuentes alternativas de conectores PEG incluyen a NOF que suministra GL2-400MA2 (en donde **m** en la siguiente estructura es 5) y GL2-400MA (donde **m** es 2) y **n** es aproximadamente 450:



Es decir, cada PEG es alrededor de 20.000Da.
Moléculas efectoras PEG alternativas adicionales del siguiente tipo:



se obtienen de Dr. Reddy, NOF y Jenkem.

En una modalidad se provee un anticuerpo que es PEGilado (por ejemplo con un PEG descrito aquí), fijado a través de un residuo de aminoácido cisteína en o alrededor del aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo el aminoácido 226 de la cadena pesada (por numeración secuencial).

En una modalidad ciertos anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación tienen las siguientes propiedades:

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

La presente invención proporciona asimismo composiciones tales como una composición farmacéutica del anticuerpo o una combinación de los anticuerpos definidos aquí.

La presente invención provee igualmente una composición que comprende por lo menos dos anticuerpos de acuerdo con la invención, por ejemplo en donde por lo menos un anticuerpo en ella es específico de TcdA y por lo menos un anticuerpo en ella es específico de TcdB, o alternativamente por lo menos dos anticuerpos son específicos de TcdA o por lo menos dos anticuerpos son específicos de TcdB.

En una modalidad se provee una composición que comprende múltiples anticuerpos específicos de TcdA y opcionalmente uno o más anticuerpos específicos de TcdB.

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

Por consiguiente, en una modalidad se provee una composición que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 anticuerpos de acuerdo con la invención, es decir, distintos anticuerpos.

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

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

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

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

En una modalidad las composiciones provistas de acuerdo con la invención están bien definidas, por ejemplo son mezclas de anticuerpos monoclonales en lugar de composiciones de anticuerpos simplemente policlonales, derivados de un hospedero competente inmunitario o inmunizado.

En una modalidad la composición de anticuerpos tiene una EC₅₀ de 200ng/ml o menos, por ejemplo 150ng/ml o menos, tal como 100ng/ml o menos, tal como 0,1 a 10ng/ml.

Ventajosamente los anticuerpos descritos aquí tienen niveles muy altos de estabilidad biofísica y son apropiados para inclusión en mezclas de anticuerpos.

En un aspecto, una formulación o composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias amortiguadoras de pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales sustancias portadoras permiten formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

Presentaciones farmacéuticas apropiadas para administración incluyen presentaciones farmacéuticas apropiadas para administración parenteral, v.g., mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección intravenosa rápida (*bolus injection*) o infusión continua. Donde el producto es para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, preservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratarse pueden ser animales. No obstante, en una o más modalidades, las composiciones se adaptan para administración a sujetos humanos.

Convenientemente, en las formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, si el pH de la formulación es 7, entonces un pI de desde 8-9 o más puede ser apropiado. Sin querer entrar en limitaciones teóricas, se cree que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

En una modalidad la composición o formulación de la presente divulgación comprende 1-200mg/mL de anticuerpos, es decir, el contenido de anticuerpos combinados es, por ejemplo 150mg/mL o menos, tal como 100mg/mL o menos, en particular 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10mg/mL o menos.

En una modalidad una composición o formulación de acuerdo con la presente divulgación comprende 20mg/mL de cada anticuerpo en ella.

En una modalidad se provee una formulación que comprende:

33mg/mL o menos de un anticuerpo anti-TcdA que comprende una región variable pesada con una secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 49 y una región variable ligera con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 47, y

28mg/mL o menos de un primer anti-TcdB con una región variable pesada mostrada en SEQ ID NO: 129 y una región variable ligera mostrada en SEQ ID NO: 127, y

25mg/mL de un segundo anti-TcdB con una región variable pesada mostrada en SEQ ID NO: 159 y una región variable ligera mostrada en SEQ ID NO: 157.

En una modalidad la formulación farmacéutica con un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 comprende: 1 a 200mg/mL de un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, 1 a 100mM de una solución amortiguadora (*buffer*), 0,001 a 1% de un surfactante,

a) 10 a 500mM de un estabilizador,

b) 5 a 500 mM de un agente de tonicidad, o

c) 10 a 500mM de un estabilizador y 5 a 500 mM de un agente de tonicidad.

En una modalidad la composición o formulación de acuerdo con la presente divulgación comprende como solución amortiguadora una solución salina amortiguada con fosfato.

Por ejemplo la formulación con una pH de aproximadamente 6 puede comprender 1 a 50mg/mL de anticuerpo, 20mM L-HCl de histidina, 240 mM de trehalosa y 0,02% de polisorbato 20. Alternativamente una formulación con un pH de aproximadamente 5,5 puede comprender 1 a 50mg/mL de anticuerpo, 20mM de solución amortiguadora citrato, 240mM de sacarosa, 20mM de arginina, y 0,02% de polisorbato 20.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por cualquier número de vías incluyendo, pero no limitadas a las vías oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Inyectores de chorro (*hyposprays*) pueden usarse igualmente para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones. Pueden prepararse asimismo presentaciones farmacéuticas sólidas apropiadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección.

La aplicación directa de las composiciones se llevará generalmente a cabo mediante inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscularmente, o se administrará al espacio intersticial de un tejido.

Las composiciones pueden administrarse además en una lesión o directamente en el tubo gastrointestinal, por ejemplo, mediante dosificación oral encapsulada para tragar, a través de un tubo nasogástrico al estómago o al íleo, a través de un tubo rectal o soluciones para

lavativa o mediante cápsula rectal. El tratamiento posológico puede ser una pauta de dosis única o una pausa de dosis múltiples.

Se observará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a degradación en el tubo gastrointestinal. En consecuencia, si la composición tiene que administrarse por una vía que utiliza el tubo gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan el anticuerpo de la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez ha sido absorbido del tubo gastrointestinal.

Una discusión exhaustiva de sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables se encuentra disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

La presente invención provee igualmente un anticuerpo o combinación de anticuerpos o una composición que los contiene, como se describe aquí, para tratamiento, por ejemplo para el tratamiento o profilaxis de la infección por *C. difficile* o complicaciones asociadas con la misma, tales como diarrea, colitis, en particular colitis pseudomembranosa, distensión abdominal, dolor abdominal y megacolon tóxico.

De igual manera, la profilaxis puede realizarse mediante la administración de complejos pre-formados de un antígeno de toxina inactivada (toxóide) y un anticuerpo, con el fin de crear una vacuna.

En una modalidad los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que los contienen de acuerdo con la invención son apropiados para tratar la infección con las denominadas supercepas de *C. difficile*, es decir, cepas hipervirulentas tales como el ribotipo 027.

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

Los anticuerpos y composiciones de acuerdo con la presente invención son apropiados para uso en el tratamiento o profilaxis de los efectos de las toxinas de *C. difficile* relevantes durante la infección secundaria o re-infección. Pautas internacionales ratifican intervalos de tiempo después de una infección primaria, la cual define por consiguiente una infección secundaria (o recurrente) como distinta de una continuación de síntomas existentes, descrita a veces como recaída (29). La investigación ha demostrado que las infecciones secundarias pueden ser el resultado de la misma cepa o ribotipo que la infección primaria. En tales casos la recurrencia más que la recaída se basa en restricciones temporales acordadas. No obstante, la investigación muestra también claramente que la infección secundaria puede ser asimismo el resultado de la infección de una cepa o ribotipo distinto del de la infección primaria. En un

estudio, 48% de recurrencias de la enfermedad fueron el resultado de una segunda cepa distinta de la que había causado la primera infección (30). En otro estudio, más del 56% de las recurrencias de la enfermedad fueron el resultado de una segunda cepa distinta de la que había causado la primera infección (31).

En una modalidad los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que los contienen, de acuerdo con la invención, son apropiados para uso en la prevención del daño, por ejemplo el daño estructural a largo plazo, causado al epitelio del colon.

En una modalidad los anticuerpos, combinaciones y composiciones son apropiados para prevenir la infección por *C. difficile* incluyendo la recurrencia de la infección, en particular la infección intrahospitalaria.

En una modalidad los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que los contienen, de acuerdo con la invención, son apropiados para reducir el riesgo de recurrencia de la infección por *C. difficile*.

Ventajosamente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden administrarse profilácticamente para prevenir la infección o re-infección, porque en la ausencia de la toxina para la cual el anticuerpo es específico, el anticuerpo tiene que eliminarse simplemente del cuerpo sin causar interacciones adversas con los tejidos corporales del sujeto.

Ventajosamente, los anticuerpos de la presente divulgación parecen provocar una respuesta rápida luego de la administración, por ejemplo en el término de uno o dos días después de la administración se produce la rápida eliminación de la toxina diana, lo cual puede evitar que órganos vitales tales como los pulmones, el corazón y los riñones sufran daño. Esta es la primera vez que se han puesto a disposición agentes que pueden emplearse para prevenir el daño o lesión a un paciente por las toxinas A y/o B en el etapa de infección por *C. difficile* aguda.

Por consiguiente, en una modalidad, los anticuerpos, combinaciones de los mismos y composiciones que los contienen, de acuerdo con la invención, son apropiados para prevenir el daño a órganos vitales.

En una modalidad el anticuerpo, combinaciones o formulaciones descritas aquí son apropiadas para prevenir la muerte de un paciente infectado, si se administran en un marco cronológico apropiado antes de que las toxinas hayan ocasionado un daño irreparable.

Los anticuerpos de la presente divulgación tienen índices rápidos de manifestación, lo cual facilita el rápido efecto *in vivo*.

En una modalidad la población de pacientes tiene más de 60, tal como más de 65 años de edad.

En una modalidad la población de pacientes tiene 5 años de edad o menos.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden emplearse en combinación con un tratamiento antibiótico por ejemplo metronidazol, vancomicina o fidaxomicina.

Toda una gama de datos *in vitro* ejemplifica las propiedades de los Mabs y las mezclas de Mabs. Demostramos que una mezcla de 3 Mabs (componentes con 50% de cantidades molares de anti-TcdA y 50% de cantidades molares de anti-TcdB) fue capaz de proteger hámsteres contra una CDI letal.

En una modalidad se provee un método de tratar un paciente necesitado de ello administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo como se describe aquí o una combinación de anticuerpos o una composición que los contiene, por ejemplo en el tratamiento o profilaxis de infección por *C. difficile* o complicaciones asociadas con la misma, tales como diarrea, colitis, en particular colitis pseudomembranosa, distensión abdominal, dolor abdominal y megacolon tóxico.

En una modalidad el anticuerpo, combinación o formulación se administra por una vía parenteral, por ejemplo subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscularmente. Los datos en los Ejemplos generados en hámsteres indican que las dosis administradas por esta vía llegan al intestino y, en consecuencia, son capaces de generar un efecto terapéutico.

En una modalidad el anticuerpo, combinación o formulación se administra oralmente, por ejemplo una formulación recubierta entéricamente.

En una modalidad se provee el uso de un anticuerpo, combinación o formulación, como se describe aquí, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de infección por *C. difficile*.

En una modalidad la dosis administrada está en el intervalo de 1 a 1000mg/kg, por ejemplo 10 a 75mg/kg, tal como 20 a 50mg/kg.

En una modalidad la semivida del anticuerpo o anticuerpos en ratones y hámsteres *in vivo* está en el intervalo de 6 a 8 días en animales sanos (no infectados) y, por lo tanto, se espera que tengan semividas en humanos en el intervalo de 14-28 días.

En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos se administran como una dosis única.

En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos se administran como una dosis semanal o bisemanal.

En una modalidad el anticuerpo o anticuerpos se administran como dosis diarias únicas.

En una modalidad se provee un complejo que comprende TcdA o un fragmento inmunógeno de la misma, acompañado con uno o más anticuerpos anti-TcdA definidos aquí. El complejo puede emplearse como el antígeno en una formulación de vacuna, por ejemplo apropiada para generar anticuerpos protectores dirigidos a la toxina A *in vivo* después de la administración a un humano.

En una modalidad se provee un complejo que comprende TcdB o un fragmento inmunógeno de la misma, acompañado con uno o más anticuerpos anti-TcdB definidos aquí. El complejo puede emplearse como el antígeno en una formulación de vacuna, por ejemplo apropiada para generar anticuerpos protectores dirigidos a la toxina B *in vivo* luego de la administración a un humano.

Inmunoestimulantes tipo Th1 que pueden formularse para producir coadyuvantes apropiados para uso en la presente invención incluyen y no se limitan a los siguientes.

En una modalidad se provee un complejo que comprende TcdA o un fragmento inmunógeno de la misma y TcdB o un fragmento inmunógeno de la misma, en donde cada toxina o fragmento se acompaña con uno o más anticuerpos específicos de ella, en donde el complejo es apropiado para administración como una formulación de vacuna.

Complejos anticuerpo:antígeno son conocidos por absorberse por el sistema inmunitario en un proceso mediado por el receptor Fc (27, 28) y complejos pre-formados de complejos anticuerpo:antígeno han sido exitosamente usados como vacunas en estudios clínicos humanos (22).

En una o más modalidades la formulación de vacuna comprende además un coadyuvante como un inmunoestimulante.

Monofosforil lípido A, en particular monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL), es un inmunoestimulante tipo Th1 preferido para uso en la invención. 3D-MPL es un coadyuvante bien conocido, fabricado por Ribi Immunochem, Montana. A menudo se suministra químicamente como una mezcla de monofosforil lípido A 3-de-O-acilado con cadenas aciladas 4, 5, o 6. Puede purificarse y prepararse por los métodos enseñados en GB 2122204B, referencia que divulga asimismo la preparación de un difosforil lípido A, y variantes 3-O-deaciladas del mismo. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (US 6,005,099 y EP 0 729 473 B1; Hilgers *et al.*, 1986, *Int.Arch.Allergy.Immunol.*, 79(4):392-6; Hilgers *et al.*, 1987, *Immunology*, 60(1):141-6; y EP 0 549 074 B1). Una presentación preferida de 3D-MPL es en la forma de una formulación de particulado que tiene un tamaño de partícula pequeña menor que 0,2 mm de diámetro, y su método de fabricación se divulga en EP 0 689 454.

Las saponinas son también inmunoestimulantes Th1 preferidos de acuerdo con la invención. Las saponinas son coadyuvantes bien conocidos y se enseñan en: Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol suramericano Quillaja Saponaria Molina), y sus fracciones, se describen en US 5,057,540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55; y EP 0 362 279 B1. Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones

purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como coadyuvantes sistémicos potentes, y el método de su producción se divulga en la Patente de los Estados Unidos No. 5,057,540 y EP 0 362 279 B1. También en estas referencias se describe el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente coadyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe además en Kensil *et al.*, (1991. J. Immunology vol 146, 431-437). Combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina son también conocidas (WO 99/10008). Sistemas de coadyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7, se describen en WO 96/33739 y WO 96/11711. Un sistema tal es conocido como Iscorn y puede contener una o más saponinas.

Otro inmunoestimulante preferido es un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene dinucleótidos CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviatura de motivos de citosina-guanosina dinucleótido presentes en ADN. CpG es conocido en el arte como un coadyuvante cuando se administra por ambas vías sistémicas y mucosales (WO 96/02555, EP 468520, Davis *et al.*, *J.Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie and Davis, *J.Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6). Históricamente, se ha observado que la fracción ADN de BCG podía ejercer un efecto anti-tumoral. En estudios posteriores, se demostró que oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias génicas BCG eran capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo CG central, conllevaban esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación se aclaró más tarde en una publicación por Krieg, *Nature* 374, p546 1995. Un análisis detallado demostró que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencias, y que tales secuencias son comunes en ADN bacteriano, pero son raras en ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora es a menudo: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en donde el motivo CG no es metilado, pero otras secuencias CpG no metiladas son conocidas por ser inmunorstimuladoras y pueden usarse en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos está presente una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, como repeticiones de un motivo o una combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias inmunostimuladoras que contienen oligonucleótidos puede activar varios subconjuntos inmunitarios, incluyendo linfocitos citolíticos naturales (los cuales producen interferón γ y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige et al Vol 89 (no. 8), 1977). Otras secuencias con contenido CpG no metilado, que no tienen esta secuencia de consenso, han demostrado también ser inmunomoduladoras.

CpG, cuando se formula en vacunas, se administra generalmente en solución libre junto con antígeno libre (WO 96/02555; McCluskie and Davis, *supra*) o se conjuga

covalentemente con un antígeno (WO 98/16247), o se formula con una sustancia portadora, tal como hidróxido de aluminio ((antígeno superficial de la hepatitis) Davis *et al. supra*; Brazolot-Millan *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, USA, 1998, 95(26), 15553-8).

Tales inmunoestimulantes como se describe más arriba pueden formularse junto con sustancias portadoras, tales como por ejemplo liposomas, emulsiones aceite en agua, y/o sales metálicas, incluyendo sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL puede formularse con hidróxido de aluminio (EP 0 689 454) o emulsiones aceite en agua (WO 95/17210); QS21 puede formularse ventajosamente con liposomas que contienen colesterol (WO 96/33739), emulsiones aceite en agua (WO 95/17210) o alum (WO 98/15287); CpG puede formularse con alum (Davis *et al. supra*; Brazolot-Millan *supra*) o con otras sustancias portadoras catiónicas.

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

En consecuencia, sistemas coadyuvantes apropiados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente 3D-MPL, junto con una sal de aluminio.

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

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

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

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

En un aspecto adicional de la presente invención se provee un método de fabricación de una formulación de vacuna como se describe aquí, en donde el método comprende mezclar un polipéptido de acuerdo con la invención con un coadyuvante apropiado.

Combinaciones de coadyuvantes particularmente apropiados para uso en las formulaciones de acuerdo con la invención son las siguientes:

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

Tal como se emplea aquí, el término "que comprende" en el contexto del presente capítulo descriptivo debe interpretarse como "incluyendo".

Modalidades y preferencias pueden combinarse según sea técnicamente apropiado.

La divulgación contenida aquí describe modalidades que comprenden ciertos enteros. La divulgación se extiende también a las mismas modalidades que constan o constan esencialmente de los citados enteros.

FIGURAS

- Fig 1-10** muestran varias secuencias de anticuerpos y fragmentos
- Fig 11** muestra valoraciones cuantitativas de sueros para TcdA y TcdB
- Fig 12** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales
- Fig 13** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales y pareados
- Fig 14-15** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs pareados
- Fig 16-18** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de tres Mabs
- Fig 19-20** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de cuatro y cinco Mab
- Fig 21-22** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales y pareados con diferentes concentraciones de TcdA
- Fig 23-24** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales y mezclas de cinco Mab con diferentes concentraciones de TcdA

- Fig 25-26** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs individuales
- Fig 27-30** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs pareados
- Fig 31-33** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab
- Fig 34-40** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina
- Fig 41-45** muestra datos de neutralización *in vitro* de anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de dos Mab con diferentes relaciones relativas de Mab y diferentes concentraciones de toxina
- Fig 46-59** muestra datos de neutralización de TcdB para anticuerpos individuales y parejas de anticuerpos
- Fig 60** muestra la secuencia de aminoácidos para TcdA
- Fig 61** muestra la secuencia de aminoácidos para TcdB
- Fig 62** muestra datos del análisis TEER para TcdA en un formato de histogramas
- Fig 62A** muestra datos del análisis TEER para TcdA en un formato de gráficos de líneas
- Fig 63** muestra una curva de Meier-Kaplan para la combinación de los anticuerpos 997, 1125 y 1151; concentración alta es 50mg/kg y concentración baja es 5mg/kg.
La dosis de 50mg/kg produjo una protección del 100% el día 11, ~82% de protección el día 28. La dosis de 5mg/kg tuvo como resultado una protección incompleta y no durable.
- Fig 64** muestra cambios de peso corporal para hámsteres tratados con vancomicina y vehículo
- Fig 65** muestra el peso corporal para anticuerpos en dosis bajas de 5mg/kg y anticuerpos en dosis altas de 50mg/kg
- Fig 66** muestra fotografías del colon, en las que el animal recibió tratamiento con anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación vs. control
- Fig 67-68** muestra efectos de la mezcla vorticial (*vortexing*) sobre la estabilidad del anticuerpo
- Fig 69** muestra una comparación de la estabilidad de agregación para varios anticuerpos
- Fig 70-73** muestra la neutralización de TcdA para varios ribotipos

EJEMPLOS

Generación de Anticuerpos

Una variedad de diferentes inmunógenos y reactivos de detección se adquirieron o produjeron por técnicas de expresión convencionales en *E. coli*, con el fin de proporcionar una respuesta inmunitaria amplia y diversa y para facilitar la identificación y caracterización de los anticuerpos monoclonales (listados en la Tabla 1). En casos en los cuales se generaron proteínas o péptidos recombinantes, las secuencias se basaron en el ribotipo 027. La secuencia para TcdA del ribotipo 027 se da en SEQ ID NO: 171 (número de acceso a Uniprot C9YJ37) y la secuencia para TcdB del ribotipo 027 se da en SEQ ID NO: 172 (número de acceso a Uniprot C9YJ35).

Ratas Sprague Dawley y conejos de orejas caídas (*half-lop rabbits*) se inmunizaron con péptidos sintéticos que cartografían regiones comunes a las dos toxinas TcdA y TcdB de longitud completa, toxoide A inactivado con formaldehído, fragmentos de dominio de unión de la toxina A (CROPs1,2,3 o CROPs4,5,6) o un fragmento de dominio de unión de la toxina B (CROPs1,2,3,4) o, en algunos casos, una combinación de los anteriores. Luego de 2 a 6 inmunizaciones, se sacrificaron los animales y se recolectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC - *peripheral blood mononuclear cells*), el bazo y la médula ósea. Se monitorearon los sueros con respecto a la unión a los dominios de la toxina A, los dominios de la toxina B, toxina o toxoide por ELISA. Las valoraciones cuantitativas séricas de 2 de tales inmunizaciones se muestran en Figura 11.

Se empleó UCB SLAM como un medio para generar anticuerpos monoclonales. Linfocitos B se cultivaron directamente de animales inmunizados (Zubler et al., 1985). Este paso permitió tomar muestras de un gran porcentaje del repertorio de linfocitos B. Incorporando el método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM - *selected lymphocyte antibody method*) (Babcook et al., 1996) fue posible analizar por eliminación (*deconvolute*) pocillos de cultivo positivos e identificar células secretoras de anticuerpos específicos del antígeno. Aquí empleamos una versión modificada de SLAM (UCB SLAM (Tickle et al., 2009)), que utiliza un método basado en fluorescencia para identificar linfocitos B específicos de antígeno de pocillos de cultivo. Se establecieron cultivos de linfocitos B y los sobrenadantes se detectaron con respecto a su capacidad de unir un dominio de toxina purificada relevante (de unión, translocación o catalítico) en un análisis a base de microesferas empleando un sistema de detección celular Applied Biosystem 8200. Este era un análisis homogéneo que empleaba sobrenadante de cultivo de linfocitos B que contenía IgG, dominios de toxina biotinilados, recubiertos en microesferas de estreptavidina y un conjugado Fc-Cy5 de conejo/anti-rata en cabra. Los cultivos celulares positivos para unión a componentes TcdA o TcdB de este análisis se seleccionaron para uso en análisis funcionales a base de células para identificar neutralizantes de citotoxicidad inducida por toxina.

Se identificaron aproximadamente 12.000 específicos de toxina en la detección de unión principal de un total de experimentos 40 x 50 placas. Esto equivalía a la detección sistemática de aproximadamente 0,5 billones de linfocitos B. Se aislaron pares de genes de región variable pesada y ligera de células individuales recolectadas por micromanipulación de aproximadamente 100 pocillos neutralizantes de toxina, siguiendo PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Estos genes de región V se clonaron entonces como anticuerpos de longitud total IgG1/kappa de ratón para regiones variables de rata y anticuerpos de longitud total IgG/kappa de conejo para regiones variables de conejo. Los anticuerpos se re-expresaron en un sistema de expresión transitorio HEK-293. Estos anticuerpos recombinantes se volvieron a analizar con respecto a su capacidad de neutralizar toxina en un análisis a base de células. Se detectaron también sistemáticamente anticuerpos recombinantes mediante BIAcore para determinar la afinidad por un dominio de toxina dada y determinar asimismo la especificidad y aproximar el número de episodios de unión de anticuerpo a la toxina. Con fundamento en la actividad *in vitro* en análisis a base de células y mediciones de afinidad, se seleccionaron los principales candidatos para humanización. A menos que se especifique lo contrario, todos los datos contenidos aquí se generaron usando los anticuerpos humanizados. Un panel de fragmentos de toxina, producidos en *E. coli*, recombinantes (TcdA), toxina derivada de *C. difficile* o toxoide (A) y péptidos sintéticos (B) se generaron o adquirieron de fuentes comerciales.

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

Fragmento	Número de Residuo	Fuente
TcdA catalítica	M1-E659	expresión UCB <i>E. coli</i>
translocación de TcdA	K577-D1350	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROPS ₁₂₃ (TcdA123)	S1827-D2249	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROPS ₄₅₆ (TcdA456)	G2205-R2608	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROP ₁	S1827-N1978	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROP ₂	G1966-N2133	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROP ₃	G2100-D2249	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROP ₄	G2213-N2381	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROP ₅	G2328-N2494	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROP ₆	G2462-N2609	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdA CROP ₇	R2554-D2701	expresión UCB <i>E. coli</i>
TcdB catalítica	M1-A593	expresión UCB <i>E. coli</i>
translocación de TcdB	R576-D1349	expresión UCB <i>E. coli</i>

unión de TcdB (TcdB1234)	S1833-E2366	expresión UCB E. coli
TcdB CROP ₁	S1833-S1981	expresión UCB E. coli
TcdB CROP ₂	G1968-D2113	expresión UCB E. coli
TcdB CROP ₃	G2100-E2247	expresión UCB E. coli
TcdB CROP ₄	G2234-E2366	expresión UCB E. coli
Toxina A	Longitud total	adquirido
Toxina B	Longitud total	adquirido
Toxoide A	Longitud total	adquirido

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

Dominio de la Toxina	Secuencia de Aminoácidos	
Catalítica	SPVEKNLHFVWIGGEVSD	SEQ ID NO: 173
Catalítica	NLAAASDIVRL	SEQ ID NO: 174
Catalítica	CGGVYLDVDMLPGIH	SEQ ID NO: 175
Catalítica	CGGVYLDVDMLPGIHSDLFK	SEQ ID NO: 176
Catalítica	CWEMIKLEAIMKYK	SEQ ID NO: 177
Catalítica	CTNLVIEQVKNR	SEQ ID NO: 178
Catalítica	PEARSTISLSGP	SEQ ID NO: 179
Catalítica	CSNLIVKQIENR	SEQ ID NO: 180
Catalítica	TEQEINSLWSFDQA	SEQ ID NO: 181
Catalítica	TEQEINSLWSFDPEARSTISLSGPC	SEQ ID NO: 182
Translocación	NVEETYPGKLLLC	SEQ ID NO: 183
Translocación	Acetyl-CANQYEVRLNSEGR	SEQ ID NO: 184
Translocación	VNTLNAAFFIQSLIC	SEQ ID NO: 185
Translocación	YAQLFSTGLNTIC	SEQ ID NO: 186
Translocación	CAGISAGIPSLVNNEL	SEQ ID NO: 187
Translocación	DDL VISEIDFNNNSIC	SEQ ID NO: 188
Translocación	MEGGSGHTVT	SEQ ID NO: 189
Translocación	AVNDTINVLP TITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL	SEQ ID NO: 190
Unión	CGFEYFAPANTDANNIEGQA	SEQ ID NO: 191
Unión	CGYKYFAPANTVNDNIYGQA	SEQ ID NO: 192

Unión	CKYYFNTNTAEA	SEQ ID NO: 193
Unión	CKYYFDEDTAEA	SEQ ID NO: 194

Expresión y purificación de Mabs anti-toxina de *C. difficile*

Plásmidos de expresión de mamíferos de cadena pesada y cadena ligera separados se combinaron en relaciones equimolares y se usaron para transfectar células HEK-293 o CHO-S. Para estudios de expresión a pequeña escala se usaron lipofectamina y células HEK-293, mientras que para la producción de lotes más grandes de IgG se prefirió electroporación en CHO-S.

Sobrenadantes de cultivos se cargaron en una columna MabSelect SuRe (en PBS pH 7,4). Se eluyó el anticuerpo con solución amortiguadora 100% 0,1M de citrato de sodio pH 3,4. Las muestras se neutralizaron a pH 7,4 con Tris.Cl pH 8,0. Se retiró el agregado mediante columna de filtración en gel Superdex 200 en PBS pH 7,4.

TABLA 3

Anticuerpo	Tipo de célula	Volumen de SN (L)	Tipo de expresión	Cantidad purificada (mg)
CA164_00997.g1_P3	CHO	10	Transitorio	755,93
CA164_00922.g1_P3	CHO	0.5	Transitorio	129,36
CA164_01125.g2_P3	CHO	10	Transitorio	498,96
CA164_01151.g4_P3	CHO	5	Transitorio	262,43

Ejemplo 1. Neutralización in-vitro de la actividad TcdA por Mabs purificados

Todos los análisis de detección de neutralización se ejecutaron en placas de poliestireno de 96 pocillos. El análisis usa células CACO-2 cultivadas, y detectadas en MEM + 20% FCS, 2mM Q, y NEAA. Todas las combinaciones de anticuerpos están en relaciones equimolares, a menos que se especifique lo contrario. **Día 1:** las células se sembraron en placas @ 3000 por pocillo en 50 µl de medio, y se incubaron durante 24 horas; **Día 2:** se agregaron muestras purificadas de Mab humanizados a placas esterilizadas de polipropileno con fondo redondo de 96 pocillos; enriquecer las placas PP con toxina A en una concentración suficiente para generar la dosis letal apropiada, es decir, LD₈₀ o superior, e incubar durante 1 hora, a 37 °C; agregar 50 µl de esta mezcla a las placas de células e incubar durante 96 horas; **Día 5:** agregar azul de metileno (0,5% azul de metileno 50% etanol); incubar durante 1 hora a temperatura ambiente; lisar las células con 1% N-Lauril Sarcosina, y leer en un lector de placas BIOTEK Synergy 2 a 405nm. Los resultados se muestran en las Figuras 12 - 24. La EC₅₀ y la neutralización % máxima de la actividad de TcdA mostradas confirman que los anticuerpos

seleccionados tienen potencias muy altas como agentes individuales. Combinaciones de 2 a 5 de estos no mejoraron por encima de la mejor EC₅₀ o la neutralización % máxima. La falta de cualquier sinergia cuando se combinan los Mabs CA922, 923, 995, 997 y 1000 es una observación importante y puede deberse al hecho de que cada anticuerpo solo tiene niveles de afinidad y potencia excepcionalmente altos. Datos probatorios en Ejemplo 5 muestran igualmente que algunos de los Mabs (v.g., CA997) son capaces de unirse a subdominios de TcdA muchas veces. Por consiguiente, parece probable que estos 5 Mabs representen la afinidad, potencia y valencia máximas alcanzables cuando se toma como objetivo (*targeting*) el dominio de unión celular C-terminal de TcdA. Los anticuerpos fueron también efectivos en neutralizar concentraciones muy altas de toxina que fluctuaban desde LD₈₀ a más de LD₉₅ (LD_{máx}), aunque se observaron algunos aumentos pequeños en la EC₅₀ (es decir, reducciones en potencia) con niveles muy elevados de [TcdA]. Estos datos son igualmente sorprendentes, puesto que otros han mostrado reducciones sustanciales en potencia cuando se analizan concentraciones elevadas de TcdA (20).

La potencia y afinidad elevadas de los Mabs descritos aquí, v.g., para CA997, no se deben solamente a su alta valencia de unión. Otros (20 y WO06/071877) describen Mabs anti-TcdA capaces de unirse hasta 14 veces. Estos Mabs tenían afinidades únicamente en el intervalo de 0,3 a 100nM y mostraron protección incompleta contra citólisis mediada por TcdA (*TcdA-mediated cell killing*), solo (26-63% de protección) o en parejas (31-73% de protección). Por lo tanto, se ha demostrado que una elevada valencia de unión a TcdA no implica necesariamente una alta afinidad de unión a TcdA o su neutralización. Ni las afinidades ni la valencia de unión a TcdA se describieron para el Mab CDA-1 (18 y US7625559). En consecuencia, los Mabs se describen aquí por tener afinidad, potencia y valencia sorprendentes.

TABLA 4. Combinaciones de 1, 2 & 3 Mab anti-TcdA con una concentración única de TcdA (LD₈₀)

Anticuerpo	Concentración final de Mab (máxima) ng/ml	EC ₅₀ (ng/ml)
922	500	1,21
923	500	160,42
995	500	37,64
997	500	6,25
1000	500	19,73
922+923	500	3,58
922+925	500	3,326
922+997	500	2,88
922+1000	500	2,64
923+995	500	60,23
923+997	500	7,54

923+1000	500	9,24
995+997	500	7,29
995+1000	500	19,63
997+1000	500	4,46
922+923+995	500	4,72
922+923+997	500	3,23
922+923+1000	500	3,21
922+995+997	500	2,22
922+995+1000	500	2,85
922+997+1000	500	2,22
923+995+997	500	5,04
923+995+1000	500	9,49
995+997+1000	500	5,84
922+923+995+997	500	2,75
922+923+995+1000	500	3,75
922+995+997+1000	500	3,46
923+995+997+1000	500	4,81
922+923+997+1000	500	3,06
922+923+995+997+1000	500	4,72

TABLA 5. Combinaciones de Mabs individuales, dobles y triples anti-TcdA con varias concentraciones de TcdA, donde TcdA está en su LD₈₀, LD₉₀, LD₉₅ y LD_{max}.

Toxina TcdA	Muestra	Concentración de Mab final ng/ml	EC ₅₀ (ng/ml)
@ 3000 pg/ml (LD _{MAX})	922	500	4,89
	997	500	10,99
	1000	500	50,17
	922+997	500	7,18
	922+1000	500	6,99
	997+1000	500	9,437
	922+997+1000	500	10,80
	922+997+1000+995	500	15,03
	922+997+1000+995+923	500	7,16
@ 1000 pg/ml (LD ₉₅)	922	500	1,24
	997	500	3,42
	1000	500	9,60
	922+997	500	1,85
	922+1000	500	2,51
	997+1000	500	3,61
	922+997+1000	500	2,40
	922+997+1000+995	500	2,74
	922+997+1000+995+923	500	2,38
@ 700 pg/ml (LD ₉₀)	922	500	0,84
	997	500	2,40
	1000	500	6,23
	922+997	500	1,19
	922+1000	500	1,33
	997+1000	500	2,68
	922+997+1000	500	1,84
	922+997+1000+995	500	2,17
	922+997+1000+995+923	500	2,06
@ 350 pg/ml (LD ₈₀)	922	500	0,39
	997	500	1,18
	1000	500	2,76
	922+997	500	0,67
	922+1000	500	0,85
	997+1000	500	2,06
	922+997+1000	500	0,83
	922+997+1000+995	500	0,97
	922+997+1000+995+923	500	0,98

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

Descripción de los métodos de análisis:

Todos los análisis de detección de neutralización se ejecutaron en placas de poliestireno de 96 pocillos.

El análisis utiliza células CACO-2 cultivadas, y detectadas en MEM + 20% FCS, 2mM Q, y NEAA. A menos que se especifique lo contrario, todas las combinaciones de Ab están en relaciones iguales.

- Día 1: se sembraron las células en placas @ 3000 por pocillo en 50 µl de medio, y se incubaron durante 24 horas
- Día 2: se agregaron muestras purificadas de Mabs humanizados a placas esterilizadas de polipropileno de fondo redondeado, de 96 pocillos
- Enriquecer las placas PP con toxina B, lote # 031 e incubar durante 1 hora, a 37°C
- Agregar 50 µl de esta mezcla a las placas con células
- Incubar durante 96 horas
- Día 5: Agregar azul de metileno (0,5% azul de metileno, 50% de etanol)
- Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
- Lisar las células con 1% N-Lauril Sarcosina
- Leer en un lector de placas BIOTEK Synergy 2 a 405nm

Los datos en las Figuras 25 a 33 muestran que los Mabs individuales solos fueron relativamente inefectivos en neutralizar TcdB, tanto en términos de neutralización % máxima como de actividad (EC_{50}). Sin embargo, cuando los anticuerpos se combinaron en grupos de dos y tres, se observaron mejoras considerables tanto en la neutralización máxima % como en actividad (EC_{50}). Se seleccionaron 1125 y 1151 como un apareamiento óptimo, aunque se observaron otros apareamientos excelentes: 1125+1153, 1125+1134.

Las parejas más efectivas de Mabs se seleccionaron empíricamente y se descubrió retrospectivamente que constituían combinaciones sorprendentes e inesperadas con respecto a las potencias individuales de cada Mab. Por ejemplo, en Tabla 6 únicamente CA927 tuvo un potencial de neutralización de TcdB que podría resultar en una EC_{50} definida, mientras que el potencial de neutralización de TcdB de ambos CA1125 y CA1151 fue insuficiente bajo estas condiciones de análisis para tener como resultado una EC_{50} definida. Sin embargo, no se encontró que CA927 fuera el Mab más efectivo para usar en una combinación. La mejor combinación que contenía CA927 tuvo una EC_{50} de 13,5 ng/ml, mientras que otras dos combinaciones de Mab tuvieron EC_{50} 's tan bajas como 2,59 y 4,71 ng/ml. En otro ejemplo, en Tabla 8, CA1099 tuvo la EC_{50} de neutralización de TcdB mínima bajo las condiciones de análisis empleadas. No obstante, no se encontró que CA1099 fuera el Mab más efectivo para usar en una combinación. La mejor combinación que contenía CA1099 tuvo una EC_{50} de 6ng/ml, mientras que otras dos combinaciones de Mab tuvieron EC_{50} 's tan bajas como 2 y 1ng/ml. Podríamos especular que los apareamientos más efectivos de Mabs se definen por sus modalidades de unión cooperativa, especialmente como se define, por tener epítomos no traslapantes.

TABLA 6. Combinaciones de Mab anti-TcdB y relaciones de Mab relativas con concentración constante de toxina.

Muestra	Concentración final de Mab ng/ml	EC ₅₀ (ng/ml)
1125.g2	1000	>1000
1134.g5	1000	>1000
927.g2	1000	12.89
1153.g8	1000	>1000
1102.g4	1000	>1000
927+1099	1000	>1000
927+1102	1000	>1000
927+1114	1000	>111.111
927+1125	1000	13,55
927+1134	1000	51,58
1099+1114	1000	>1000
1102+1114	1000	>333,333
1102+1125	1000	15,51
1114+1134	1000	19,70
1114+1151	1000	25,69
1114+1153	1000	27,48
1125+1134	1000	2,59
1125+1151	1000	4,71
1125+1153	1000	21,23
1125+1134+1114	1000	3,77
1125+1134+927	1000	2,63
1125+1151+1114	1000	4,90
1125+1151+927	1000	5,69
1125.g2+1134.g5+927.g2	1000	5,83
1125.g2+1134.g5+1153.g8	1000	9,89
1125.g2+1134.g5+1102.g4	1000	2,72

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

Todos los análisis de detección de neutralización se ejecutaron en placas de poliestireno de 96 pocillos.

El análisis emplea células CACO-2 cultivas, y detectadas en MEM + 20% FCS, 2mM Q, y NEAA.

- Día 1: se siembran las células en placas @ 3000 por pocillo en 50 µl de medio, y se incuban durante 24 horas
- Día 2: se agregaron muestras purificadas de Mab humanizados a placas esterilizadas de polipropileno, con fondo redondo, de 96 pocillos
- Enriquecer las placas de PP con toxina B (VPI 10463) e incubar durante 1 hora, a 37°C
- Agregar 50 µl de esta mezcla a las placas con las células
- Incubar durante 72 horas
- Día 5: agregar azul de metileno (0,5% azul de metileno, 50% ETOH)
- Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
- Lisar las células con 1% N-Lauril Sarcosina
- Leer en el lector de placas BIOTEK Synergy 2 a 405nm

Los resultados se muestran en Figuras 34 a 45.

Estos datos muestran que la mejor pareja de Mabs para neutralizar TcdB en un intervalo de concentraciones de toxina fue CA1125 y CA1151. Más aún, la combinación de 1125+1151 se vio ampliamente no afectada por cambios en las relaciones molares relativas, lo cual contrasta con 1125+1153.

TABLA 7. Combinaciones de Mab anti-TcdB y relaciones molares relativas con 3 diferentes concentraciones de toxina

Combinación de anticuerpos	Valores EC₅₀ (ng/ml)		
	TcdB LD60	TcdB LD77	TcdB LD85
1125.g2 + 927.g2 (50:50)	2,8	6	11,3
1125.g2 + 1102.g4 (50:50)	4	13	44
1125.g2 + 1114.g8 (50:50)	3,5	7,1	25,4
1125.g2 + 1134.g5 (50:50)	0,48	1,4	4
1125.g2 + 1151.g4 (50:50)	0,85	0,85	1,5
1125.g2 + 1153.g8 (50:50)	2,7	5,2	25,2
1125.g2 + 1134.g5 (25:75)	<0,15	0,84	7,2
1125.g2 + 1151.g4 (25:75)	0,73	1	2,1
1125.g2 + 1153.g8 (25:75)	7	10	27
1125.g2 + 1134.g5 (75:25)	0,66	1,2	2,5
1125.g2 + 1151.g4 (75:25)	1,4	1,2	8,3
1125.g2 + 1153.g8 (75:25)	2,9	7,5	30

De manera sorprendente e impredecible, los datos muestran que incluso las combinaciones pareadas específicas más activas tienen propiedades diferentes entre sí. La EC₅₀ de la combinación preferida de CA1125 y CA1151 en relaciones equimolares se ve ampliamente no afectada por una [TcdB] creciente. Las tres relaciones molares relativas de Mabs analizados (es decir, 25:75 vs. 50:50 vs. 75:25) tienen EC₅₀'s muy similares entre sí, sugiriendo que CA1125 y CA1151 poseen modos de acción especialmente complementarios. Esto contrasta con la combinación de CA1125 con CA1134, en la que el aumento en EC₅₀ (es decir, reducción de la potencia) con [TcdB] más elevada es más sustancial y en la que las tres relaciones molares de los Mab no son igualmente efectivas: la relación de CA1125:CA1134 de 25:75 es notablemente menos potente que 50:50 y 75:25. Esto sugiere que la potencia combinada de CA1125+CA1134 es más dependiente del componente CA1125. La EC₅₀ de todas las tres combinaciones molares de CA1125 y CA1153 se ve sustancialmente afectada aumentando [TcdB], lo cual sugiere que CA1153 es una pareja menos apropiada para combinación con CA1125. *In toto*, estos datos muestran que CA1125 y CA1151 son una combinación particularmente favorable, puesto que la potencia máxima se mantiene a través de un intervalo de relaciones molares de Mab y TcdB.

TABLA 8. Neutralización de TcdB – 1 o 2 Mabs anti-TcdB con dosis de toxina constante (LD₈₀).

Anticuerpo	IC50 (ng/ml)
1099	2
1102	N/A
1114	103
1125	N/A
1134	8
1151	182
1153	260
926	N/A
927	N/A
1099 + 1125	6
1114 + 1125	7
1151 + 1125	2
1134 + 1125	1
1102 + 1125	6
1125 + 1153	12
926 + 1125	42
927 + 1125	4

TABLA 9. Neutralización de TcdB – 1 o 2 Mabs anti-TcdB con varias dosis de TcdB.

Combinación de anticuerpos	Valores EC ₅₀ (ng/ml)			Neutralización máxima		
	TcdB LD75	TcdB LD86	TcdB LD90	TcdB LD75	TcdB LD86	TcdB LD90
1125.g2	n/a	n/a	n/a	40%	25%	15%
1114.g8	n/a	n/a	n/a	45%	25%	15%
1134.g5	n/a	n/a	n/a	45%	25%	15%
1151.g4	n/a	n/a	n/a	45%	25%	20%
1153.g8	28,3	n/a	n/a	65%	35%	28%
1125.g2 + 1114.g8 (50:50)	10,1	243,8	n/a	85%	65%	40%
1125.g2 + 1134.g5 (50:50)	1,7	22,6	n/a	87%	60%	40%
1125.g2 + 1153.g8 (50:50)	6,1	32,2	n/a	95%	75%	48%
1125.g2 + 1151.g4 (50:50)	0,8	2,8	19,1	85%	80%	55%
1125.g2 + 1151.g4 (25:75)	1,2	2,8	47,2	85%	75%	60%
1125.g2 + 1151.g4 (75:25)	2,9	3,8	2,6	75%	70%	60%

Estos datos muestran que la combinación de Mabs, especialmente CA1125 y CA1151 mejoran la potencia, medida por EC₅₀, pero también medida por la protección máxima %. La protección máxima % es de importancia particular en este método de análisis, puesto que la mezcla Mab:TcdB se incubaba con células durante un período prolongado (72 horas). Puesto que TcdB es tóxica a células Caco-2 en el intervalo de pg/ml en 2-4 horas, puede considerarse que esta medición es un análisis muy difícil de la capacidad de neutralización de Mab y puede reflejar la capacidad de la mezcla de con respecto a su cinética o modalidades de unión. A su vez, esto puede reflejar la capacidad de mezclas de Mab para proteger contra los efectos de TcdB durante una infección establecida, cuando puede haber cantidades sustanciales de TcdB en los tejidos durante muchas horas.

Datos seleccionados de las Tablas 6-9 se ilustran además en Figuras 46-59.

Ejemplo 4. Valencia de unión de Mabs a subdominios de TcdB.

El número de moles de episodios de unión de anticuerpos anti-TcdB de *C. difficile* dirigidos a TcdB₁₂₃₄ se determinó por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR - *Surface Plasmon Resonance*) en un Biacore 3000 (GE Healthcare). Se inmovilizó estreptavidina en un chip sensor CM5 (GE Healthcare) a un nivel de ~4000RU mediante acoplamiento de amina, y TcdB₁₂₃₄ biotinilada se ligó a 500-600RU. Dos inyecciones de 20µl de las mismas mezclas de anticuerpos anti-TcdB (la concentración final de cada anticuerpo era 500nM) se aplicaron sobre esta superficie a 10µl/min y se registró la respuesta de unión de saturación. La superficie se regeneró después de cada ciclo usando HCl. Todos los datos se corrigieron con respecto a la unión de fondo (*background binding*) usando la respuesta a la estreptavidina únicamente por celda de flujo de referencia.

Tabla 10. Análisis de resonancia de plasmón superficial del número de sitios de unión de IgG en TcdB₁₂₃₄

Combinación de Anticuerpos	No. de repeticiones de ciclos de unión	Respuesta de Unión (RU)	Unión relativa a la respuesta media de CA927
CA1125.g2	10	750	0,9
CA1151.g4	10	1232	1,6
CA1125_CA1151	4	1941	2,5
CA1125_CA927	3	1570	2,0
CA1151_CA927	3	1959	2,5
CA927	8	791	1,0

Todas las respuestas se expresaron en relación con un múltiplo de respuesta media de CA927 (columna final tabla 10), puesto que CA927 parece ser representativo de un Mab que se une a TcdB₁₂₃₄ solamente una vez.

CA1125 inmovilizado, cuando se liga a TcdB₁₂₃₄, no permite que CA1125 se una más, respaldando la idea de que CA1125 tiene un solo sitio de unión en TcdB₁₂₃₄ y que, una vez que este se ha saturado, no puede encontrarse otro sitio de unión para CA1125. No obstante, cuando TcdB₁₂₃₄ se ha saturado por CA1125, CA1151 puede unirse todavía. Esto demuestra que CA1151 se une en sitios alternativos a los ocupados por CA1125. Conjuntamente estos datos muestran que CA1125 es un ligante único de TcdB₁₂₃₄ mientras que 1151 IgG se une a TcdB₁₂₃₄ más de una vez, muy probablemente dos veces. Por consiguiente, una mezcla de CA1125 y CA1151 puede unirse a TcdB₁₂₃₄ aproximadamente 3 veces.

Todas las combinaciones de anticuerpos tienen una respuesta de unión aditiva, que muestra que hay 2 o más sitios no competitivos en TcdB₁₂₃₄ ligados por estas combinaciones.

Ejemplo 5. Valencia de unión de Mabs a subdominios de TcdA.

El número de moles de episodios de unión de anticuerpos anti-TcdA de *C. difficile* dirigidos a TcdA₁₂₃ y TcdA₄₅₆ se determinó por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) en un Biacore 3000 (GE Healthcare). Se inmovilizó estreptavidina en un chip sensor CM5 (GE Healthcare) mediante acoplamiento de amina a un nivel de ~4000RU, y TcdA₁₂₃ biotinilada se ligó a una celda de flujo y TcdA₄₅₆ se ligó a una celda de flujo diferente a una respuesta de 500-600RU. Dos inyecciones de 30µl del mismo anticuerpo anti-TcdA a 1nM se aplicaron sobre ambas celdas de flujo a 10µl/min y se registró la respuesta de unión de saturación. La superficie se regeneró después de cada ciclo usando HCl. Todos los datos se corrigieron con respecto a la

72

unión de fondo usando la respuesta a la estreptavidina como celda de flujo de referencia únicamente.

Tabla 11. Análisis de SPR de las respuestas de unión de IgGs a TcdA₁₂₃ y TcdA₄₅₆ inmovilizadas

	CA997	CA1000	Relación CA997/CA1000
TcdA ₁₂₃	1069	166	6
TcdA ₄₅₆	1285	407	3

Anticuerpos CA997 y CA1000 se unen a TcdA₁₂₃ en una relación de seis CA997's a un CA1000, mientras que se unen a TcdA₄₅₆ en una relación de tres CA997's a un CA1000 (Tabla 2).

La respuesta máxima del anticuerpo para CA997, corregida por el peso molecular y nivel de toxina inmovilizada, es similar para TcdA₁₂₃ y TcdA₄₅₆. Esto sugiere que CA997 se une a TcdA₄₅₆ seis veces y CA1000 se une dos veces a TcdA₄₅₆. Por consiguiente, el anticuerpo CA997 se une probablemente a la toxina entera TcdA (TcdA) aproximadamente 12 veces. En total CA997 se une seis veces o más a A₁₂₃ y seis veces o más a A₄₅₆, mientras que CA1000 se une por lo menos una vez a A₁₂₃ y dos veces a A₄₅₆.

La valencia incrementada de unión a TcdA y TcdB puede tener dos efectos importantes *in vivo*. El primero es que cualquier Mab o mezcla de Mab, que sea capaz de unir TcdB más de una vez, tendrá un potencial aumentado de formar episodios de unión inter-toxina y, en consecuencia, inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación puede contribuir a la potencia disminuyendo la solubilidad de la toxina y formando complejos macromoleculares muy grandes, los cuales reducen por lo tanto la concentración de operación efectiva de la toxina. Tales complejos grandes de proteínas pueden ser absorbidos por macrófagos y monocitos residentes en el tejido y pueden contribuir a una respuesta inmune aumentada. Complejos antígeno:anticuerpo que llevan fragmentos Fc han demostrado específicamente ser capaces de activar (*priming*) una respuesta inmunitaria del hospedero contra un patógeno intestinal (21). Además, complejos solubles antígeno:anticuerpo se han usado exitosamente como una vacuna dirigida contra el antígeno en estudios clínicos humanos (22). Adicionalmente, la decoración inmunitaria de la toxina con IgG portadora de Fc puede contribuir a la eliminación inmunitaria usando mecanismos normales a través del hígado y el bazo. En general, niveles más altos de decoración Fc de antígeno llevan a niveles más rápidos y más completos de eliminación (23). Desde un punto de vista crítico, es posible que la presencia de 2 o más dominios Fc del Mab

por toxina, especialmente 3 dominios Fc por toxina pueda representar un número crítico de Fcs requeridos para una eliminación rápida y sustancial de la toxina (24). El Mab CA997 anti-TcdA es probablemente capaz de unirse a TcdA hasta 12 veces y la combinación de CA1125 y CA1151 es posiblemente capaz de unirse 3 veces a TcdB. En consecuencia, es muy probable que la mezcla de 3 Mab sea capaz de proporcionar estas clases de mecanismos de potencia adicional *in vivo*.

Ejemplo 6. Neutralización por Mab de la pérdida de TEER causada por TcdA.

Se realiza un análisis de integridad de la monocapa de *C.difficile* usando el sistema de placas Becton-Dickinson (BD) Caco-2 BioCoat HTS.

Día 1 – siembra de células Caco-2 @ 2×10^5 /ml por pocillo del inserto de placa en 500µl de medio de siembra basal (suministrado por BD). Adición de 35ml de medio de siembra basal a la cubeta alimentadora. Incubación de las células durante 24 horas a 37°C. **Día 2** – retiro del medio de siembra basal de los insertos y la cubeta alimentadora, y sustitución con medio de diferenciación Entero-STIM (suministrado por BD). Adición de 500µl por inserto de pocillo y 35ml a la cubeta alimentadora. Incubación de las células durante 72 horas más a 37°C. **Día 5** – Preparación de los anticuerpos con una concentración de 2x, relativa a la que se va a usar en el pocillo de análisis en una placa de polipropileno y toxina A. Adición de la toxina A a los anticuerpos con una concentración de 125ng/ml e incubación de la placa durante 1 hora a 37°C. Adición de 1ml de medio de cultivo Caco-2 (MEM + 20% FCS, 2mM Q, NEAA) a cada pocillo de una placa Tc estándar de 24 pocillos. Transferencia de la placa de inserto BioCoat a la placa TC de 24 pocillos. Retiro del medio Entero-STIM de los insertos y sustitución con 400µl de una mezcla de toxina:Ab.

La pérdida de uniones intercelulares herméticas entre las células intestinales es el efecto temprano clave de TcdA en las monocapas celulares y secciones del tejido intestinal, y constituye la principal causa de la diarrea. Albúmina y otras proteínas séricas se pierden en el lumen del intestino junto con fluido sérico concomitante. La pérdida de la resistencia eléctrica trans-epitelial en células cultivadas diferenciadas, que han formado una monocapa, es un sustituto útil para la protección contra los agudos efectos de TcdA. Tres anticuerpos demostraron tener excelentes niveles de protección contra la pérdida TEER, Figura 62. Es notable y sorprendente que las capacidades de estos Mabs en análisis TEER no reflejen las observadas en la neutralización de la toxina, como se midió en un análisis de proliferación celular. CA922 tiene el mejor desempeño en un análisis de proliferación celular ($EC_{50} = 1,21\text{ng/ml}$) y, sin embargo, esto es considerablemente superado en el análisis TEER por un anticuerpo (CA1000), el cual tiene una potencia >10x menor en un análisis de proliferación

celular ($EC_{50} = 19,73\text{ng/ml}$). CA997 tuvo el mejor desempeño en el análisis TEER, puesto que exhibió altos niveles de protección y los mantuvo con concentraciones menores de Mab.

CA997 tuvo un potencial sustancial de neutralizar la pérdida de TEER con una inhibición máxima cercana al 80% y una EC_{50} de aproximadamente 80ng/ml en 4 horas. Estas observaciones son inesperadas, puesto que los Mabs en cuestión tenían todas altas afinidades para dominios de TcdA (CA922 $\sim 4\text{pM}$, CA997 $\sim 132\text{pM}$, CA1000 $\sim 73\text{pM}$). Estos datos sugieren que CA997 y CA1000 reconocen epítomos importantes en la pérdida de TEER o neutralizan TcdA por un mecanismo diferente a otros Mabs. Por lo demás, puesto que se calcula que CA1000 se une a la holotoxina dos veces (una en TcdA₁₂₃ y una en TcdA₄₅₆), CA1000 puede definir epítomos 'críticos de TEER' en las regiones de unión de la célula TcdA, lo cual podría tener un valor particular para definir inmunógenos de vacuna. Los resultados se muestran en Figura 62.

Ejemplo 7. Afinidad de anticuerpos anti-toxina de *C. difficile* por subdominios de TcdA y TcdB: TcdA₁₂₃, TcdA₄₅₆ y TcdB₁₂₃₄.

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

Todos los experimentos se realizaron a 25°C. IgG anti-humana en cabra de un fragmento F(ab')₂ Affinipure, específico del fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizó en un chip sensor CM5 (GE) mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de captura ≈ 7000 unidades de respuesta (RUs - *response units*). Solución amortiguadora HBS-EP (10mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Surfactante P20, Biacore AB) se empleó como la solución amortiguadora de migración con un caudal de 10 $\mu\text{L/min}$. Se usó una inyección de 10 μL de cada anticuerpo con 1 $\mu\text{g/ml}$ o menos para capturar la IgG anti-humana inmovilizada, Fc. TcdA₁₂₃, TcdA₄₅₆ o TcdB₁₂₃₄ se valoraron cuantitativamente sobre anticuerpos purificados, capturados con diluciones dobles de 12,5nM con un caudal de 30 $\mu\text{L/min}$. Para los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de cultivo, una concentración única de 12,5nM de TcdA₁₂₃ o TcdA₄₅₆ y 50nM de TcdB₁₂₃₄ se pasó sobre los anticuerpos con 30 $\mu\text{L/min}$. Se calculó la cinética en $n=2$. La superficie se regeneró con un caudal de 10 $\mu\text{L/min}$ por dos inyecciones de 10 μL de 40 mM HCl, y una inyección de 5 μL de 5 mM NaOH.

Curvas de unión restadas de fondo referenciado doble se analizaron usando el software BIAevaluation (versión 3.2), siguiendo procedimientos estándar. Se determinaron parámetros cinéticos del algoritmo de ajuste.

TABLA 12. Afinidades y cinética de unión de los Mab anti-TcdA

	ID del Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD(pM)	Material/Análisis
TcdA123	CA164_00922.g1	1.09E+06	4.43E-06	4.06E-12	4.06	Valoración cuantitativa de 5 puntos del Mab purificado
	CA164_00923.g1	5.36E+05	3.47E-05	6.47E-11	64.7	
	CA164_00995.g1	Sin unión			Sin unión	
	CA164_00997.g1	7.84E+05	1.03E-04	1.32E-10	132	
	CA164_01000.g1	1.33E+05	9.78E-06	7.33E-11	73.3	Valoración cuantitativa de 2x1 puntos de sobrenadante
	CA164_00993.g1	9.00E+05	5.00E-06	5.56E-12	5.56	
TcdA456	CA164_00922.g1	1.29E+06	3.33E-06	2.59E-12	2.59	Valoración cuantitativa de 5 puntos de Mab purificado
	CA164_00923.g1	6.16E+05	1.92E-04	3.12E-10	312	
	CA164_00995.g1	2.87E+05	3.42E-05	1.19E-10	119	
	CA164_00997.g1	9.21E+05	6.15E-05	6.68E-11	66.8	
	CA164_01000.g1	3.55E+05	2.98E-05	8.41E-11	84.1	Valoración cuantitativa de 2x 1 puntos de sobrenadante
	CA164_00993.g1	1.25E+06	5.00E-06	4.00E-12	4.00	

TABLA 13. Afinidades y cinética de unión de Mab anti-TcdB

	ID del Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	KD (pM)	Material/Análisis
TcdB1234	CA164_1125.g2	2.64E+05	3.23E-05	1.22E-10	122	Valoración cuantitativa de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1151.g4	7.49E+05	4.13E-04	5.51E-10	551	Valoración cuantitativa de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_926.g1	1.38E+05	7.12E-05	5.16E-10	516	Valoración cuantitativa de 2x 1 puntos de sobrenadante
	CA164_927.g2	3.97E+05	3.61E-05	9.11E-11	91	Valoración cuantitativa de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1099.g2	5.24E+05	1.63E-05	3.10E-11	31	Valoración cuantitativa de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1102.g4	1.17E+05	3.78E-04	3.25E-09	3250	Valoración cuantitativa de 2x 1 puntos de sobrenadante
	CA164_1114.g2	2.87E+05	1.97E-03	6.87E-09	6870	Valoración cuantitativa de 2x 1 puntos de sobrenadante
	CA164_1114.g8	2.55E+05	1.85E-03	7.25E-09	7250	Valoración cuantitativa de 2x 1 puntos de sobrenadante
	CA164_1129.g1	1.89E+05	2.30E-04	1.22E-09	1220	Valoración de 2x 1 puntos de sobrenadante
	CA164_1134.g5	5.09E+05	2.45E-05	4.81E-11	48	Valoración cuantitativa de 3 puntos de Mab purificado
	CA164_1153.g8	1.43E+05	4.48E-05	3.14E-10	314	Valoración cuantitativa de 3 puntos de Mab purificado

Las afinidades de anti-TcdA son particularmente altas, comparadas con las afinidades publicadas de otros Mabs. Demostramos que se pueden alcanzar afinidades tan bajas como

4pM. El CA997 preferido tiene una afinidad de 132pM, CA1125 122pM y CA115 551pM. CA995 muestra claramente que no se une a CROPs A₁₂₃ y, por lo tanto, eso demuestra que los Mab mostrados aquí tienen propiedades que son diferentes unas de otras en modos sorprendentes e inesperados. CA922, 923, 997 y 1000 se unen por lo menos una vez a CROPs A₁₂₃ y A456. En consecuencia, estos 4 Mabs confirman que cada uno tiene que unirse a la holotoxina por lo menos dos veces. No pudimos derivar afinidades para la unión de estos Mabs a la holotoxina, debido a restricciones técnicas. Sin embargo, dadas las altas afinidades y valencias demostradas para los Mabs anti-TcdA, es posible especular que las afinidades funcionales contra la holotoxina pueden ser aún más fuertes que las ilustradas para unirse a los subdominios de la toxina.

Los Mabs anti-TcdB demostraron asimismo fuertes afinidades que alcanzaron cifras tan bajas como 31pM. En particular CA1125, 1151, 927, 1099, 1134 y 1153 muestran afinidades que sobrepasan las demostradas por otros.

Ejemplo 8. Caracterización biofísica de moléculas de IgG1 humanizada anti-toxina de *C. difficile*.

Moléculas analizadas

IgG1 Anti-TcdA:

CA164_00922.g1

CA164_0923.g1

CA164_0995.g1

CA164_0997.g1

CA164_01000.g1

IgG1 Anti-TcdB

CA164_01125.g1

CA164_01125.g2

CA164_01134.g4

CA164_01134.g5

CA164_01134.g6

CA164_01102.g1

CA164_01102.g4

CA164_01151.g4

Las combinaciones de anticuerpos necesitan integrarse de Mabs que tienen altos niveles de estabilidad, con el fin de mitigar riesgos potenciales de agregación durante el almacenamiento a largo plazo. La estabilidad térmica (T_m) se usa como una medida. De valor especial para las

mezclas de Mab es medir su propensión a agregarse, debido al estrés físico tal como agitación o sacudida. Los agregados son componentes indeseables de composiciones farmacéuticas, puesto que pueden reducir el tiempo de vida en almacenamiento y pueden plantear un riesgo para los pacientes en ciertos niveles. Los datos de T_m muestran que todos los 5 Mabs anti-TcdA tienen una elevada estabilidad T_m, mientras que tres (CA922, 923 y 997) tienen T_m's muy altas en el intervalo de 79-81°C. De los Mabs anti-TcdB analizados todos menos dos tienen T_m's muy altas. Es de notar que CA997, CA1125 y CA1151, los cuales se analizaron en el estudio de infección en hámsteres (Ejemplo 9), tuvieron T_m's muy elevadas (79,2°C, 79,3°C y 80, 8°C respectivamente), lo cual los hace apropiados para uso en una mezcla de Mab.

En el análisis de agregación por sacudida, de los 5 Mabs anti-TcdA CA997 y 922 tuvieron la propensión mínima a agregarse. De manera similar, CA115 y 1151 exhibieron las propensiones de agregación más bajas de los Mabs anti-TcdB. En consecuencia, el uso de CA997, 1125 y 1151 como una mezcla de Mab puede tener un valor especial, puesto que es más probable que sobrevivan la co-formulación y el almacenamiento con elevadas concentraciones de proteína.

Cálculo del punto isoelectrico (pI) mediante IEF capilar

Se prepararon muestras mezclando lo siguiente: muestra de proteína de 30ul con 2mg/ml, 0,35% de metilcelulosa, 4% pH 3-10 anfolitos (Pharmalyte), marcadores pI sintéticos (4,65 y 9,77), 1ul de cada solución patrón concentrada, y agua grado HPLC para completar el volumen final a 200ul. A continuación se analizó la mezcla usando un analizador iCE280 IEF (pre-enfocado a 1500V durante 1 minuto, seguido por enfocado a 3000V durante 6 minutos). Los electroferogramas calibrados se integraron luego usando software Empower (de Waters)

Estabilidad térmica (T_m) medida mediante el análisis ThermoFluor.

Este método usa colorante fluorescente naranja Sypro para monitorear el proceso de desdoblamiento de los dominios de proteína. El colorante se une a las regiones hidrófobas expuestas que se exponen como consecuencia del desdoblamiento, el cual tiene como resultado un cambio en el espectro de emisión.

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

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

La placa se pone en un sistema PCR en tiempo real rápido 7900HT, que contiene un dispositivo de calefacción para un control exacto de temperatura. La temperatura se aumenta de 20°C a 99° C (velocidad de rampa de 1,1°C/min). Un dispositivo CCD monitorea

XB

simultáneamente los cambios en fluorescencia en los pocillos. Se utiliza un algoritmo para procesar los datos de intensidad y tomar en cuenta transiciones múltiples.

Estresamiento de las muestras por agitación.

Durante la fabricación, las muestras de anticuerpos se someten a estrés mecánico generado por procesos tales como bombeo y filtración. Esto puede causar desnaturalización y, en consecuencia, agregación debido a la exposición de la proteína a interfaces aire-líquido y fuerzas de cizallamiento resultantes de la pérdida definitiva de bioactividad. El estrés vorticial es un método para detectar la robustez de las muestras de anticuerpo para la predicción de la estabilidad a la agregación.

Las dos moléculas de IgG1 anti-TcdA y anti-TcdB se sometieron a estrés por agitación por mezcla vorticial usando un Thermomixer Eppendorf Comfort a 25 °C, 1400 rpm. El tamaño de las muestras era de 250uL, (x3 por muestra) en un tubo taponado (plástico) Eppendorf cónico de 1,5 mL, en PBS pH 7,4. Cada muestra se llevó a una concentración de 1mg/ml (usando un coeficiente de extinción calculado de la secuencia) y se monitoreó la agregación por absorbencia a 340nm y/o 595nm, mediante el uso de un espectofotómetro Varian Cary 50-Bio, medida en intervalos de hasta 24 horas.

Resultados. La Tabla 14 presenta un resumen de los datos del pI y la Tm medidos para las dos moléculas de IgG1 anti-TcdA y anti-TcdB.

Tabla 14. Compilación de los datos de pI y Tm

	pI medido	Tm(Fab) en PBS	Tm (CH2)
IgG1 Anti-TcdA			
CA164_00922.g1	8,8	81	69,2
CA164_0923.g1	9,2	79	69,3
CA164_0995.g1	8,5	71	sin datos*
CA164_0997.g1	8,3	79.2	68,4
CA164_01000.g1	7,74	70.5	sin datos*
Anti-TcdB IgG1			
CA164_01125.g1	9,2	79.3	69,4
CA164_01125.g2	9,2	79.5	69,3
CA164_01134.g4	9,3	78.4	69,4
CA164_01134.g5	9,2	76.4	69,2
CA164_01134.g6	9,2	76.6	69,6
CA164_01102.g1	9,1	69	sin datos*
CA164_01102.g4	9,1	69.1	sin datos*
CA164_01151.g4	9,2	80.8	69,8

*denota que no fue posible distinguir los dominios Fab y CH2.

pI medido

Los pI medidos de las moléculas fueron altos (excepto para CA164_01000.g1_P3) y alejados del pH de las soluciones amortiguadoras de la solución tales como PBS, pH 7,4 y 50m de

acetato de sodio/125mM cloruro de sodio, pH 5. Esto puede significar que es posible seleccionar soluciones amortiguadoras con pH's apropiados para co-formulación de dos o más Mabs.

Estabilidad térmica (Tm) medida mediante análisis Thermofluor

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

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

Estresamiento de las muestras por agitación

Fue posible determinar diferentes estabilidades de agregación entre los diferentes anticuerpos.

Figura 67 muestra el efecto de la agitación *mediante* mezcla vorticial en diferentes moléculas de IgG1 anti-TcdA en PBS, pH 7,4.

Fue posible determinar un orden de clasificación (el más estable a la agregación primero): CA922≥997>923≥995>1000

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

Fue posible clasificar el orden de estabilidad a la agregación, de modo que los injertos CA1125 parecieron más estables que las moléculas CA1134, las cuales fueron más estables que las moléculas CA1102.

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

Más resultados para estos 4 Mabs se muestran asimismo en Figuras 67 y 68.

Para las moléculas anti-TcdA, CA922.g1 y CA977.g1, CA922 se basaron preferiblemente en los análisis ya mencionados, aunque aparte de CA1000 todas las moléculas podrían considerarse candidatos apropiados para uso como IgG1 terapéutica.

Para las moléculas anti-TcdB, las características biofísicas podrían agruparse en la familia de injertos, basándose en la estabilidad a la agregación y la Tm, de manera que los injertos CA1125 demostraron ser potencialmente más estables. Los injertos CA1102 mostraron los datos Tm más deficientes y exhibieron igualmente la mayor tendencia a agregarse *mediante* estrés por agitación.

Un estudio usando CA1151.g4 mostró que esta molécula exhibió una estabilidad a la agregación ligeramente incrementada, relativa CA1125.g2, y aparentemente equivalente a las

moléculas TcdA (CA922.g1 y CA997.g1. Todas las cuatro moléculas mostraron valore Tm equivalentes. CA997, CA1125 y CA1151 exhiben niveles muy elevados de termoestabilidad y niveles muy bajos de formación de agregados después de la agitación.

Ejemplo 9. Estudio de infección en hámsteres con Mab anti-toxina de *C. difficile*.

El estudio de infección en hámsteres se realizó por Ricerca Biosciences LLC, Cleveland, Ohio, USA. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee- Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*) de Ricerca. Los componentes activos y de control (composición y dosis) se ocultaron al personal de Ricerca hasta después de la terminación de período de estudio planeado de 28 días.

Hámsteres macho Golden Syrian (peso 82-103g, 54 días de nacidos) se alojaron individualmente en jaulas desechables con Filtro de Partículas de Gran Eficiencia (HEPA - *High Efficiency Particle Air* y se les suministró una dieta Teklad Global 2016 y agua *ad libitum*. Luego de la aclimatación, los hámsteres se pre-dosificaron (i.p.) con mezclas de Mab o PBS (control vehículo) una vez al día durante cada uno de 4 días: los días -3, -2, -1 y 0. Se investigaron dos dosis de Mab: dosis alta = 50mg/kg cada una de componentes anti-TcdA y anti-TcdB y una dosis baja de 5mg/kg de cada uno de los componentes anti-TcdA y anti-TcdB.

La combinación del fármaco analizado se componía de un anticuerpo anti-TcdA (CA997.g1), el cual constituía 50% de la proteína inyectada y dos anticuerpos anti-TcdB (CA1125.g2 y CA1151.g4), que conjuntamente constituían 50% de la proteína inyectada, pero que solos constituían 25% de la proteína inyectada. Los hámsteres se sensibilizaron (día -1) con 50mg/kg de fosfato de clindamicina en PBS (s.c.) antes de ser sometidos a la prueba de provocación (*before being challenged*) 1 día después (día 0) con $3,4 \times 10^6$ c.f.u. de células vegetativas de la cepa ATCC43596. Se administró vancomicina a 5mg/kg dos veces al día durante 5 días (p.o.) los días 1, 2, 3, 4, 5.

Se llevaron a cabo comprobaciones de viabilidad en los animales dos veces al día; los animales *in extremis* se sacrificaron y se contaron como muertos. Se determinaron los pesos corporales cada día de la dosificación, luego dos veces por semana y antes de sacrificar a los sobrevivientes. Se efectuó una necropsia general en todos los animales. Se crearon curvas de supervivencia por el método de Kaplan y Meier. Se analizaron las curvas de supervivencia usando el valor P de la prueba *logrank*, comparada con el umbral corregido de Bonferroni de $P = 0,005$. El grupo tratado con vancomicina no se incluyó en el análisis. Todas las pruebas estadísticas se hicieron con Prism v5.04. Todos los grupos contenían 11 animales, excepto el grupo de control vancomicina, que incluía 5 animales.

Las curvas de supervivencia pueden verse en Figura 63. Los hámsteres que recibieron PBS (control) murieron todos los días +2 y +3, mientras que los que recibieron el tratamiento de vancomicina durante 5 días murieron todos los días +10 y +11. Los hámsteres que recibieron la dosis alta de la mezcla de Mab UCB sobrevivieron todos hasta el día +11, a partir de ahí únicamente murieron dos animales hasta el final del estudio de 28 días. Los hámsteres que recibieron la dosis baja de la mezcla de Mab UCB Mab sobrevivieron todos hasta el día +3, a partir del cual los animales se perdieron claramente de manera continua hasta el día +16, cuando todos murieron. Los datos muestran niveles excepcionales y duración de protección, comparados con los datos publicados para el uso de Mabs anti-toxina en hámsteres (18). Estos datos *in vivo* respaldan las observaciones *in vitro* de un desempeño de alto nivel para la neutralización y la estabilidad.

No existe vínculo aparente entre la muerte y el peso corporal durante la fase aguda (días 1-5) de la infección, Figuras 64-65. Por consiguiente, puede suponerse que los hámsteres mueren a causa de los efectos devastadores directos e indirectos de TcdA y TcdB. Los hámsteres que sobreviven el período agudo debido a la protección parcial (dosis baja UCB) de Mabs neutralizantes pierden peso, debido presumiblemente al daño al intestino y al estatus nutricional alterado. Fue notable que muchos de los hámsteres, que continuaron sobreviviendo el período de 28 días del estudio debido a los efectos protectores de los Mabs de dosis alta UCB, se recuperaron de la pérdida de peso y, efectivamente, ganaron incluso peso. Esto puede tomarse como evidencia de los efectos protectores superiores de los Mabs UCB que permiten que el intestino funcione como normal.

Tabla 15. Puntajes de manifestaciones macroscópicas de la enfermedad (*gross pathology scores*)

Grupo	Ciego Negro	Ciego Rojo Oscuro	Ciego Rojo	Ciego Rosado	Ciego Normal	Tinturado Anogenital ‘wet-tail’	Intestino Delgado Rojo
Control PBS	1	9	1	0	0	1	1
UCB bajo	0	4	5	2	0	4	1
UCB alto	0	0	1	1	9	3	0

Es claro que los Mabs UCB fueron capaces de proteger los intestinos grueso y delgado de los derrames de sangre causados por TcdA y TcdB.

Los resultados se muestran en Figuras 63 a 66

Las fotografías en Figura 66 muestran manifestaciones macroscópicas típicas de la enfermedad para la hinchazón y los derrames de sangre de los ciegos, causados por TcdA y

TcdB (imagen izquierda, control PBS, muerte del animal el día 2) y los ciegos llenos de heces normales, luego de la protección por Mabs en dosis alta de UCB (imagen derecha, dosis alta de UCB, animal que sobrevive hasta el día 28). Estos datos muestran que luego de la protección con una dosis alta de Mabs UCB el intestino grueso puede retornar a la morfología y función normales.

Ejemplo 10. Neutralización de TcdA de diferentes cepas ribotipeadas por Mab purificados.

Las infecciones clínicas son causadas por una variedad de diferentes cepas. Las diferencias de las cepas se caracterizan usando un número de diferentes métodos, de los cuales el ribotipado es un método clave. Se observa que diferentes cepas de ribotipo tienen diferente patogenicidad, infección y propiedades de esporulación. La totalidad de la neutralización de TcdA mostrada más arriba usó TcdA purificada de una cepa conocida como VPI10463. Sin embargo, la cepa predominante, agresivamente patógena, asociada con epidemias, se denomina ribotipo 027. Otros ribotipos claves incluyen 078, 001, 106. Se ha observado una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre toxinas producidas por diferentes ribotipos y, en consecuencia, es importante que los Mabs sean capaces de neutralizar la toxina de un conjunto diferente de aislados clínicos. CA922, 997 y 1000 se analizaron en cuanto a su capacidad de neutralizar TcdA de las cepas 027 y 078 y se compararon con respecto a sus capacidades contra TcdA de VPI10463. Los Mabs se analizaron con 4 [TcdA] y se encontró que fueron capaces de neutralizar todas las toxinas sin diferencia significativa con LD₈₀, LD₉₀ y LD₉₅.

Tabla 16

Anticuerpo	Valores EC ₅₀ (ng/ml) – Cepa TcdA VP110463			
	LD ₈₀	LD ₉₀	LD ₉₅	LD _{max}
CA164_922	0,27	0,9	1,2	>500
CA164_997	1	2,5	3,5	25,4
CA164_1000	3,6	13,5	19,3	>500

Tabla 17

Anticuerpo	Valores EC ₅₀ (ng/ml) – Ribotipo 027 TcdA			
	LD ₈₀	LD ₉₀	LD ₉₅	LD _{max}
CA164_922	0,19	0,25	0,41	1,46
CA164_997	0,92	1,27	1,75	7,19
CA164_1000	2,25	2,49	3,52	16,32

Tabla 18

Anticuerpo	Valores EC ₅₀ (ng/ml) – Ribotipo 078 TcdA			
	LD ₈₀	LD ₉₀	LD ₉₅	LD _{max}
CA164_922	0,11	0,12	0,25	0,68
CA164_997	0,33	0,64	1,11	2,57
CA164_1000	2,04	2,41	5,03	14,16

Ejemplo 11. Datos de Farmacocinética (PK)

Un estudio de farmacocinética (PK) de una IgG1 humana (20mg/kg) en hámsteres sanos. Se descubrió que la farmacocinética tenía una vida similar a los Mabs en ratones o ratas (t_{1/2} 6-8 días). La dosificación i.p. y s.c. fue esencialmente la misma.

La farmacocinética y distribución en el intestino de un Mab hIgG1 se estudió en hámsteres Golden Syrian ‘normales’ (no infectados). Se administraron Mab purificados a hámsteres machos (120-135g) por CARE Research LLC, Fort Collins, Colorado, USA y las muestras se analizaron por UCB Pharma. El estudio fue aprobado por el comité IACUC CARE. Ocho animales recibieron cada uno una dosis única de 20 mg/kg de IgG1, cuatro se dosificaron *i.p.*, cuatro se dosificaron *s.c.* Se recogió sangre a las 1, 3, 8, 24, 48, 72, 103 y 168 horas pos-dosis, el suero se separó antes del almacenamiento a -80°C. Se extrajo también sangre de dos hámsteres no tratados, con el fin de proveer controles de análisis. Luego de la eutanasia, se cortó una sección de 2cm de longitud del colon desde la unión del ciego hacia delante de cada hámster. La sección del colon se enjuagó con solución amortiguadora de lavado (50% (v/v) PBS que contenía 50% (v/v) de una mezcla inhibidora de proteasa Sigma (P2714), antes de abrirla y antes de la separación y extirpación de la mucosa del músculo subyacente. Muestras mucosales se pusieron en 0,5ml de solución amortiguadora de lavado, homogenizada, hasta que se volvieron visualmente uniformes y se almacenaron a 4°C antes del despacho inmediato en hielo húmedo. Para el ELISA de IgG1 anti-humana se recubrieron placas Nunc maxisorp de 96 pocillos de un día para otro en 0,1M NaHCO₃ pH 8,3 con un fragmento IgG-Fcγ anti-humana F(ab')₂ en cabra (Jackson 109-006-098), las placas se lavaron con PBS-Tween (PBS/0,1% (v/v) Tween 20) y luego se bloquearon con 1,0% (w/v) BSA & 0,1% (v/v) Tween en PBS. Muestras de suero se diluyeron en solución amortiguadora de conjugado-muestra (1% (w/v) BSA, 0,2% Tween en PBS) y luego de lavar se revelaron con HRP kappa anti-humana en cabra (Cambridge Bioscience 2060-05) en solución amortiguadora de conjugado-muestra y TMB con una solución de cese de reacción 2,5M H₂SO₄.

Intestino, Mucosa y Niveles Séricos:

Se recolectaron muestras de suero de la sangre extraída en un punto de tiempo de 168 horas y, luego de ello, se extirparon muestras del colon.

20mg/kg IP a 168 horas

Muestra	ng/mL por cm mucosa	suero µg/mL
1001	23.2	75.0
1002	13.7	90.8
1003	21.8	70.5
1004	53.8	119.4

20mg/kg SC a 168 horas

Muestra	ng/mL por cm mucosa	suero µg/mL
2001	41.4	108.7
2002	62.1	76.6
2003	35.6	163.7
2004	37.3	153.3

Datos del Suero

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

Los datos se muestran también en Figura 70 y 71

ID del Hámster		Media	SE
Cinética del suero IP			
C _{max} :	µg/mL	202	12
T _{max} :	hr	36	7
AUC _(last) :	hr·µg/mL	22626	1378
AUC _(inf) :	hr·µg/mL	43287	7169
% Extrapolación:		43,7	9,2
CL/F	mL/hr/kg	0,50	0,07
MRT _{inf}	h	223	53
t _{½,z} :	h	149.2	36,9
Cinética del suero SC			
ID del Hámster		Media	SE
C _{max} :	µg/mL	186	21
T _{max} :	hr	76	16
AUC _(last) :	hr·µg/mL	22371	2258
AUC _(inf) :	hr·µg/mL	61290	17637
% Extrapolación:		54	11.7
CL/F	mL/hr/kg	0,43	0,13
MRT _{inf}	h	310	88
t _½ :	h	188,5	61,9

Se demostró también que pudo encontrarse hIgG1en 'raspados' del intestino, es decir que la hIgG1 penetra en la vasculatura del intestino sano – y, en consecuencia, podría ser protectora en 'dosificación profiláctica'. Este efecto sería aún más profundo en humanos, puesto que tienen un hFcRn afín.

Ejemplo 12. Niveles Séricos en Hámsteres con Infección por *C. difficile*

Este estudio se realizó para determinar la concentración sérica de CA725.0, CA726.0, CA997.g1 CA1125.g2, y CA01151.g4 luego de la administración i.p. (varias dosis detalladas a continuación) en el Hámster Golden Syrian.

Se cuantificaron Mabs humanizados usando análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) luego de la digestión triptica. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con material estándar auténtico, enriquecido con concentraciones conocidas en la matriz blanco, con mioglobina equina enriquecida, usada como estándar interno.

Se seleccionó un péptido único ("proteotípico") común a todos los Mabs humanizados investigados (DTLMISR, un péptido de la región CH2) y ambas muestras y las muestras de calibración de digirieron tripticamente como se describe. La digestión triptica de muestras de suero de 5 µl se llevó a cabo de un día para otro usando tripsina modificada grado secuenciación (Promega, Southampton, Reino Unido) luego de la desnaturalización / reducción con acetonitrilo / Tris (2-carboxietil) fosfina y carbamido-metilación con yodoacetamida (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido).

El sistema LC-MS/MS constaba de un inyector automático (*Autosampler*) CTC HTS-x (CTC Analytics, Zwingen, Suiza), un sistema Agilent 1290 LC (Agilent Technologies, Stockport, Reino Unido) y un sistema Sciex 5500 QTrap MS (AB Sciex, Warrington, Reino Unido), equipado con una fuente de iones Turbo V, operada en modo electroaspersión. Se separaron los analitos usando una columna Onyx Monolithic C18 (100x4,6 mm, Phenomenex, Macclesfield, Reino Unidos) con una gradiente de 2 a 95 % (v/v) agua / acetonitrilo (0.1 % ácido fórmico) entregados a 1,5 mL/min durante 6 minutos. El volumen de inyección fue 10 µL; todo el eluyente se introdujo en la fuente del espectrómetro de masas. La temperatura de la fuente del espectrómetro de masas se mantuvo a 600 °C y se optimizaron los demás parámetros de la fuente (v.g., energía de colisión, potencial de separación, presión de cortina de gas, etc.) para obtener la sensibilidad máxima para el péptido de interés. Se monitorearon transiciones selectivas para cada péptido proteotípico de interés.

Péptidos ("proteotípicos") únicos se seleccionaron para la totalidad de los analitos de interés; las muestras se analizaron luego de la digestión triptica.

Se calcularon las concentraciones plasmáticas basándose en los péptidos monitoreados y descritos a continuación.

Para CA164_00997 y CA164_01151, se observaron picos de interferencia en las trazas MRM. Por esta razón, estos dos analitos no pudieron cuantificarse en las muestras.

Se cuantificó la h-IgG total en todas las muestras usando un péptido común a todos los analitos de interés. Esto se hizo usando una curva estándar combinada de todos los cinco analitos. La validez de esto se demostró por el hecho de que la sumatoria de las concentraciones observadas para CA164_00725 y CA164_00726 concuerda perfectamente (dentro del error experimental) con la concentración observada para toda la h-IgG total.

Usando este enfoque, se determinó la concentración total de h-IgG en las muestras de animales dosificados con CA164_00997, CA164_01125 y CA164_01151.

En general, los datos obtenidos indican que la exposición de todos los cinco analitos de interés fue similar para una dosis dada.

Grupo de Estudio						
Etiquetas Ocultas Gru- po	Tratamiento	Tratamientos Actuales	Días de Dosis	Componentes del tratamiento		
				Anti-toxina A	Anti-toxin B	
4	Tratamiento 3	Vehículo PBS 5mL/kg i.p.	3, -2, -1, 0			
2	Vancomicina	Vancomicina 5mg/kg b.i.d. p.o.	1, 2, 3, 4, 5			
1	Tratamiento 1	UCB LD* 5mg/kg A 5mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA997.gl_P3 5mg/kg	CA1125.g2_P3 2.5mg/kg	CA1151.g4_P3 2.5mg/kg
5	Tratamiento 4	UCB HD* 50mg/kg A 50mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA997.gl_P3 50mg/kg	CA1125.g2_P3 25mg/kg	CA1151.g4_P3 25mg/kg
6	Tratamiento 5	Competidor LD* 5mg/kg A 5mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA726_P3 5mg/kg	CA725_P3 5mg/kg	
3	Tratamiento 2	Competidor HD* 50mg/kgA50mg/kg i.p.	3, -2, -1, 0	CA726_P3 50mg/kg	CA725_P3 50mg/kg	

Tabla 19

Grupo/tiempo	Día	Animal No.	Dosis	Concentración sérica µg/mL h-IgG total
1	1	44	5 mg/kg 997, 2,5 mg/kg 1125, 2,5 mg/kg 1151	280
	1	45		302
	1	46		182
	6	45		61
	6	47		71
	6	49		45
3	1	60	50 mg/kg 725, 50 mg/kg 726	3040
	1	61		3330
	1	62		2990
	6	62		583
	6	63		913
	6	64		1240
	28	64		199
	28	65		36
4	1	71	Vehículo	nd
	1	72		nd
	1	73		nd
5	1	82	50 mg/kg 997, 25 mg/kg 1125, 25 mg/kg 1151	3050
	1	83		2790
	1	84		2370
	6	82		838
	6	83		645
	6	84		855
	28	82		116
	28	83		65
	28	84		66
	28	85		44

Grupo/tiempo	Día	Animal No.	Dosis	Concentración sérica µg/mL h-IgG total
	28	86		101
	28	87		89
	28	88		27
	28	89		31
	28	90		66
6	1	93	5 mg/kg 725, 5 mg/kg 726	335
	1	94		322
	1	95		260
	6	200		103
	6	202		62
	6	203		79
	28	203		nd

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

Tabla 20. Anticuerpo CA725 es el anticuerpo MDX1388 del arte previo. El anticuerpo CA726 es el anticuerpo CDA1 del arte previo como se describe (15). Un resumen de estos datos se presenta en Figura 72.

Grupo	Patología del ciego					Patología del intestino delgado	
	Negro	Rojo oscuro	Rojo	Rosado	Normal	Rojo oscuro	Rojo
Control PBS	1	9	1	0	0	0	1
MDX alta 50mg/Kg x4	0	1	4	4	2	1	0
UCB alta 50mg/Kg x4	0	0	1	1	9	0	0

Referencias

1. Kuehne, S et al., "The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* Infection" Nature (2010) 467: 711-713.

2. Davies AH et al., "Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins" Biochem. J (2011) 436: 517-526.

3. Rothman, S et al., "Differential Cytotoxic Effects of Toxins A and B Isolated from *Clostridium difficile*" Infect. Imm. (1984) 46: 324-331.

4. Du, T and Alfa, MJ "Translocation of *Clostridium difficile* toxin B across polarized Caco-2 cell monolayers is enhanced by toxin A" Can J Infect Dis. (2004) 15: 83-88.
5. Kim, Iaconis and Rolfe. "Immunization of Adult Hamsters against *Clostridium difficile*-Associated Ileocectitis and Transfer of Protection to Infant Hamsters" Infect. Imm. (1987) 55:2984-2992
6. Rupnik JCM (2003) 41:1118-1125
7. Chaves-Olarte JBC (1999) 274:11046-11052.
8. Lylerly, DM et al., "Passive Immunization of Hamsters against Disease Caused by *Clostridium difficile* by Use of Bovine Immunoglobulin G Concentrate" Infection and Immunity (1991) 59:2215-2218.
9. Lylerly, DM et al., "Vaccination against Lethal *Clostridium difficile* Enterocolitis with a Nontoxic Recombinant Peptide of Toxin A" Current Microbiology (1990) 21:29-32.
10. Lylerly, DM et al., "Characterization of Toxins A and B of *Clostridium difficile* with Monoclonal Antibodies" Infect. Imm. (1986) 54:70-76.
11. Corthier et al., "Protection against Experimental Pseudomembranous Colitis in Gnotobiotic Mice by Use of Monoclonal Antibodies against *Clostridium difficile* Toxin A" Infect. Imm. (1991) 59: 1192-1195.
12. Kink JA and Williams JA, "Antibodies to Recombinant *Clostridium difficile* Toxins A and B Are an Effective Treatment and Prevent Relapse of *C. difficile*-Associated Disease in a Hamster Model of Infection" Infect. Imm. (1998) 66:2018-2025.
13. Ma D, et al., Progenics inc. ASM Poster 27th May 2010
14. Hansen, G and Demarest, SJ. WO 2006/0718877 A2
15. Babcock GJ, et al., "Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamster" Infect. Imm.(2006) 74:6339-6347.
16. Lowy I et al., "Treatment with Monoclonal Antibodies against *Clostridium difficile* Toxins" NEJM (2010) 362: 197-205.
17. Zubler, R. H., Erard, F., Lees, R. K., Van, L. M., Mingari, C., Moretta, L. & MacDonald, H. R. (1985). Mutant EL-4 thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction. J. Immunol. 134, 3662-3668
18. Babcook, J. S., Leslie, K. B., Olsen, O. A., Salmon, R. A. & Schrader, J. W. (1996). A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93, 7843-7848
19. Tickle, S., Adams, R., Brown, D., Griffiths, M., Lightwood, D. & Lawson, A. (2010). High-Throughput Screening for High Affinity Antibodies, pp. 303-307.

20. Demarest et al., mAbs (2010) 2:190-198
21. Yoshida et al., J. Clin. Invest. (2006) 116: 2142-2151
22. Xu et al., Vaccine (2005) 23:2658-2664.
23. Yousaf et al., Clin. Exp. Immunol. (1986) 66:654-660
24. Mannik et al., J. Exp. Med. (1971) 133: 713-739
25. Nusrat et al., Infection and Immunity (2001) 69:1329-1336
26. Lima et al., Infect Immun (1988) 56:582-588
27. Ravichandran et al J of Pharmacology and Experimental Therapeutics. (2006) 318: 1343-1351
28. Takahashi et al., (2009) Vaccine 27:2616-2619
29. Cohen et al., Infect. Cont. and Hosp. Epidem. (2010) 31: 431-455
30. Barbut et al., J. Clin. Microbiol. (2000) 38: 2386-2388
31. Wilcox et al., J. Hospital Infection (1998) 38: 93-100.

Traducción realizada por Hernando Torres de texto escrito originalmente en inglés
COLO 17184 841 001 4 - Id. 263633

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal específico del antígeno TcdA o TcdB, en donde el anticuerpo tiene una alta afinidad para el antígeno diana y es apropiado para reducir la duración y/o intensidad de la diarrea, la morbilidad y/o la mortalidad en un paciente con infección por *Clostridium difficile* o en riesgo de la citada infección.
2. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo tiene una potencia elevada, por ejemplo una EC₅₀ de 200ng/ml o menos, tal como 150ng/ml o menos, en particular 100ng/ml o menos, cuando la toxina se usa con una LD₈₀ o mayor.
3. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la EC₅₀ del anticuerpo está entre 0,1 y 10ng/ml, cuando la toxina está en una LD₈₀ o mayor.
4. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3 en donde la inhibición máxima de la toxina está entre 50 y 100%, cuando la toxina se usa con una LD₈₀ o mayor.
5. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo une el antígeno diana múltiples veces.
6. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo une el antígeno diana 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 veces o más.
7. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo es específico de TcdA.
8. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo es específico de TcdB.
9. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo tiene una afinidad de 1nM o menos, por ejemplo 600pM, tal como 50 a 600pM.
10. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante incluso con altas concentraciones de toxina, en particular efectivo contra los ribotipos 003, 012, 027 y 078.
11. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo tiene una EC₅₀ en un análisis TEER en el intervalo de 60 a 80ng/ml, cuando se mide 4 horas después de la iniciación del análisis.
12. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, el cual une específicamente una TcdA que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:44 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada

- en SEQ ID NO:45 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:46 para CDR-H3.
13. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende además una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:41 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:42 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:43 para CDR-L3.
 14. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 13 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:49 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:47.
 15. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, el cual une específicamente una TcdA que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:54 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:55 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:56 para CDR-H3.
 16. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 15 que comprende además una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:51 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:52 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:53 para CDR-L3.
 17. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 16 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:59 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:57.
 18. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, el cual une específicamente una TcdB que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:124 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:125 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:126 para CDR-H3.
 19. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 18 que comprende además una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:121 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:122 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:123 para CDR-L3.

20. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 19 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:129 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:127.
21. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, el cual une específicamente una TcdB que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:154 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:155 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:156 para CDR-H3.
22. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 21 que comprende además una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende por lo menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:151 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:152 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:153 para CDR-L3.
23. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 22 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:159 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:157.
24. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, el cual une específicamente una TcdA que tiene una cadena pesada y una cadena ligera en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:39, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:37.
25. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, el cual une específicamente una TcdB que tiene una cadena pesada y una cadena ligera en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:149 y SEQ ID NO:159, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:147 y SEQ ID NO:157.
26. Una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
27. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende dos o más anticuerpos específicos de TcdB.

28. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende dos o más anticuerpos específicos de TcdA.
29. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, en donde por lo menos un anticuerpo en la composición es específico de TcdA y por lo menos un anticuerpo en la composición es específico de TcdB.
30. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la composición comprende además por lo menos un segundo anticuerpo específico de TcdB.
31. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 26 a 30, en donde la composición comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 anticuerpos distintos al antígeno diana o antígenos, tal como 2, 3, 4, o 5 anticuerpos.
32. Una composición farmacéutica o mezcla que comprende los anticuerpos de las reivindicaciones 14, 20 y 23.
33. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, la cual comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
34. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 26 a 33, para uso en tratamiento, por ejemplo el tratamiento o profilaxis de la infección por *Clostridium difficile* o complicaciones de la misma.
35. Un método de tratar un paciente con una infección por *Clostridium difficile* o en riesgo de ella, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33.
36. Un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el tratamiento se emplea en combinación con un tratamiento adicional para el tratamiento de *Clostridium difficile*, por ejemplo seleccionado del grupo conformado por metronidazol, vancomicina, clindamicina, fidaxomicina y combinaciones de las anteriores.
37. Uso de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la infección por *Clostridium difficile* o complicaciones de la misma.
38. Un método de seleccionar un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 usando análisis para medir la protección contra la pérdida de TEER (resistencia eléctrica trans-epitelial).

39. Un método de seleccionar un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 usando análisis para medir la estabilidad térmica (Tm) y la resistencia a la agregación por agitación.
40. Un método de seleccionar una mezcla de anticuerpos para el tratamiento de infecciones por *Clostridium difficile* combinando mediciones de neutralización de la toxina, mediciones TEER, mediciones de termoestabilidad (Tm), mediciones de agregación por agitación y punto isoelectrico (pI), apropiadas para co-formulación.
41. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 combinado con un toxoide o composición farmacéutica que lo contiene, por ejemplo para uso en vacunación, tal como el tratamiento o profilaxis de infección por *Clostridium difficile* o complicaciones de la misma.

Resumen

Esta presente invención describe la derivación y selección de anticuerpos capaces de neutralizar las principales exotoxinas TcdA y TcdB de *Clostridium difficile*. La invención describe igualmente propiedades novedosas de neutralización y unión a antígeno de Mabs individuales y mezclas de los mismos.

Figura 1

SEQ ID NO: 8 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo 922.g1 VK (gL1) anti-toxina A

GACCCTGTGA TGACCCAGAG TCCGAGCACT CTTTCTGCCT CCGTGGGAGA CCGCGTGACC
ATTACATGTC AGGCTTCACA AAGTATCTCC AATGCTCTGG CCTGGTATCA GCAGAAACCC
GGCAAAGCCC CTAAGCTGCT CATCTACTCT GCATCAAGCC TGGCTAGCGG CGTGCCAAGC
CGATTCAAGG GGAGCGGTTC TGGCACTGAG TTTACGCTGA CCATCAGTAG CTTGCAGCCT
GACGATTTTG CAACCTATTA CTGCCAGTAC ACACACTACT CCCATACATC TAAAAACCCA
TTCGGAGGGG GTACTAAGGT CGAAATAAAG

SEQ ID NO: 10 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo 922.g1 VH (gH1) anti-toxina A

GAAGTGCAAT TGGTGGAAAG TGGCGGAGGA CTGGTGCAAC CCGGGGGTAG TCTGCGACTG
AGCTGTGCTG CCTCCGGCTT TACCATTAGC TCCTACTATA TGAGCTGGGT TCGACAGGCC
CCTGGAAAAG GACTCGAATG GATCGGCATC ATATCTTCCG GTGGGCATTT CACCTGGTAC
GCAAACCTGGG CTAAGGGGAG ATTCACGATT AGCAGCGACT CCACAACCGT GTACCTGCAA
ATGAACAGCC TGAGGGATGA GGACACTGCC ACATATTTCT GCGCACGCGC TTACGTGAGC
GGAAGCTCAT TTAATGGCTA TGCCTGTGG GGGCAAGGAA CACTCGTGAC TGTCTCG

SEQ ID NO: 18 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo CA923.g1 gL1 anti-toxina A

GACGTCGTGATGACTCAGAGCCCATCTAGTCTGAGCGCTAGCGTCGGAGACCGAGTCACAATTACC
TGTC AAGCCTCC CAGAGCATCTCCAACCTG GCTGGTACCAACAGAAACCTGGCAAGGTGCCC
AAGCTGCTGATCTATAGTGCTTCCACACTCGCAAGCGGCGTTCCGTCACGCTTTAAGGGATCTGGC
TCTGGCACTCAGTTCACCTTGACGATCTCAAGCCTGCAGCCAGAAGATGTGGCCACCTATTACTGC
CAGTATTCCCACTACGGGACTGGGGTGTTCGGTGCCTTTGGAGGTGGGACCAAGTGGAGATAAAG

Figura 2

SEQ ID NO: 20 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo CA923.g1 gH1 anti-toxina A

GAAGTTCAACTTGTGGAATCTGGAGGCGGGCTCGTGCAGCCTGGTGG AAGCCTTAGACTGAGCTGC
GCTGCATCCGCATTTTCCCTGTCCAAC TACTACATGAGCTGGGTGCGACAAGCACCAGGCAAGGGA
CTGGAATGGATTGGCATCATAAGCTCCGGTTCCAATGCCCTGAAATGGTACGCATCATGGCCGAAA
GGCCGCTTTACCATAAGCAAGGACTCCACCACCGTCTATCTGCAGATGAACTCATTGCGTGCCGAG
GACACTGCAACGTACTTCTGTGCTCGCAACTACGTGGGAAGCGGATCTTATTATGGCATGGATCTG
TGGGGACAAGGTACACTCGTGACCGTCTCG

SEQ ID NO: 28 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo CA993.g1 gL1 anti-toxina A

GATGTCGTGA TGA CT CAGTC CCCCTCTACA TTGAGTGCCT CTGTCGGTGA TCGAGTTACC
ATCACCTGTC AAGCAAGCCA GAGCATCAGC TCCTACTTCT CTTGGTACCA GCAAAAGCCG
GGAAAAGCCC CTCAACTGCT GATTTATGGG GCCTCAACAC TGGCTTCTGG CGTGCCATCA
AGATTCAAGG GATCTGGCTC CGGCACTGAG CTTACACTGA CCATTAGCTC CCTGCAACCT
GACGATTTTG CTACCTACTA CTGCCAGTGC ACCGACTATA GTGGGATATA TTTCGGCGGA
TTTGGGGGAG GGACGAAAGT GGAAATCAAG

SEQ ID NO: 30 secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo CA993.g1 gH1 anti-toxina A

GAAGTTCAGC TGGTCGAGAG CGGAGGCGGA CTGGTGCAAC CTGGTGGTAG CCTGAAACTC
TCTTGTACTG CCTCCGGGTT TTCCCTGAGC TCTTACTATA TGTCATGGGT GAGACAGGCT
CCCGGGAAAG GATTGGAATG GATCGGGATT ATCTCCTCCG GCTCTTCCAC CACTTTCACA
TGGTACGCCT CATGGGCAAA GGGGAGGTTT ACCATAAGCA AGACAAGCAC GACCGTGTAT
CTTCAGATGA ACTCCCTGAA GACGGAGGAT ACTGCCACCT ACTTTTGCGC TCGGGCCTAT
GTGGGCTCAA GCTCTTACTA TGGCTTCGAC CCATGGGGAC AGGGCACACT TGTGACCGTC
TCG

Figura 3

SEQ ID NO: 38 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 995.g1 anti-toxina A

GACGTCGTGA TGACACAGAG CCCTTCAACA CTGTCTGCAA GCGTGGGCGA TAGGGTCACC
ATAACGTGCC AGGCCTCTCA ATCCATCAAC AACTATTTTA GCTGGTACCA GCAGAAGCCA
GGCAAGGCTC CGAAACTTCT GATCTACGGA GCTGCCAACC TGGCAAGTGG CGTGCCATCA
CGGTTCAAGG GATCCGGGAG CGGTACTGAG TATACCCTGA CCATTTTCATC TCTCCAACCC
GACGATTTTCG CCACCTACTC CTGCCAGAAT AATTACGGCG TGCACATCTA TGGAGCTGCC
TTTGCGGGTG GGACAAAAGT GGAAATTAAG

SEQ ID NO: 40 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 995.g1 anti-toxina A

GAAGTTCAGC TGGTCGAGAG TGGGGGAGGG CTTGTGCAAC CTGGTGGCTC CCTCCGTCTG
AGCTGTACTG CTTCTGGATT CTCACTGAGC AATTACGACA TGATCTGGGT GCGACAGGCA
CCCGGCAAAG GACTGGAGTA CATTGGCTTC ATCAACACCG GGGGTATAAC GTACTATGCC
TCATGGGCTA AGGGGCGCTT TACAATTAGT AGGGATTCCCT CTACCGTGTA CCTGCAGATG
AACTCACTGA GAGCCGAGGA CACTGCCACA TATTTCTGCG CTCGGGTGGA TGACTATATC
GGGGCCTGGG GCGCCGGATT GTGGGGCCAA GGAACACTGG TCACCGTCTC G

SEQ ID NO: 48 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 997.g1 anti-toxina A

GCACTCGTGATGACACAGAGCCCGAGTAGCTTTAGTGCTTCAACCGGTGATAGGGTCACTATTACT
TGCCAAGCCTCTCAGAGTATATCTAGCTATCTGAGCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGGAAGGCTCCT
AAACTGCTGATCTACCGGGCTTCCACATTGGCCTCCGGCGTTCCCTCACGCTTTAGCGGCTCCGGA
TCCGGAACCGAGTACACCCTGACTATCTCTTGCCTGCAATCTGAGGACTTCGCAACCTACTATTGT
CTGGGCGTCTACGGATATAGCAACGATGACGGGATCGCCTTCGGCGGCGGTACCAAAGTGGAATT
AAG

Figura 4

SEQ ID NO: 50 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 997.g1 anti-toxina A

GAGGTGCAACTTGTGGAAAGCGGGGGAGGACTGGTGCAGCCTGGGGGCTCATTGAGACTGAGCTGC
ACCGTTTCTGGTATTGACCTGAGCTCCCATCATATGTGCTGGGTGCGCCAGGCACCCGAAAAGGA
CTGGAATACATCGGCGTCATATACTACTTTGGCTCTACATACTATGCCAACTGGGCAACTGGGCGA
TTCACAATTAGCAAGGACTCAACTACCGTTTACCTGCAAATGAATAGCCTGAGGGCTGAGGATACT
GCCACCTATTTCTGTGCCCGGGCTTCAATCGCCGGCTATTCTGCCTTTGATCCATGGGGGCAAGGA
ACACTCGTGACCGTCTCG

SEQ ID NO: 58 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1000.g1 anti-toxina A

GAAATCGTGA TGACGCAGTC ACCAAGCACA CTGAGCGCTT CTGTGGGAGA TCGGGTCACA
ATAACCTGTC AGGCCTCCCA GAGCATCTAC TCTTATCTGG CATGGTACCA GCAGAAGCCA
GGGAAAGCTC CCAAGCTGCT GATTTATGAC GCCAGCACTT TGGCTTCCGG TGTTCTTAGT
AGGTTCAAAG GCTCCGGAAG CGGTACCGAG TTTACCCTGA CCATCTCATC TCTGCAACCC
GATGACTTTG CCACATACTA TTGCCAGGGG AATGCCTACA CTTCCAACCT ACACGACAAC
GCATTTCGGG GAGGCACCAA AGTCGAAATT AAG

SEQ ID NO: 60 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1000.g1 anti-toxina A

GAAGTTCAGC TGGTCGAGAG CGGAGGGGGT TTGATTCAGC CCGGTGGCTC ACTTAGATTG
AGCTGCACCG TGTCCGGAAT CGATCTGTCA TCTGATGCCG TGGGCTGGGT GCGACAGGCA
CCTGGGAAAG GACTGGAGTA TATAGGGATC ATCGCCACCT TCGACTCCAC ATACTACGCT
AGCTGGGCAA AAGGGCGCTT TACGATTAGC AAGGCCTCCT CTACTACCGT GTACCTCCAA
ATGAACTCAC TGAGGGCCGA GGACACTGCC ACTTATTTCT GTGCTCGGAC CGGTAGCTGG
TACTACATCT CTGGCTGGGG CTCCTACTAT TATGGCATGG ACCTGTGGGG ACAGGGGACA
CTCGTGACCG TCTCG

Figura 5

SEQ ID NO: 68 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 926.g1 anti-toxina B

GATACCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCTACATTGTCACTGAGCCCCGGGGAGAGGGCCACATTGAGC
TGCCGGGCTTCAAAATCCGTGTCCACCCTCATGCACTGGTTTCAGCAAAGCCCGGGCAGGCCCCA
AAACTGCTGATCTACCTCGCATCTAACCTTGAATCTGGCGTGCCGGCCCGCTTTAGTGGCTCCGGA
AGCGGAACCGACTTCACACTGACGATTAGCTCCCTGGAGCCTGAGGATTTCCGCGTGTAATAATTGC
CAGCAAACCTTGAATGACCCTTGGACTTTCGGGGGCGGTACTAAGGTCGAAATAAAG

SEQ ID NO: 70 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 926.g1 anti-toxina B

GAGGTGGAAGTCTCGAATCTGGTGGTGGGCTGGTGCAGCCCGGTGGATCTCTGAGATTGTCATGC
GAGGCATCCGGCTTTACCTTTTCCAACCTACGGAATGGCCTGGGTGAGACAGGCCCCAACGAAGGGG
CTCGAATGGGTTACAAGCATCAGCTCTTCTGGGGGATCTACTTACTATCGCGATAGCGTCAAAGGC
CGGTTTACCATTAGCCGAGATAATGCCAAATCAAGCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCT
GAGGACACCGCCACATACTATTGTACAACCGTGATAAGGGGCTACGTGATGGACGCATGGGGACAG
GGGACATTGGTTACCGTCTCG

SEQ ID NO: 78 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 927.g2 anti-toxina B

GACACACAGA TGACCCAGAG CCCATCCACT TTGTCTGCAT CCGTGGGCGA CCGAGTGACA
ATCACCTGTA GAGCAAGCGG TTCCGTGAGC AACTGATGC ATTGGTACCA GCAGAAGCCT
GGGAAGGCTC CCAAGCTGCT GATCTACAAA GCCAGCAACC TTGCCTCCGG CGTTCCAAGC
CGGTTTAGCG GTTCCGGATC TGGAACCGAG TTCACCCTGA CCATATCAAG CCTGCAACCC
GACGACTTCG CCACCTACTA TTGCCACCAG AGCTGGAATA GCGACACGTT CGGGCAAGGC
ACAAGGCTGG AAATCAAA

SEQ ID NO: 80 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 927.g2 anti-toxina B

GAGGTGCAAC TTGTGGAAAG CGGAGGGGGC GTGGTCCAAC CCGGAAGAAG TCTCCGTCTT
TCTTGCGCCG CAAGTGGCTT CACCTTTTCC AACTACGGAA TGGCCTGGGT TCGACAAGCT
CCTGGGAAAG GATTGGAGTG GGTGGCCACT ATCAACTATG ACGGACGCAC GACACACTAC
CGAGACTCTG TTAAGGGGCG CTTTACGATT TCCCGCGACA ATAGCAAGAG CACCCTCTAC
CTGCAAATGA ATAGCCTCCG GGCCGAGGAT ACTGCTGTGT ACTATTGTAC CTCCATCTCA
CGGAGCCACT ACTTCGATTG CTGGGGACAA GGCACACTCG TGACTGTCTCG

Figura 6

SEQ ID NO: 88 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1099.g2 anti-toxina B

GACGTCCAGC TCACTCAATC TCCCTCCTTT CTGTCTGCTT CTGTGGGCGA TCGCGTGACA
ATAACCTGCA AGGCCTCCAA ATCAATTAGC AACCATCTGG CATGGTATCA GGAGAAGCCT
GGCAAAGCCA ATAAGCTGCT GATCCACTCC GGCTCAACTC TGCAATCCGG TACCCCAAGC
CGATTTAGCG GATCTGGGAG CGGAACCGAG TTCACACTTA CCATTAGCTC CCTGCAACCG
GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGCCAGCAA TACGACGAAT ACCCCTATAC GTTCGGCCAA
GGGACAAGAT TGGAAATCAA GCGTACG

SEQ ID NO: 90 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1099.g2 anti-toxina B

GAAGTTCAGC TGCAGGAATC TGGACCTGGC TTGGTGAAAC CAAGCGAGAC ACTTAGTCTC
ACTTGCACCG TTTCCGGCTT CTCCCTTCAA TCCTACACGA TCTCTTGGGT GCGGCAACCA
CCCGGGAAAG GACTGGAATG GATCGCAGCC ATTAGCGGGG GAGGGAGCAC CTATTACAAC
TTGCCTCTCA AGAGCCGCGT GACCATATCC CGTGACACAA GCAAGAGCCA GGTTTCCCTG
AAGCTGAGCT CCGTGACTGC TGCCGATACG GCTGTTTACT ATTGCACCCG ACCTCGCTGG
TATCCCCGTT CCTATTTCGA CTACTGGGGA AGAGGCACAC TGGTTACCGT CTCG

SEQ ID NO: 98 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1102.g4 anti-toxina B

AACATCGTGC TGACACAGTC TCCTGCAACC CTTTCACTGT CTCCAGGTGA ACGAGCAACC
CTGAGTTGTA GAGCCAGTCA GAGGATCTCC ACGAGCATTC ACTGGTATCA GCAAAAGCCT
GGGCAAGCTC CCAGACTCTT GATCAAGTAC GCCTCTCAGA GCATAAGTGG CATTCCAGCT
AGGTTTAGCG GCTCAGGCTC AGGAACAGAC TTCACTCTGA CCATCAGCTC CCTGGAACCG
GAGGACTTTG CCGTCTATTA CTGCCAGCAA TCCTACTCCA GTCTGTACAC CTTCGGGCAG
GGTACTAAAC TGGAGATAAA G

Figura 7

SEQ ID NO: 100 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1102.g4 anti-toxina B

GAAGTGCAGC TGGTCGAATC CGGGGGAGGT TTGGTGCAAC CAGGTGGCTC ACTGAGACTG
AGCTGTGCCG TTTCCGGCTT TACGTTCTCA GACAGTTATA TGGCCTGGGT GCGTCAAGCA
CCTGGAAAAG GGCTGGAGTG GATTGCCAGT ATCAGCTATG GTGGGACCAT AATCCAGTAC
GGCGATAGCG TCAAGGGCAG GTTTACTATC TCCAGGGACA ACGCCAAGTC AAGCCTTTAC
CTGCAGATGA ATTCTCTCCG CGCAGAGGAT ACCGCTGTGT ATTACTGCGC TAGACGGCAG
GGAACCTACG CTCGATACCT GGACTTCTGG GGTCAGGGAA CACTCGTTAC AGTCTCG

SEQ ID NO: 108 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1114.g2 anti-toxina B

GCGACGCAAA TGACTCAGTC GCCCTCATCG CTTAGCGCGT CCGTCGGAGA TAGAGTGACG
 ATCACCTGCC GCGCATCAGA GTCGGTGTCC AACTCCTCC ACTGGTATCA GCAGAAACCG
 GGGAAAGGCAC CAAAACTCTT GATCTACAAA GCCAGCAACC TTGCGTCCGG TGTCCCGTCA
 AGGTTCTCCG GGAGCGGTTC GGGGACAGAC TTTACTTTGA CCATTTTCGTC GCTTCAGCCG
 GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGTCATCAG TCATGGAAC CACCTCCCAC ATTTGGCCAG
 GGAACGAAAC TCGAAATCAA G

SEQ ID NO: 110 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1114.g2 anti-toxina B

GAAGTACAAC TCGTAGAGTC AGGGGGTGGG CTGGTCCAAC CTGGCGGCTC CCTTCGGCTT
 TCGTGTGCCG CCTCGGGATT CACGTTTAGC AATTACGGTA TGGCCTGGGT GAGGCAGGCA
 CCAGGGAAGG GTCTTGAGTG GGTAGCGATC ATCAACTATG ATGCAAGCAC CACCCACTAC
 AGGGATAGCG TCAAGGGACG CTTTACTATC AGCCGGGATA ATGCGAAATC CTCGCTCTAT
 CTGCAGATGA ACTCCCTCAG AGCCGAGGAC ACCGCAGTGT ACTATTGCAC ACGATACGGA
 CGCTCGCACT ATTTGACTA TTGGGGACAG GGGACGCTCG TAACTGTCTC G

Figura 8

SEQ ID NO: 118 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1114.g8 anti-toxina B

GACACGGTCC TGACTCAGTC GCCCTCATCG CTTAGCGCGT CCGTCGGAGA TAGAGTGACG
 ATCACCTGCC GCGCATCAGA GTCGGTGTCC AACTCCTCC ACTGGTATCA GCAGAAACCG
 GGGAAAGGCAC CAAAACTCTT GATCTACAAA GCCAGCAACC TTGCGTCCGG TGTCCCGTCA
 AGGTTCTCCG GGAGCGGTTC GGGGACAGAC TTTACTTTGA CCATTTTCGTC GCTTCAGCCG
 GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGTCATCAG TCATGGAAC CACCTCCCAC ATTTGGCCAG
 GGAACGAAAC TCGAAATCAA G

SEQ ID NO: 120 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1114.g8 anti-toxina B

GAAGTACAAC TCGTAGAGTC AGGGGGTGGG CTGGTCCAAC CTGGCGGCTC CCTTCGGCTT
 TCGTGTGCCG CCTCGGGATT CACGTTTAGC AATTACGGTA TGGCCTGGGT GAGGCAGGCA
 CCAGGGAAGG GTCTTGAGTG GGTAGCGATC ATCAACTATG ATGCAAGCAC CACCCACTAC
 AGGGATAGCG TCAAGGGACG CTTTACTATC AGCCGGGATA ATGCGAAATC CTCGCTCTAT
 CTGCAGATGA ACTCCCTCAG AGCCGAGGAC ACCGCAGTGT ACTATTGCAC ACGATACGGA
 CGCTCGCACT ATTTGACTA TTGGGGACAG GGGACGCTCG TAACTGTCTC G

SEQ ID NO: 128 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1125.g2 anti-toxina B

GATATACAAA TGACTCAGAG CCCTAGCTCA CTGAGCGCTT CTGTGGGCGA TCGTGTGACA
 ATCACTTGCA AAGCAAGCCA GAACATCTAT ATGTACCTGA ATTGGTACCA GCAAAAACCG
 GGAAAAGCTC CCAAGCGCCT GATTTACAAC ACCAATAAGC TGCATACCGG CGTGCCAAGC
 CGTTTTAGCG GATCTGGCTC TGGAAACGAA TATACACTGA CCATAAGCTC CCTGCAACCG
 GAAGACTTTG CAACTTACTA TTGCCTCCAG CACAAATCCT TCCCCTATAC GTTCGGACAA
 GGGACCAAC TGGAAATCAA A

SEQ ID NO: 130 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1125.g2 anti-toxina B

GAAGTGCAGC TGGTCGAAAG CGGCGGAGGA TTGGTGCAAC CTGGTGGCTC TCTTCGCCTG
 TCTTGCGCTG CAAGCGGCTT TACGTTCCGC GATAGCTTTA TGGCTTGGGT GCGACAAGCT
 CCTGGGAAAG GGCTGGAATG GGTCGCTAGC ATAAGCTACG AAGGCGACAA GACTTACTAT
 GGGGACTCTG TGAAAGGCCG ATTCACCATT AGCCGAGACA ACGCAAAGAA CTCCCTGTAC

CTGCAGATGA ACTCCCTGCG TGCCGAAGAT ACCGCCGTGT ACTATTGCGC TAGGCTGACG
ATCACTACAA GCGGAGATAG CTGGGGACAA GGGACAATGG TGACCGTCTC GAGC

SEQ ID NO: 138 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1129.g1 anti-toxina B

GACACCCAGA TGA CTCAGTC TCCGTCAAGC CTTTCTGCCT CTGTTGGAGA TCGAGTCACA
ATTACGTGCA AGGCAAGCCA ACACGTGGGT ACCAACGTGG ACTGGTATCA ACAGAAGCCA
GGGAAGGTCC CCAA ACTGCT GATCTACGGT GCCAGTATTC GCTATAACCG CGTGCCTGAT
CGCTTCACCG GAAGCGGGTC AGGGACCGAT TTCACACTGA CAATCAGCTC CCTGCAACCT
GAAGACGTGG CTACTTACTA CTGCCTGCAG TACA ACTATA ATCCCTACAC CTTTGGCCAG
GGCACCAAAC TGGAGATAAA G

SEQ ID NO: 140 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1129.g1 anti-toxina B

GAGGTGCAAC TTGTGGAATC AGGAGGTGGC GTGGTTCAGC CCGGTAGATC ACTTCGTCTG
AGTTGTGCAA CAAGCGGCTT TATCTTCTCC AACTTCGGGA TGTCTTGGGT TAGACAGGCT
CCTGGTAAGG GCCTCGAATG GGTGGCTAGT ATTAGCCCAA GCGGGGGAAA CGCCTACTAT
AGGGACAGCG TGAAAGGACG CTTCACTATC AGCCGAGATA ACTCCAAGAC CACGCTGTAT
CTGCAGATGA ATAGTCTGAG GGCCGAGGAT ACCGCAGTGT ACTACTGCAC TCGACGGGCC
TATTCTTCCC CTTTTGCCTT TTGGGGACAG GGGACTCTGG TGACAGTCTC GAGC

Figura 9

SEQ ID NO: 148 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1134.g5 anti-toxina B

GACGTCCAGC TCACTCAATC TCCCTCCTTT CTGTCTGCTT CTGTGGGCGA TCGCGTGACA
ATAACCTGCA AGGCCTCCAA ATCAATTAGC AACCATCTGG CATGGTATCA GGAGAAGCCT
GGCAAAGCCA ATAAGCTGCT GATCCACTCC GGCTCAACTC TGCAACCCGG TACCCCAAGC
CGATTTAGCG GATCTGGGAG CGGAACCGAG TTCACACTTA CCATTAGCTC CCTGCAACCG
GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGCCAGCAA TACGACGAAT ACCCCTATAC GTTCGGCCAA
GGGACAAGAT TGGAAATCAA G

SEQ ID NO: 150 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1134.g5 anti-toxina B

GAAGTTCAGC TGCAGGAATC TGGACCTGGC TTGGTGAAAC CAAGCGAGAC ACTTAGTCTC
ACTTGCAACCG TTTCCGGGCTT CTCCCTTAAT TCCTACACGA TCACTTGGGT GCGGCAACCA
CCCGGGAAAG GACTGGAATG GATCGCAGCC ATTAGCGGGG GAGGGAGCAC CTATTTCAAC
TCGGCTCTCA AGAGCCGCGT GACCATATCC CGTGACACAA GCAAGAGCCA GGTTTCCCTG
AAGCTGAGCT CCGTGACTGC TGCCGATACG GCTGTTTACT ATTGCACCCG ACCTCGCTGG
TATCCCCGTT CCTATTTCTGA CTACTGGGGA AGAGGCACAC TGGTTACCGT CTCG

SEQ ID NO: 158 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1151.g4 anti-toxina B

GCGATTCAAA TGA CTCAGTC GCCCTCATCG CTTAGCGCGT CCGTCGGAGA TAGAGTGACG
ATCACGTGCA AAGCATCACA AAATGTCGGG AACAAATGTGG CATGGTATCA GCATAAACCG
GGGAAGGCAC CAAA ACTCTT GATCTACTAC GCCAGCAACA GGTTTACTGG TGTCCCGTCA
AGGTTACACG GAGGGGGTTA CGGGACAGAC TTTACTTTGA CCATTTCTGTC GCTTCAGCCG
GAGGACTTCG CCACCTATTA CTGTCAGAGG GTCTACCAGT CAACGTGGAC ATTTGGCCAG
GGAACGAAAG TGGAAATCAA G

Figura 10

SEQ ID NO: 160 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1151.g4 anti-toxina B

GAAGTACAAC TCCAAGAGTC GGGGCCTGGT CTGGTCAAGC CGTCCGAAAC ACTTTCGCTG
ACGTGTACGG TATCAGGATT CTCACCTACA TCATACTACG TCCACTGGGT GAGGCAGCCA
CCCGGGAAGG GTCTTGAGTG GATGGGCTGC ATTAGAACCG GAGGGAATAC CGAGTACCAG
AGCGAATTTA AGAGCCGCGT CACTATCAGC CGGGATACGT CCAAAAACCA GGTGTCGCTC
AAATTGTCCT CCGTGACGGC CGCTGACACC GCAGTGTACT ATTGCGCGCG AGGAAACTAT
GGCTTTGCGT ATTGGGGACA GGGGACGCTC GTAACGTCT CG

SEQ ID NO: 168 secuencia polinucleotídica que codifica la región VL del anticuerpo 1153.g8 anti-toxina B

GATATACAGA TGA CTCAGTC CCCTTCTAGC CTTTCAGCTT CCGTGGGCGA TAGAGTGACT
ATCACGTGTA AGGCTAGTCA GAACATTAAC AAGTATCTGG ACTGGTACCA GCAGAAACCC
GGGAAGGTTT CCAAGCTGCT GATCTACAAC ATCCAGTCCC TGCATACAGG CATTCCTAGC
CGGTTTAGCG GATCTGGTTC AGGGACCGAC TTCACCCTGA CAATCAGCTC TCTGCAACCA
GAAGACGTGG CCACCTATTA CTGCTTCCAG CACAATAGTG GCTGGACTTT TGGACAAGGT
ACCAGGCTGG AGATCAAA

SEQ ID NO: 170 secuencia polinucleotídica que codifica la región VH del anticuerpo 1153.g8 anti-toxina B

GAGGTTTCAGC TGGTGGAATC AGGAGGGGGT CTGGTGCAAC CAGGAGGCTC CCTGAAACTG
TCTTGCGCCG CAAGCGGCTT TACGTTTACC CAGGCCGCTA TGTTCTGGGT TAGGCAGGCC
AGTGGGAAGG GTCTTGAAGG CATCGCAAGA ATCAGCACCA AGAGCAACAA TTTCGCTACG
TACTATCCGG ACTCCGTGAA AGGCCGTTTT ACCATTTCTC GCGATGACAG CAAGAACACC
GTGTACCTGC AGATGAACAG TCTCAAGACC GAGGACACAG CCGTGTACTA TTGTACTGCT
CCCGCCTATT ATTACGATGG CACAGTGCCT TTCGCATACT GGGGACAGGG
TACTTTGGTG ACTGTCTCG

Figura 11
Valoraciones cuantitativas de 4 conejos inmunizados con el toxoide TcdA y 5 ratas inmunizadas con el dominio de unión de TcdB (TcdB1234). Datos ELISA generados usando la toxina TcdA o el dominio de unión de TcdB recubierto en una placa ELISA

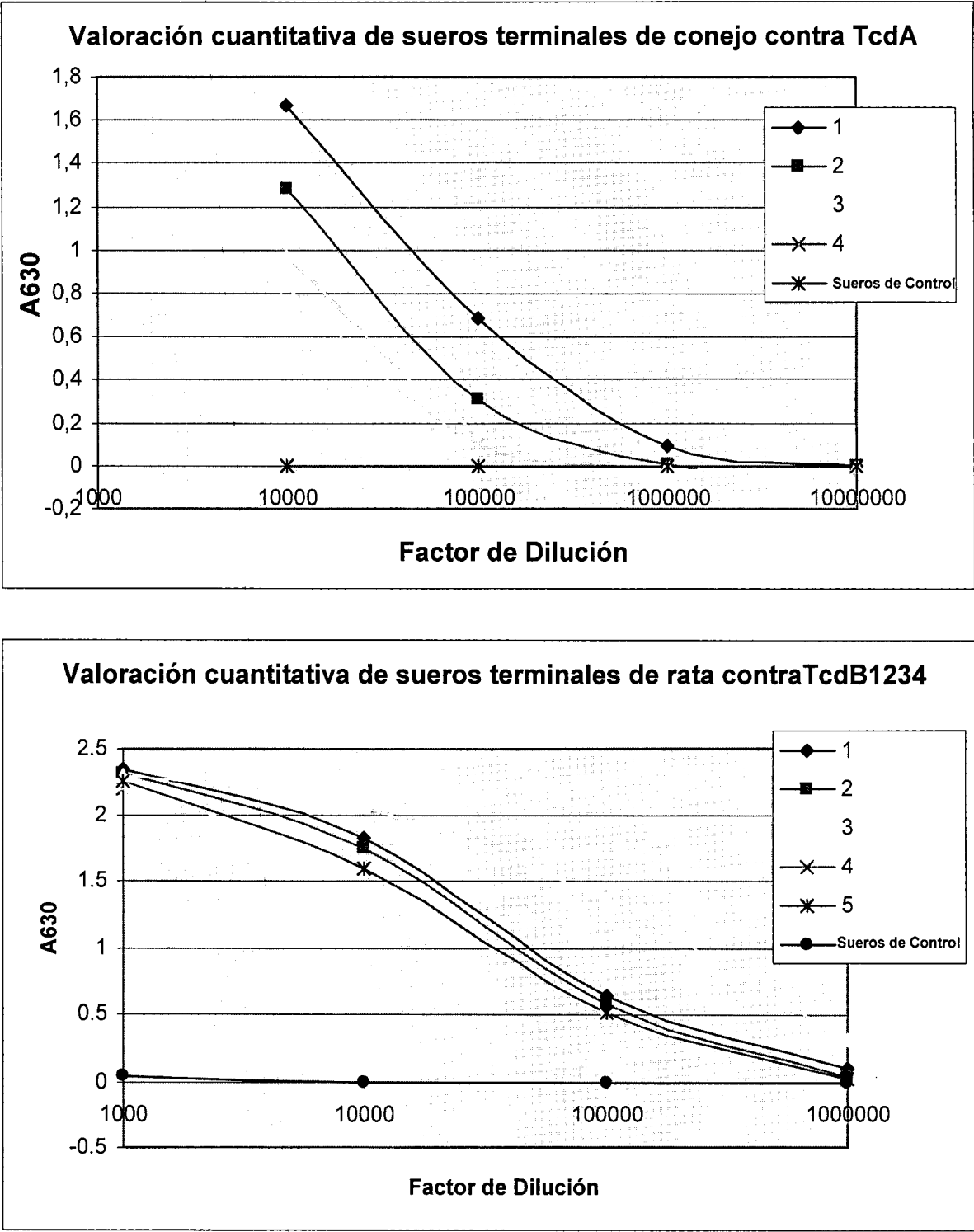
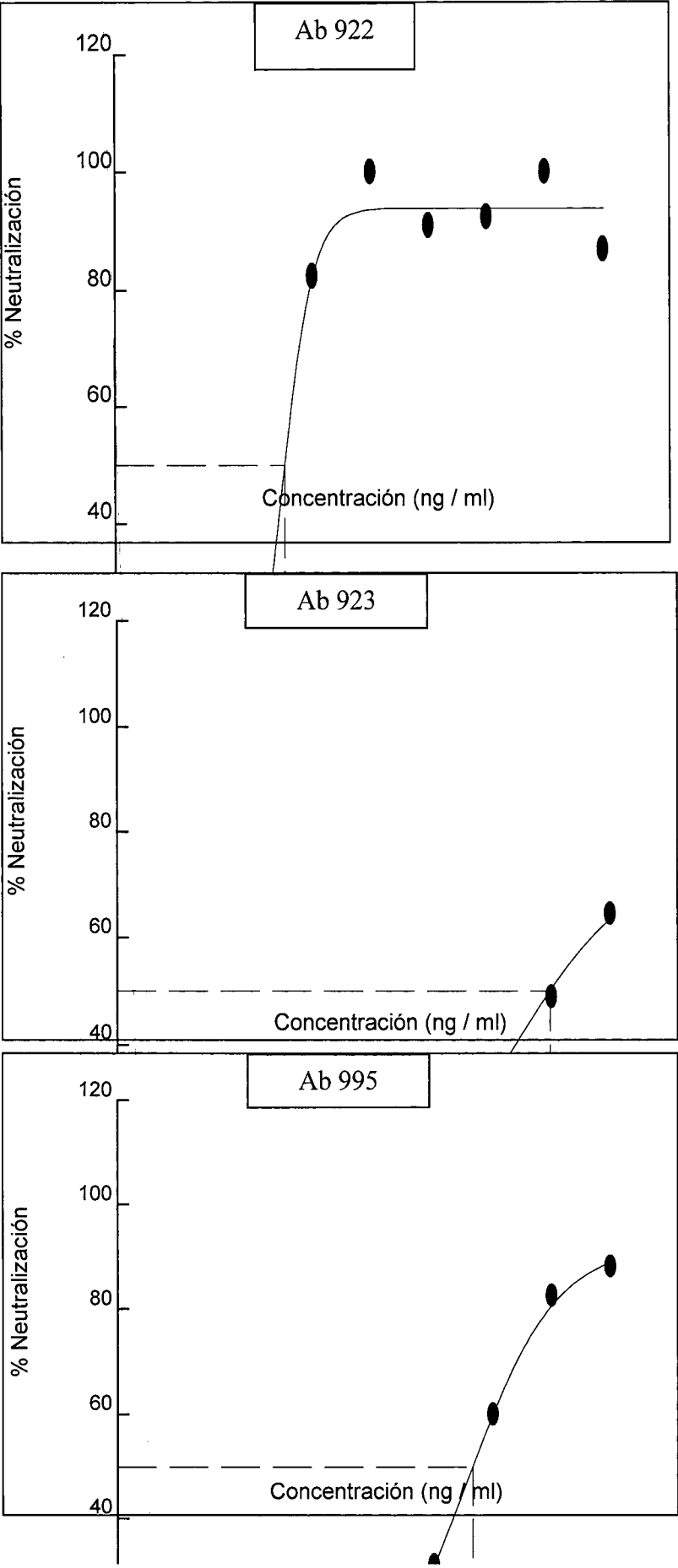


Figura 12 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)



107

Figura 13 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

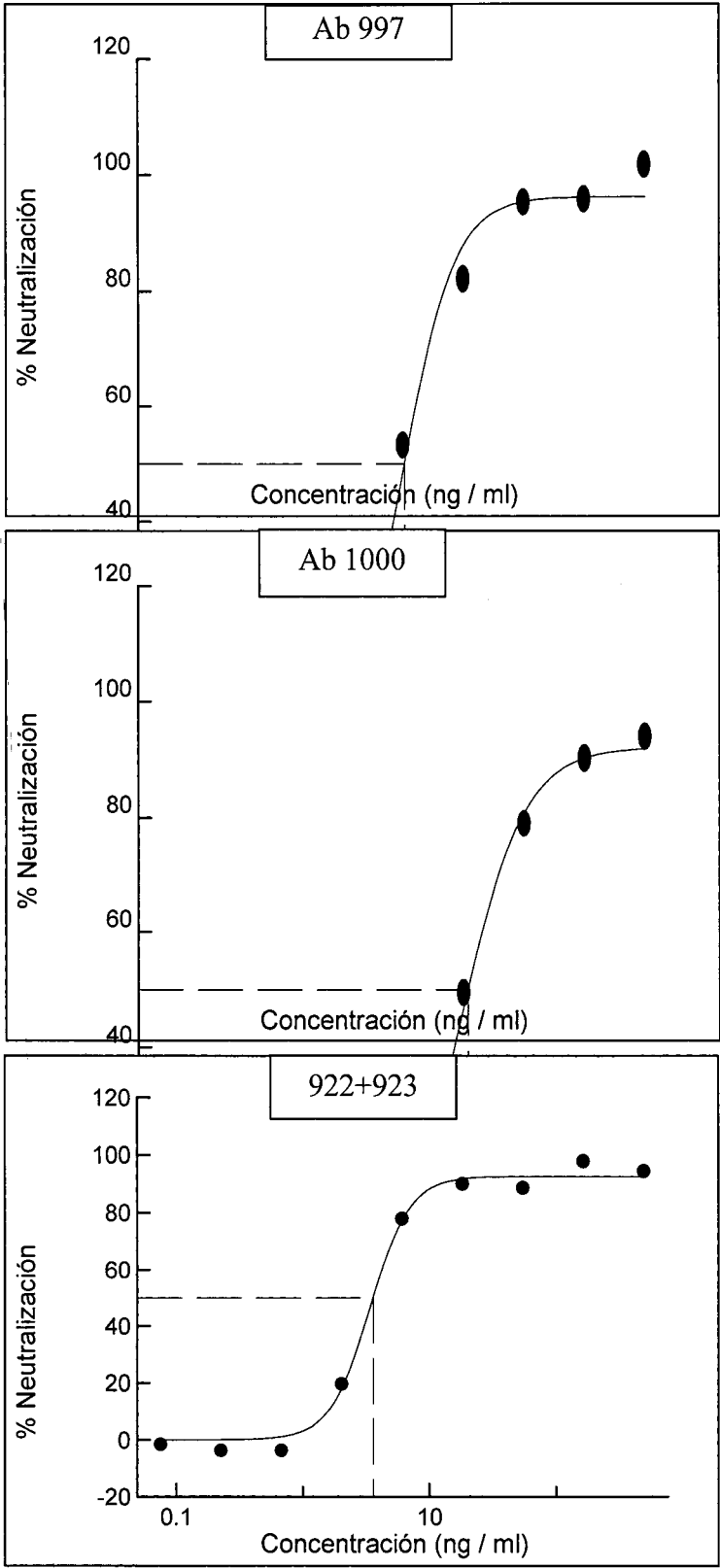


Figura 14 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs pareados (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

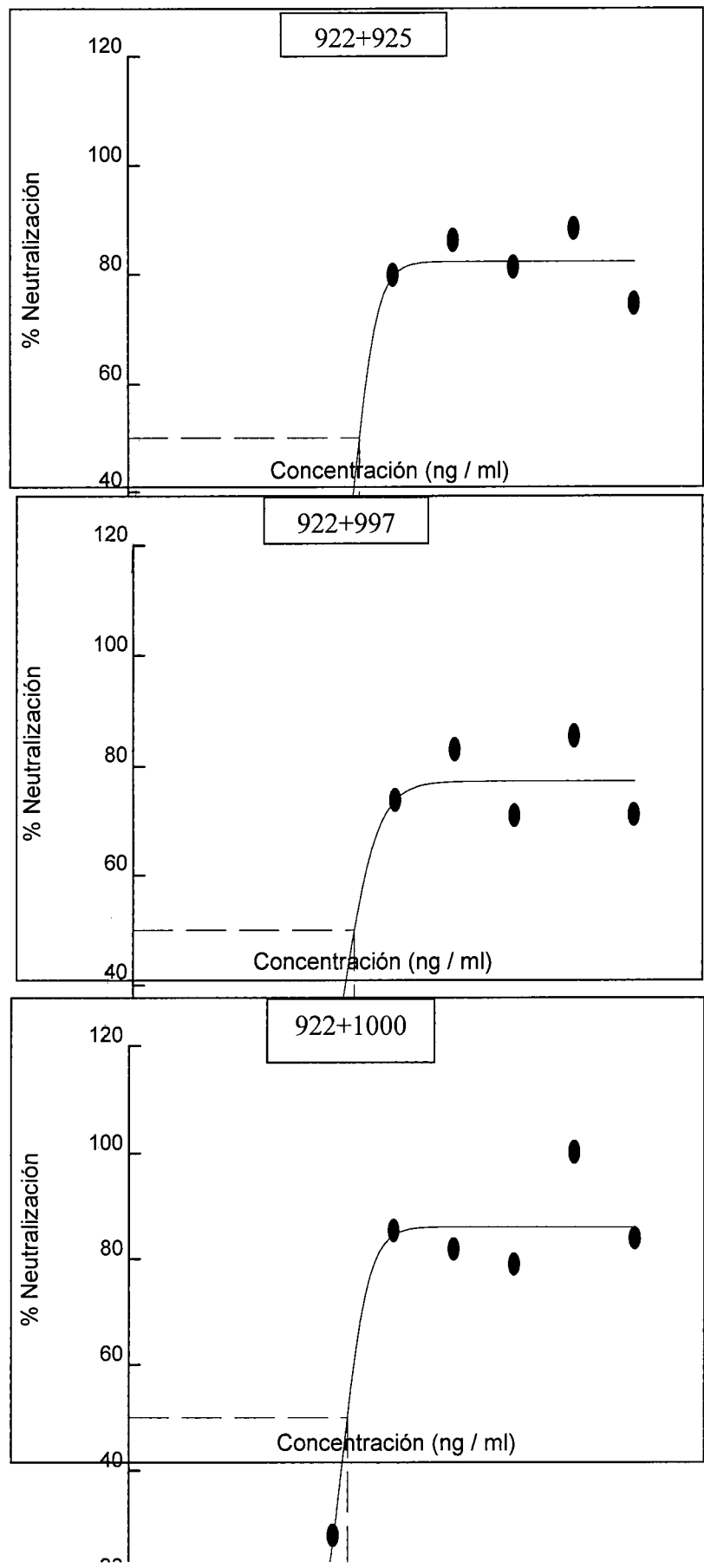
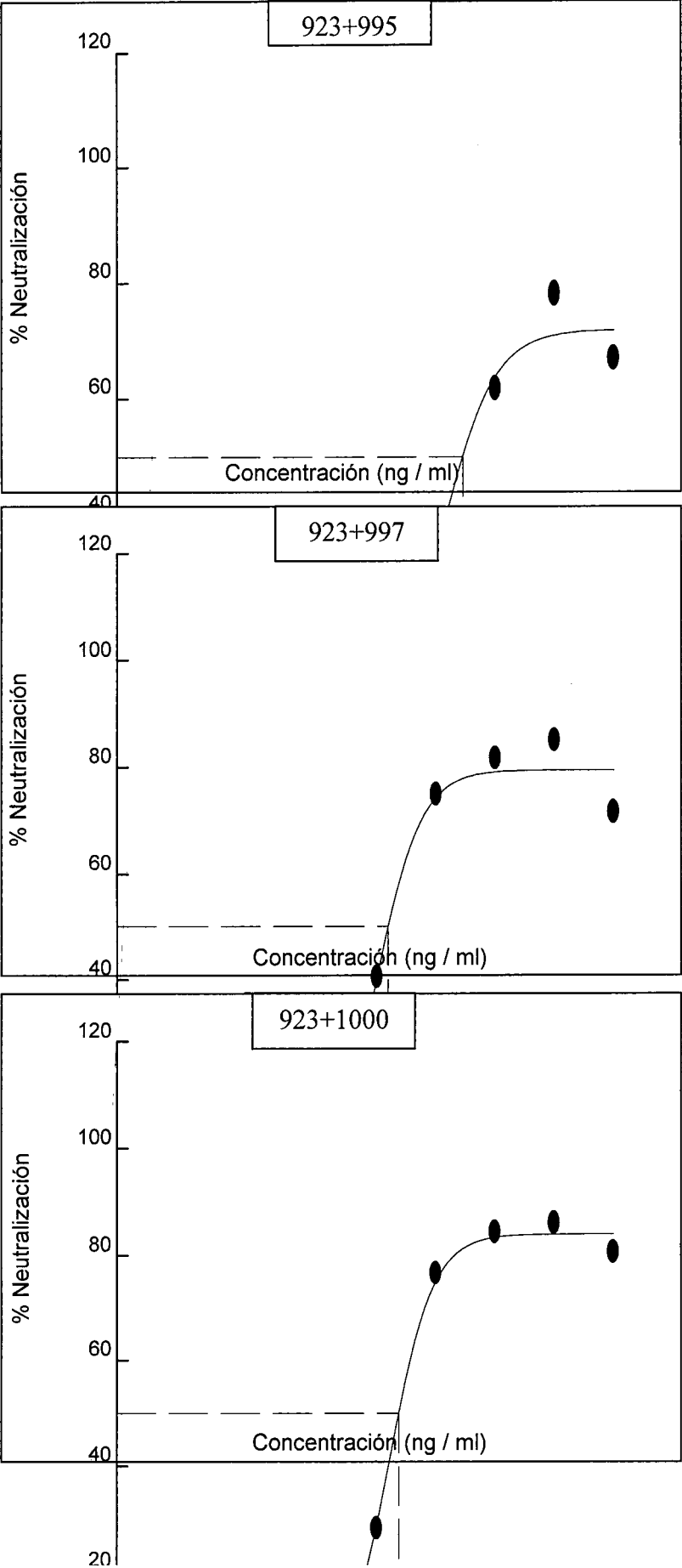


Figura 15 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs pareados (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)



110
HH

Figura 16 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

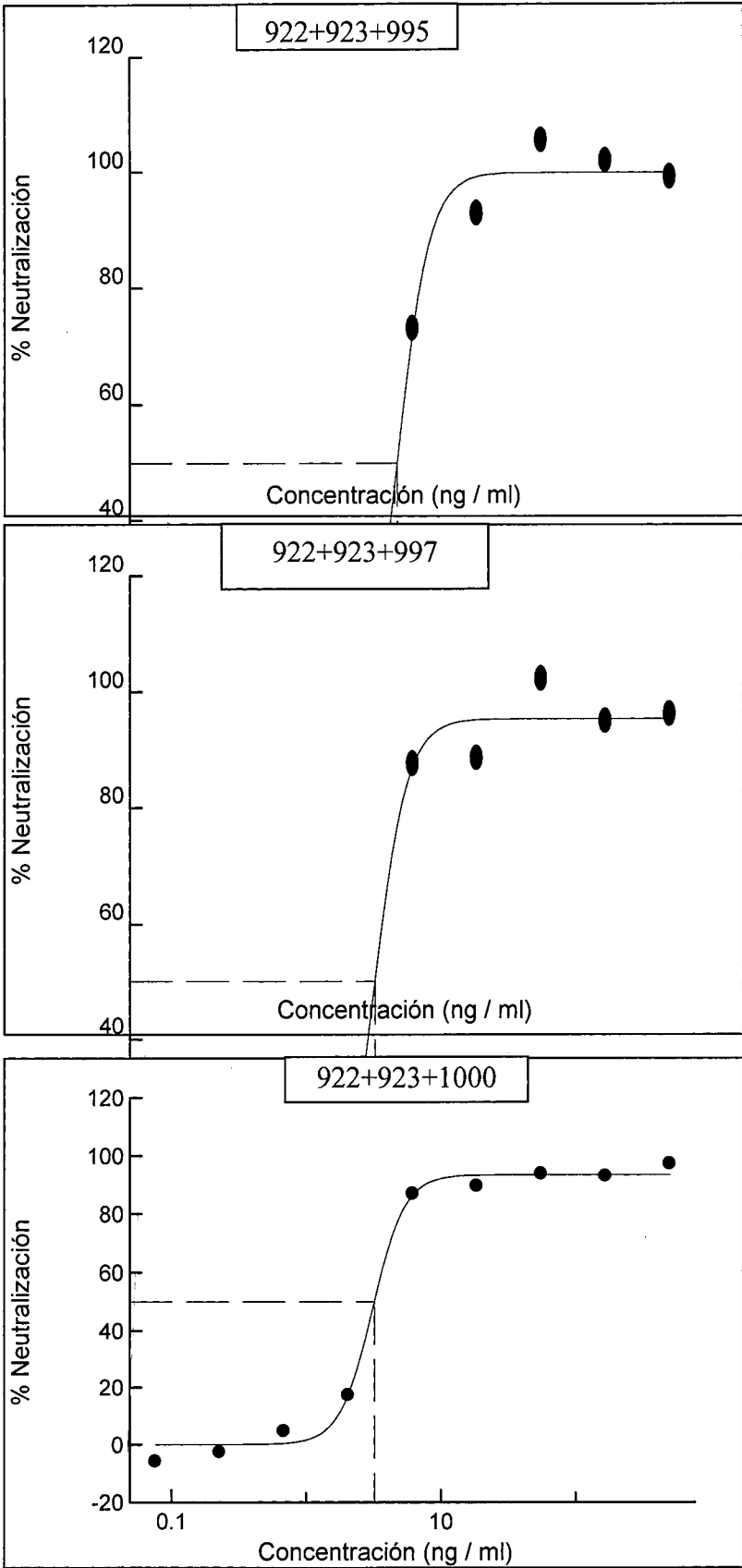


Figura 17 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

111
112

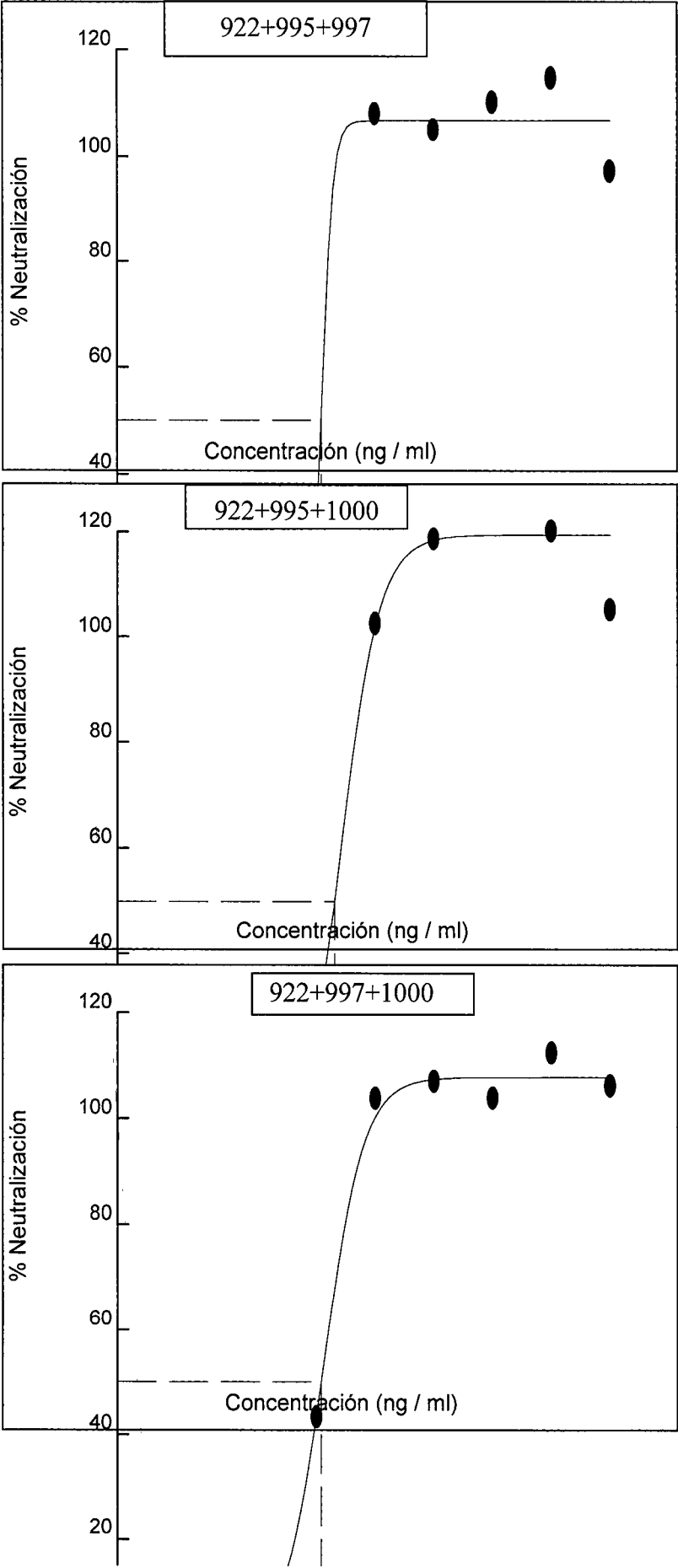


Figura 18 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

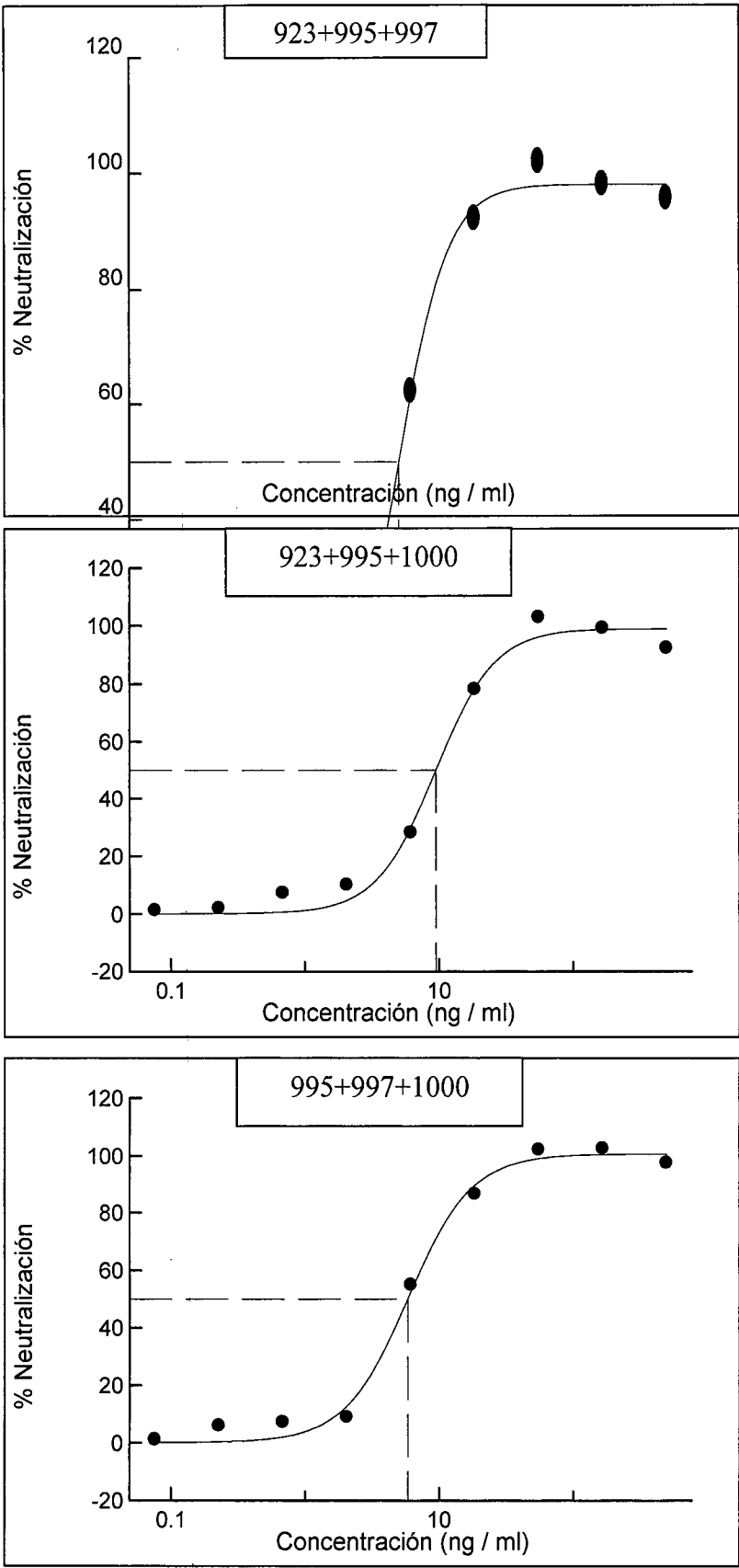


Figura 19 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de cuatro y cinco Mab (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

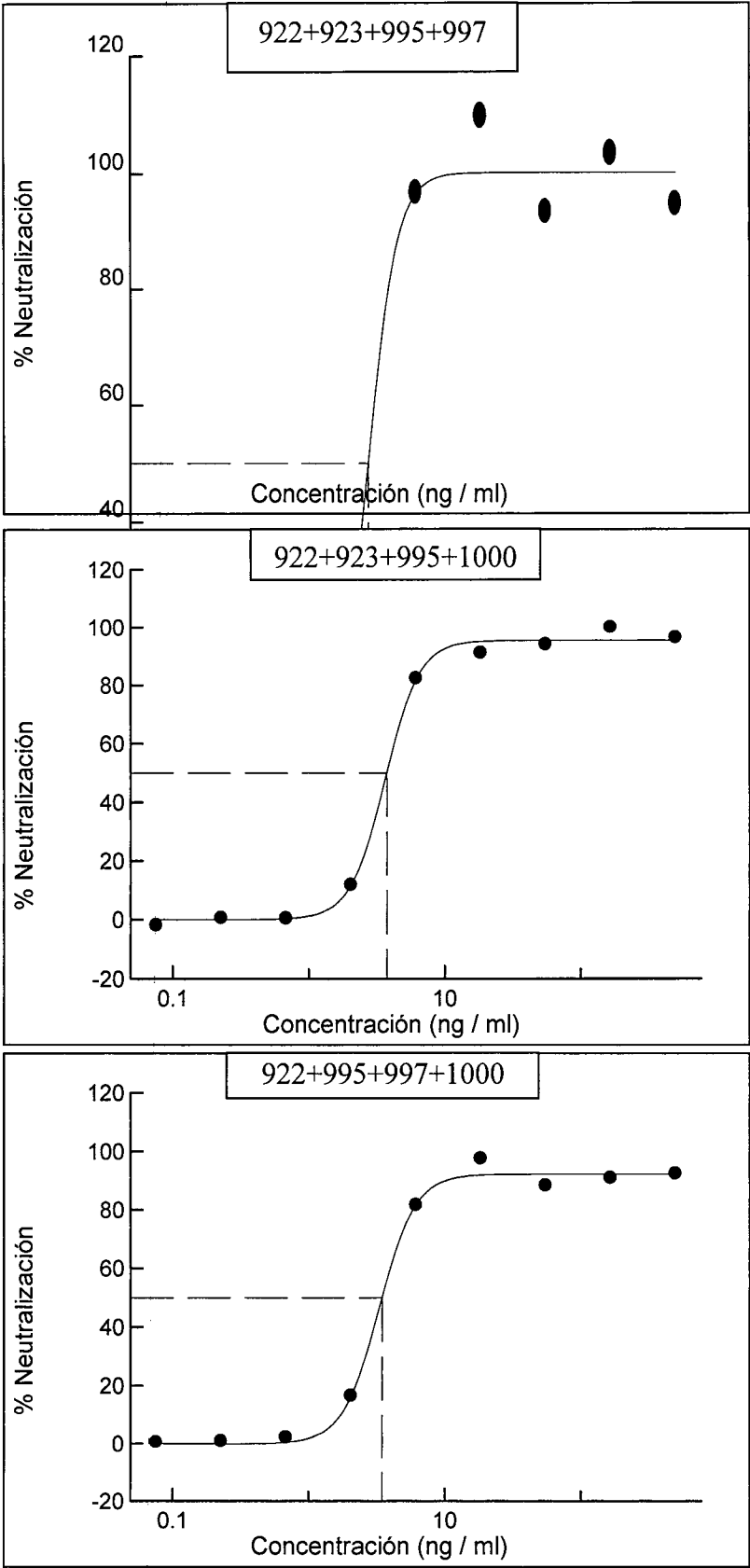


Figura 20 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para mezclas de cuatro y cinco Mab (eje X concentración (ng/ml) y eje Y % de neutralización)

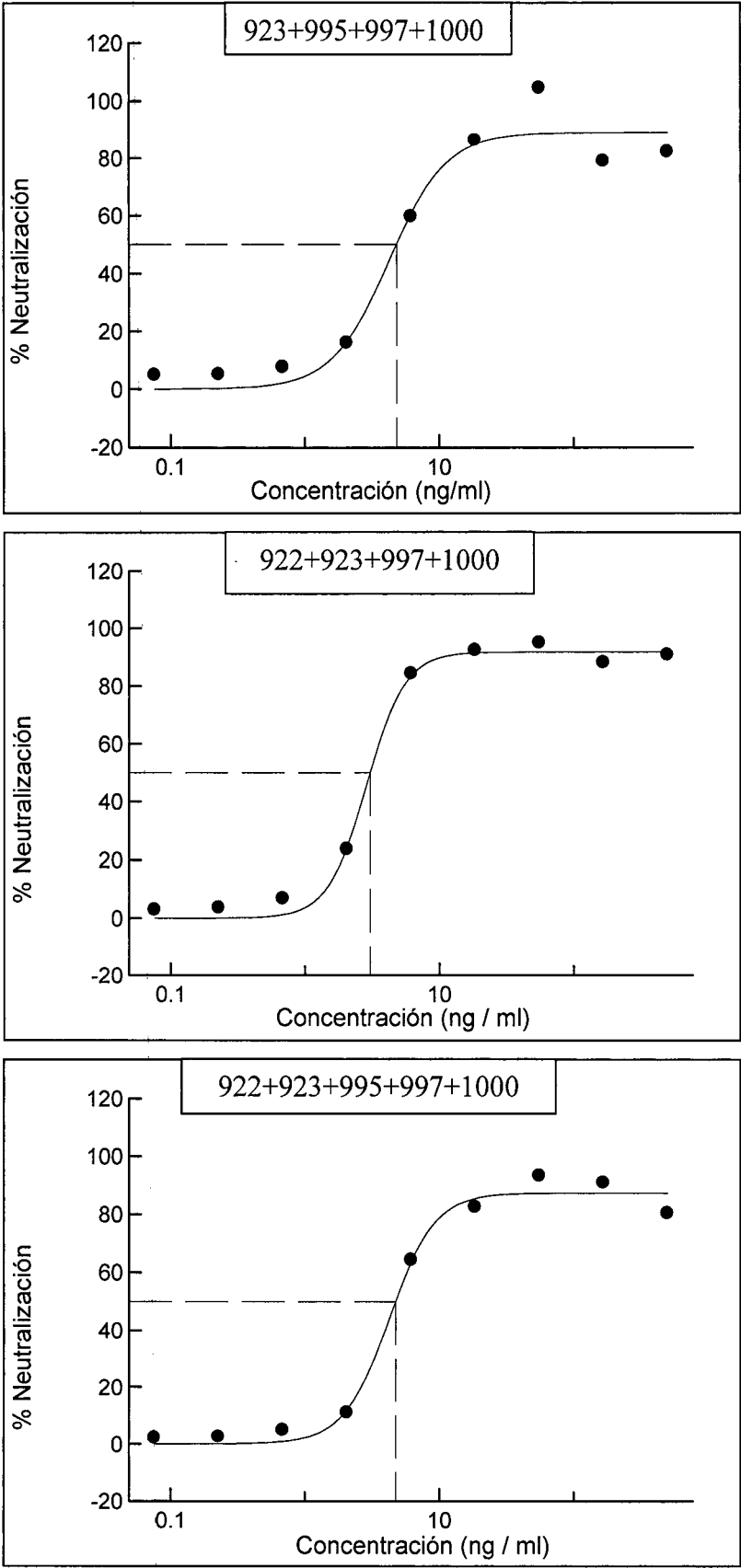


Figura 21 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales y pareados con diferentes concentraciones de TcdA (eje X es concentración ng/ml)

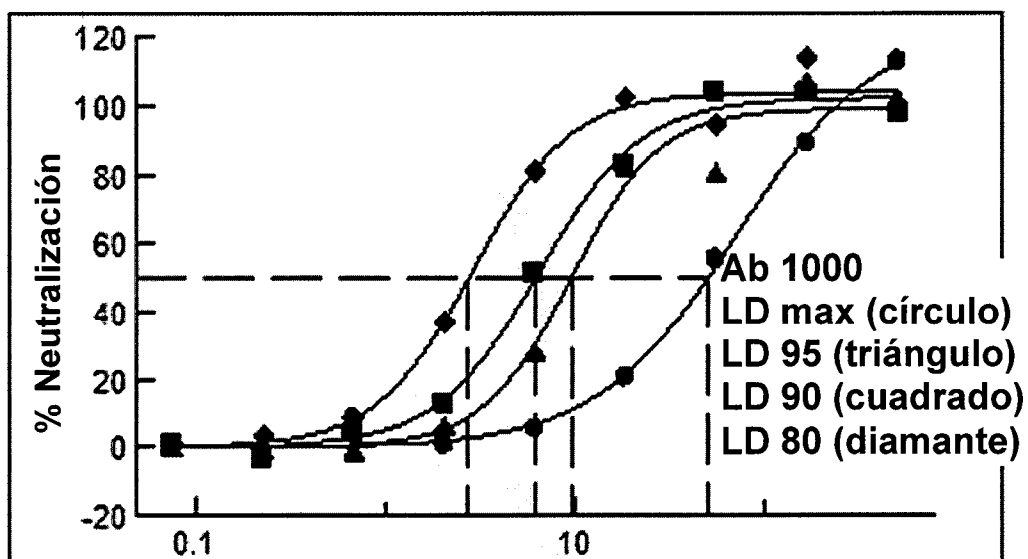
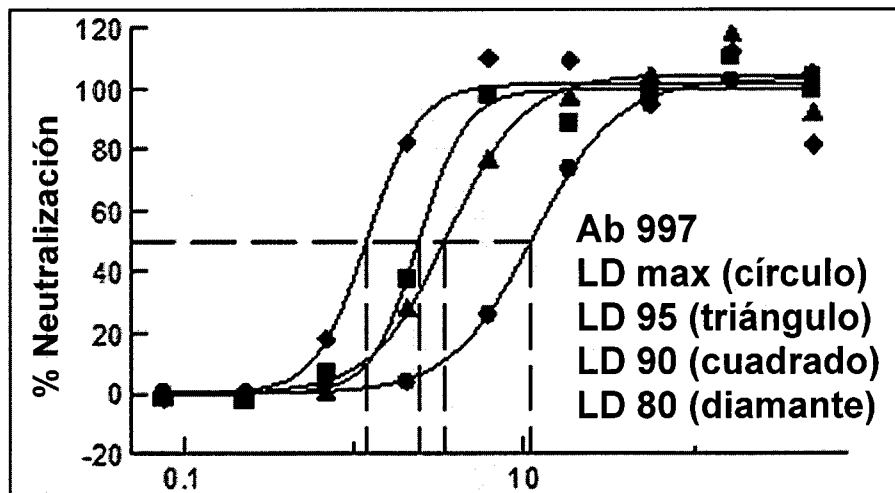
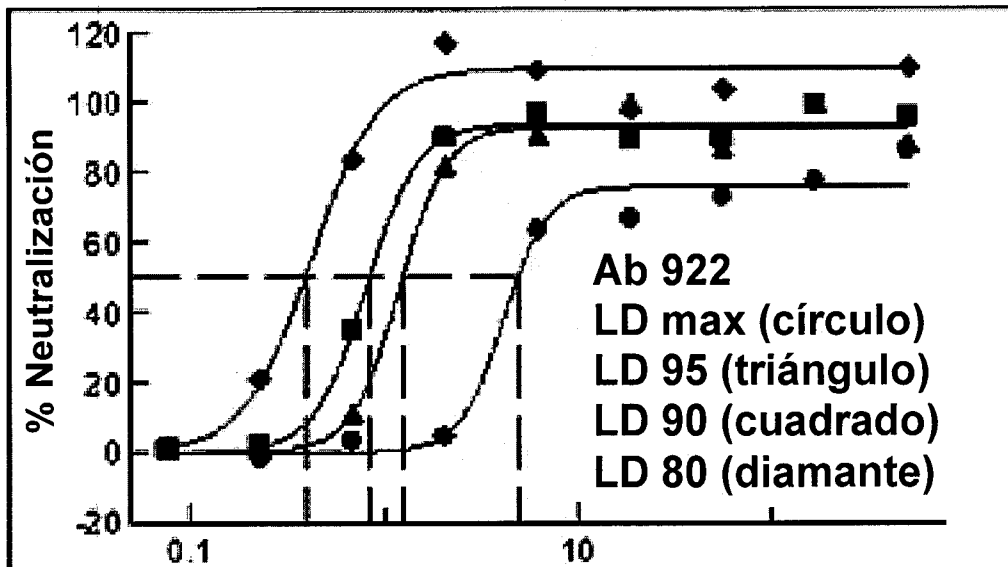


Figura 22 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mabs individuales y pareados con diferentes concentraciones de TcdA (eje X es concentración ng/ml)

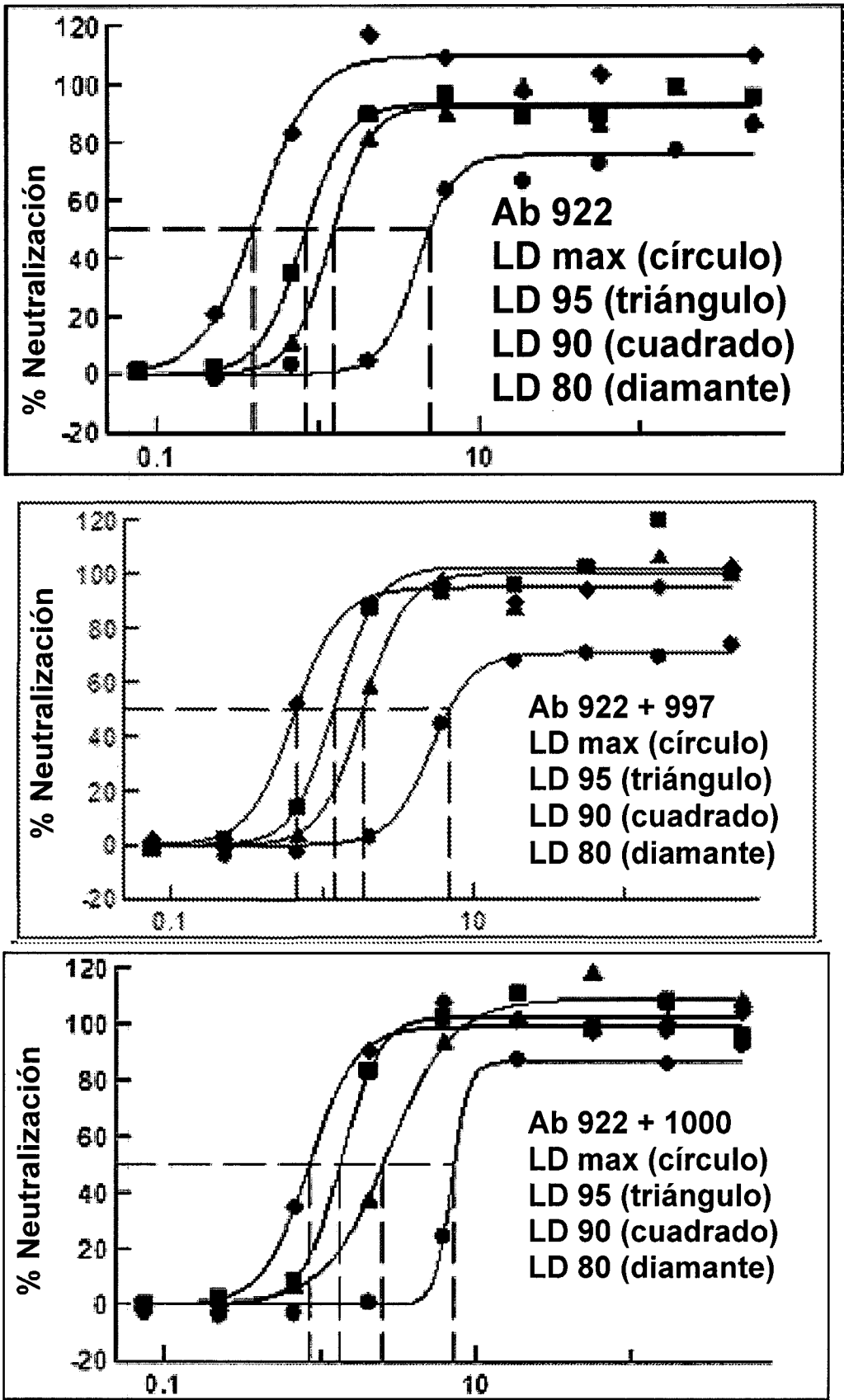


Figura 23 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mab individuales y mezclas de cinco Mab con diferentes concentraciones de TcdA (eje X concentración ng/ml)

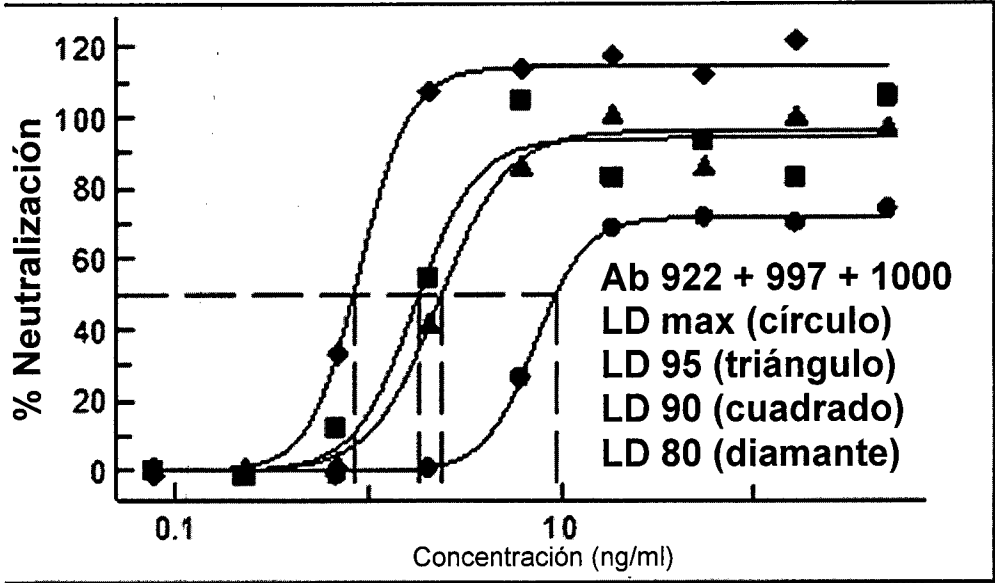
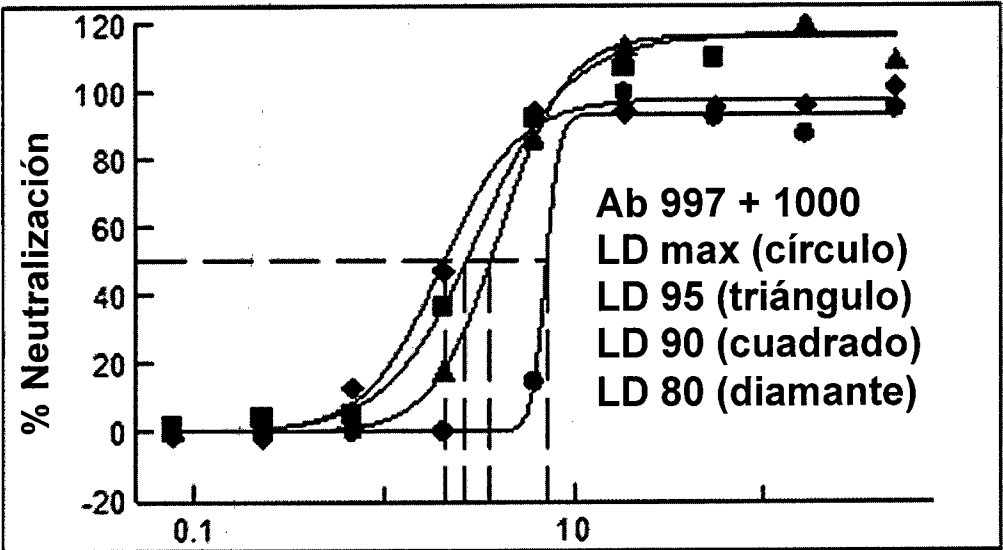
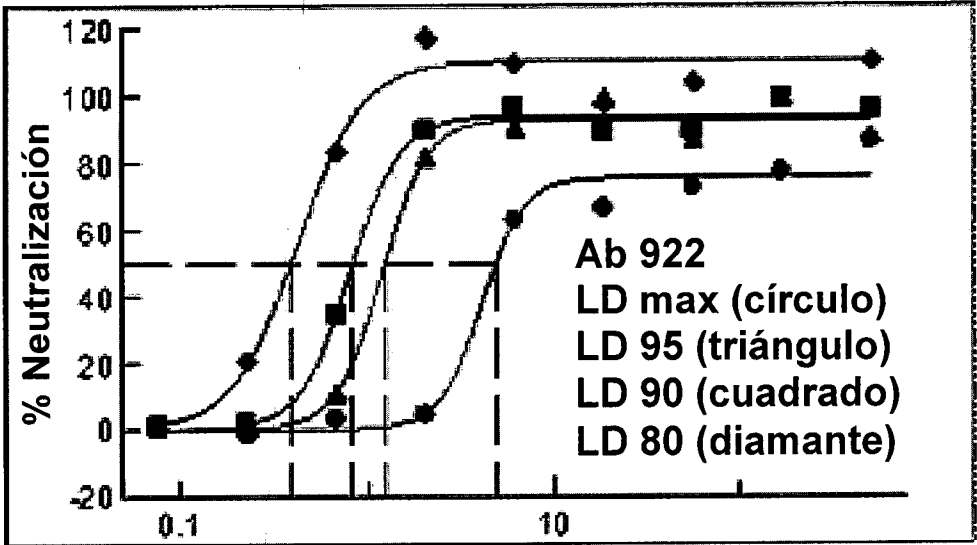


Figura 24 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdA (ribotipo 003) para Mab individuales y mezclas de cinco Mab con diferentes concentraciones de TcdA (eje X es concentración ng/ml)

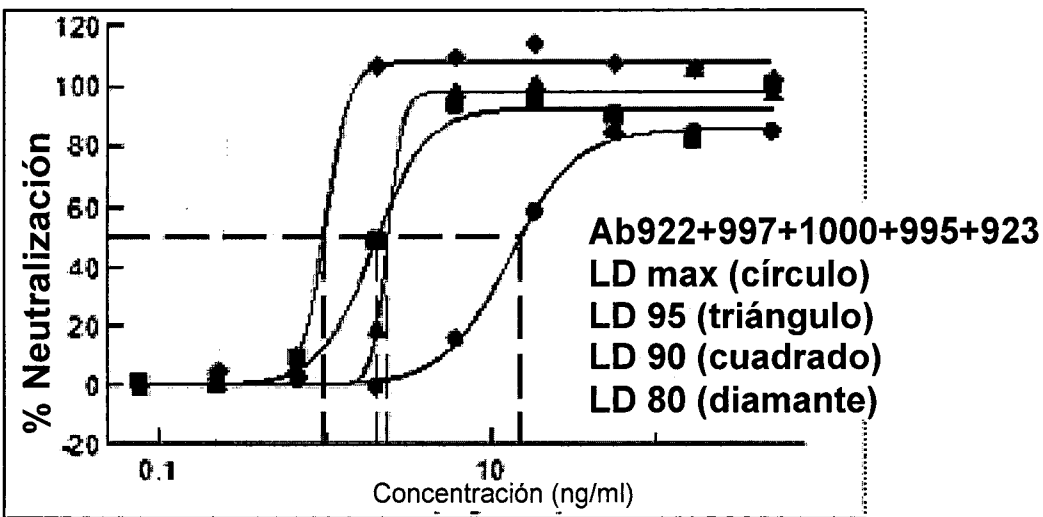
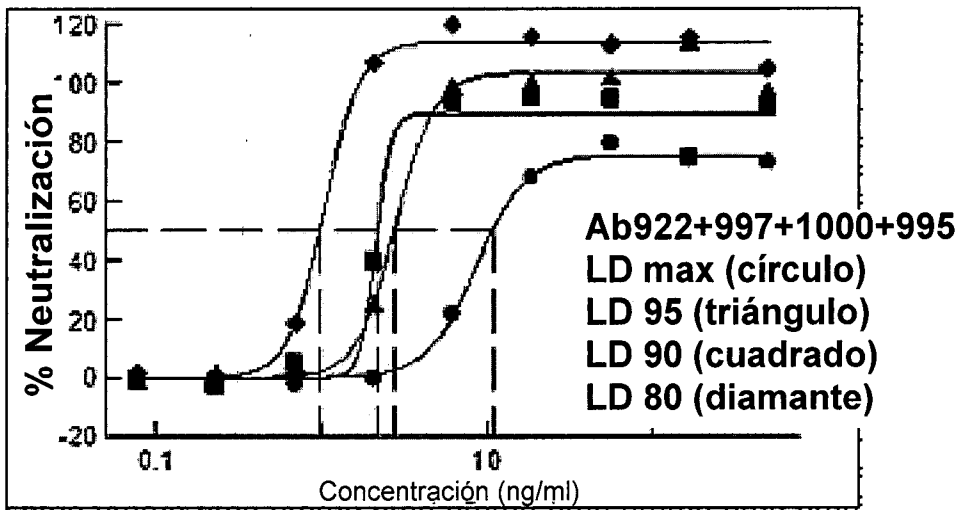
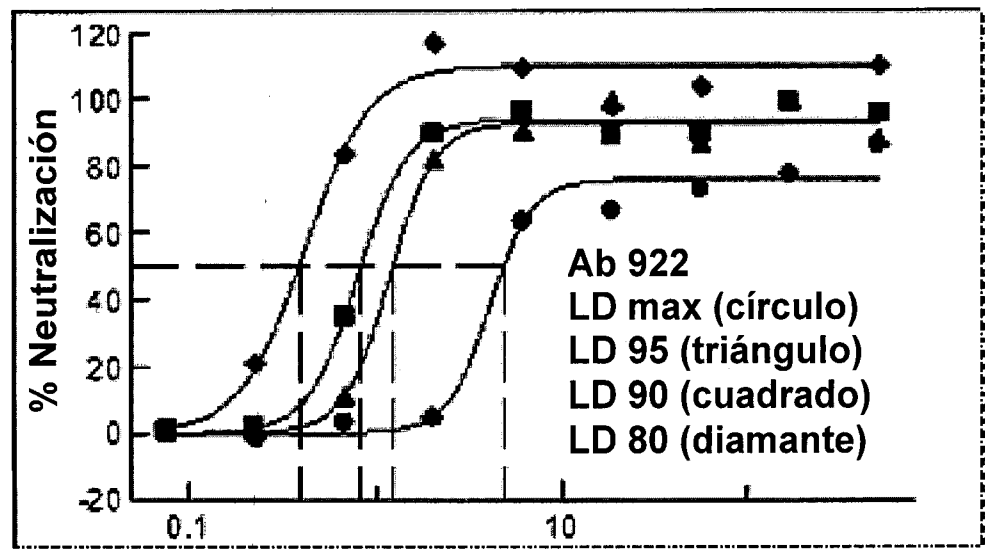
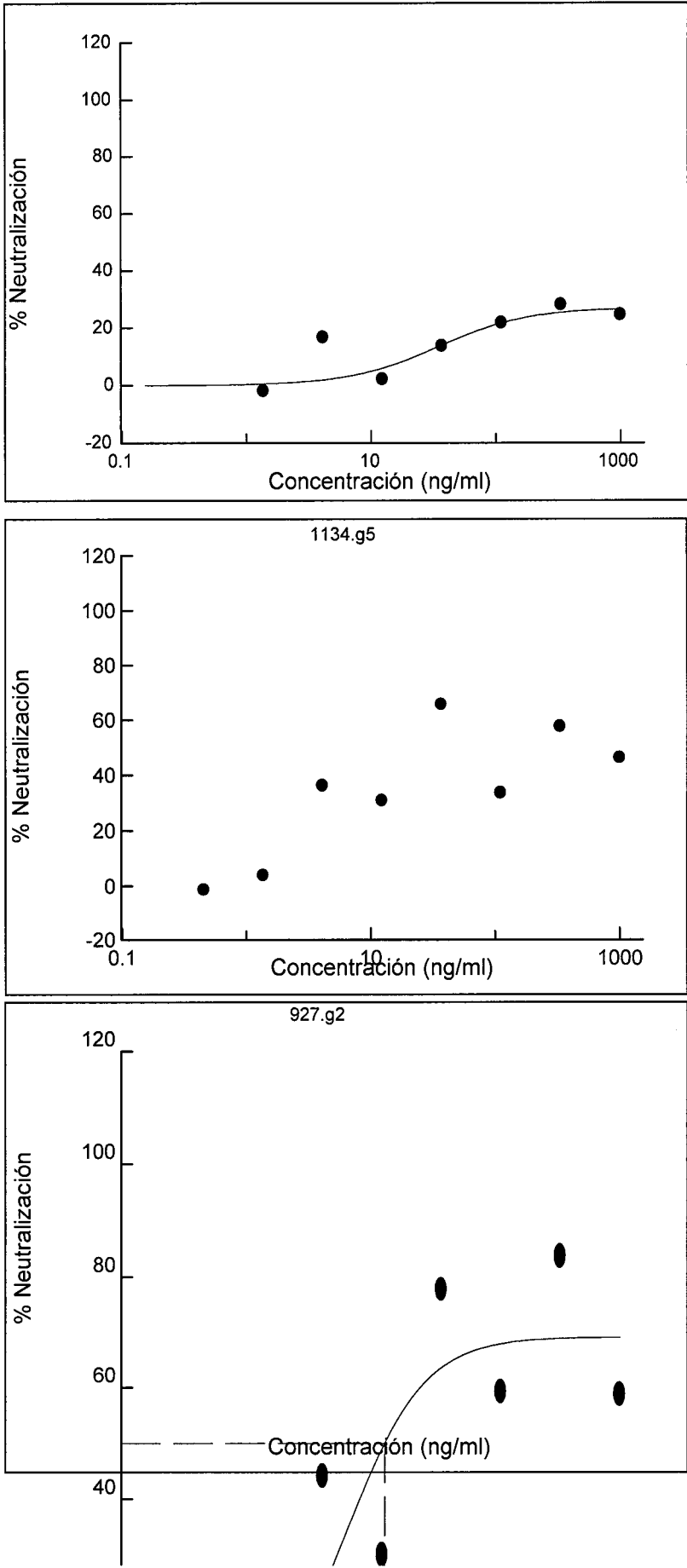


Figura 25 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs individuales (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para 1125.g2, 1134.g5 y 927.g2 respectivamente)



120
~~121~~

Figura 26 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs individuales (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para 1153.g8 y 1102.g4 respectivamente)

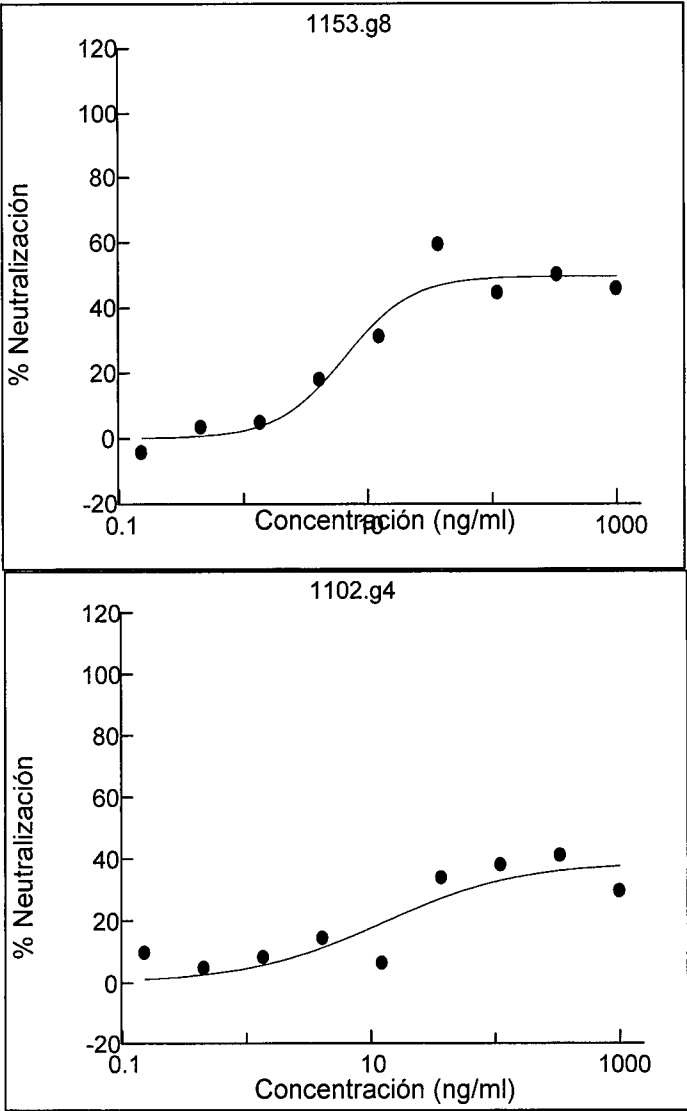


Figura 27 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs pareados (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para combinaciones de 927+1099, 927+1102, 927+1114 respectivamente)

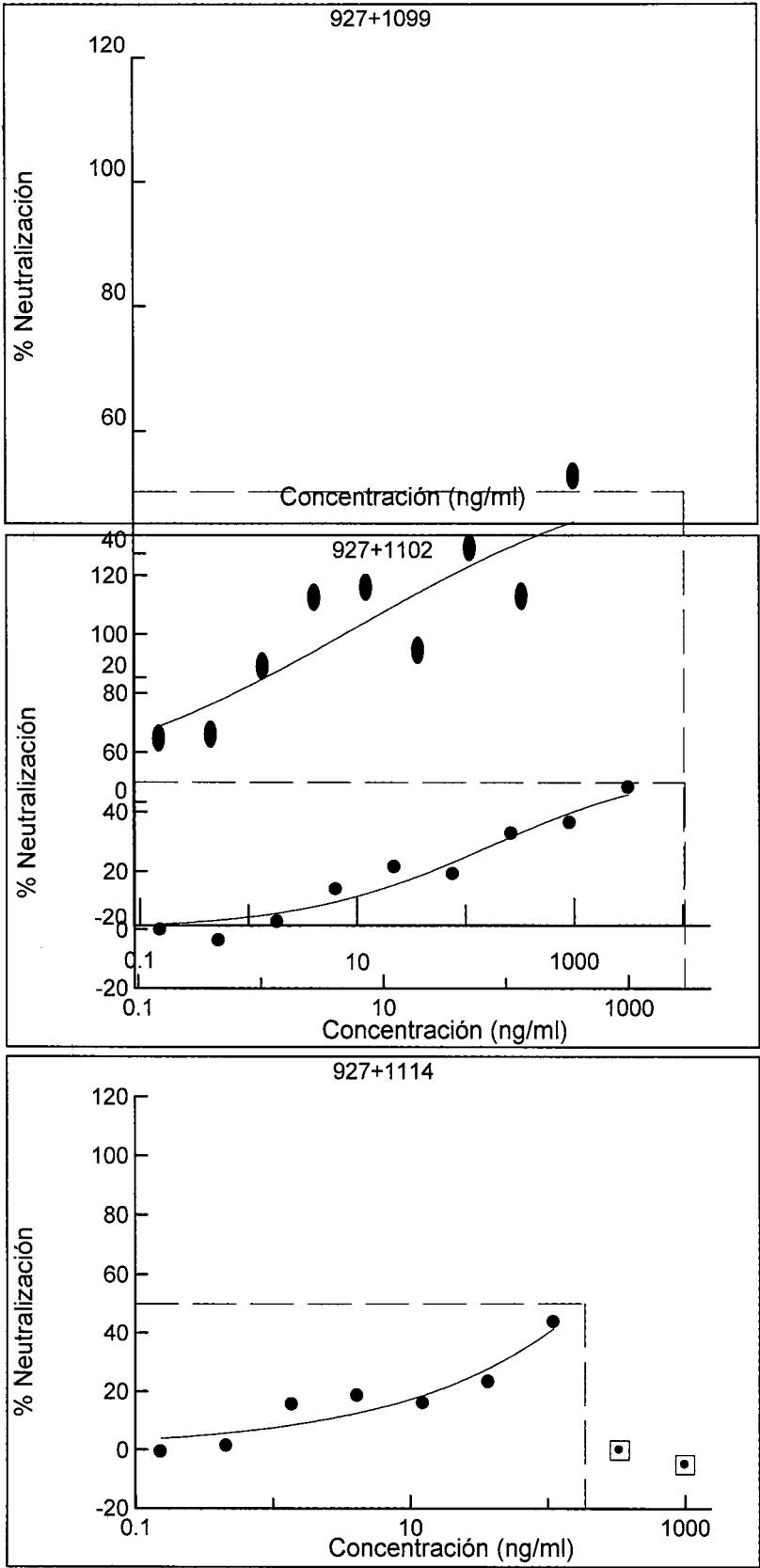


Figura 28 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs pareados (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para combinaciones de 927+1125, 927+1134, 1099+1114 respectivamente)

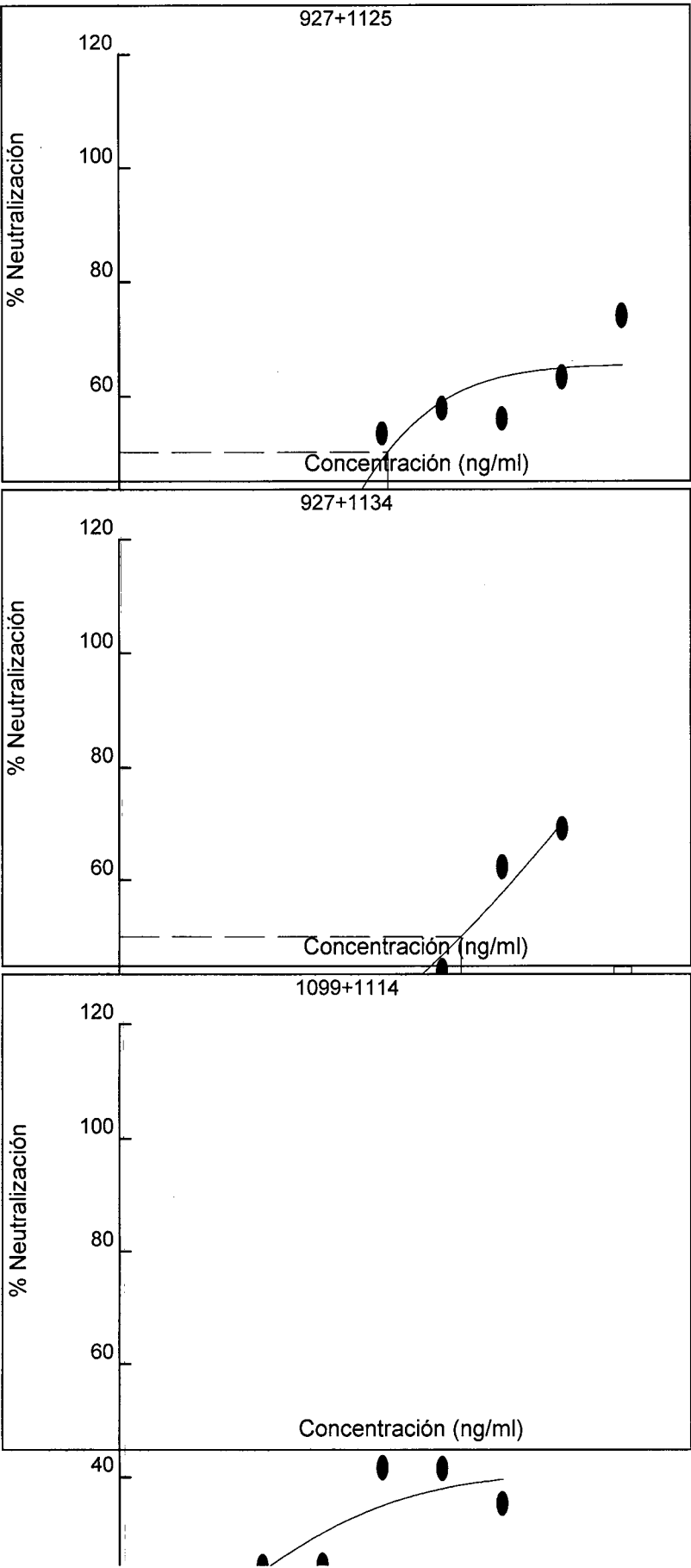


Figura 29 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs pareados (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para combinaciones de 1102+1114, 1102+1125, 1114+1134 respectivamente)

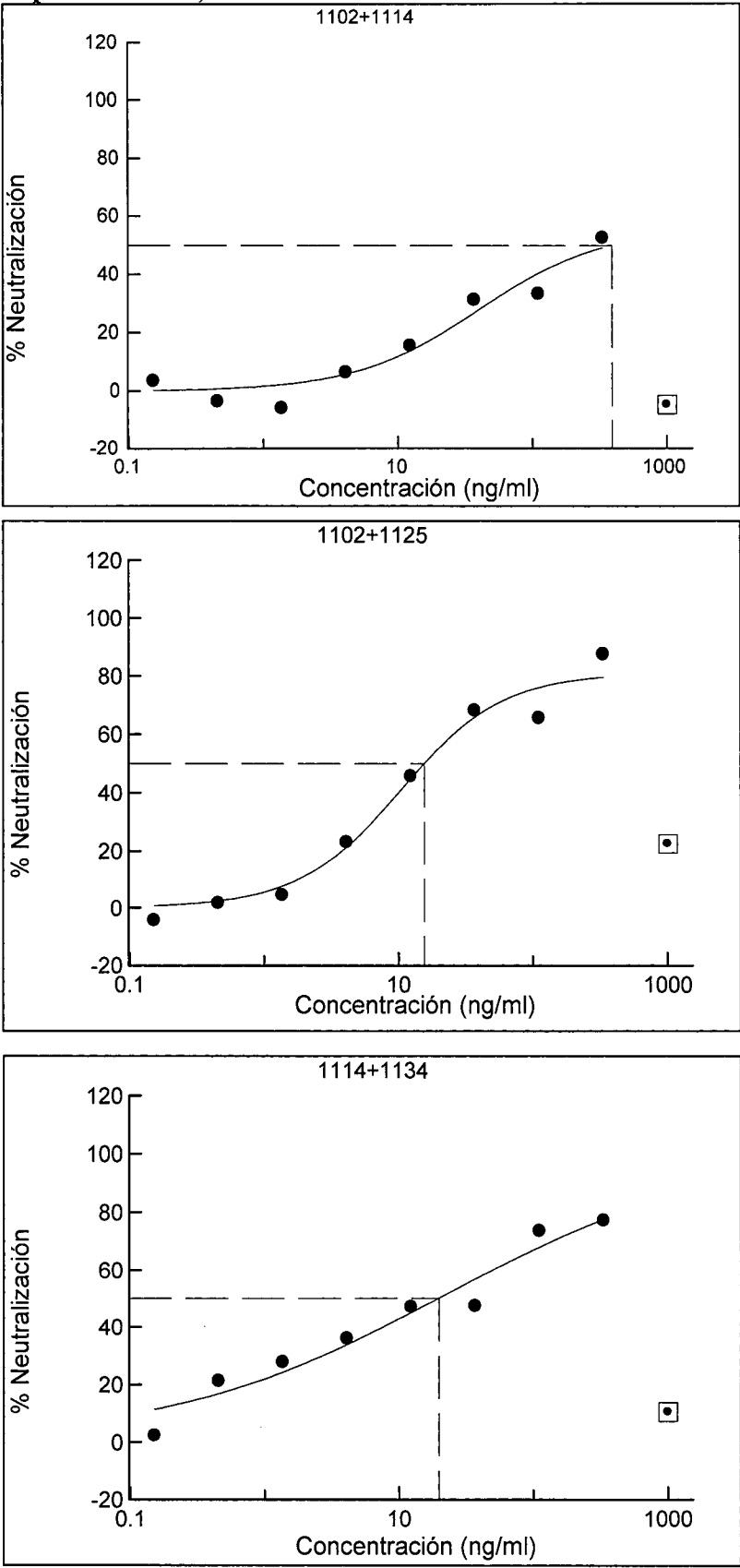
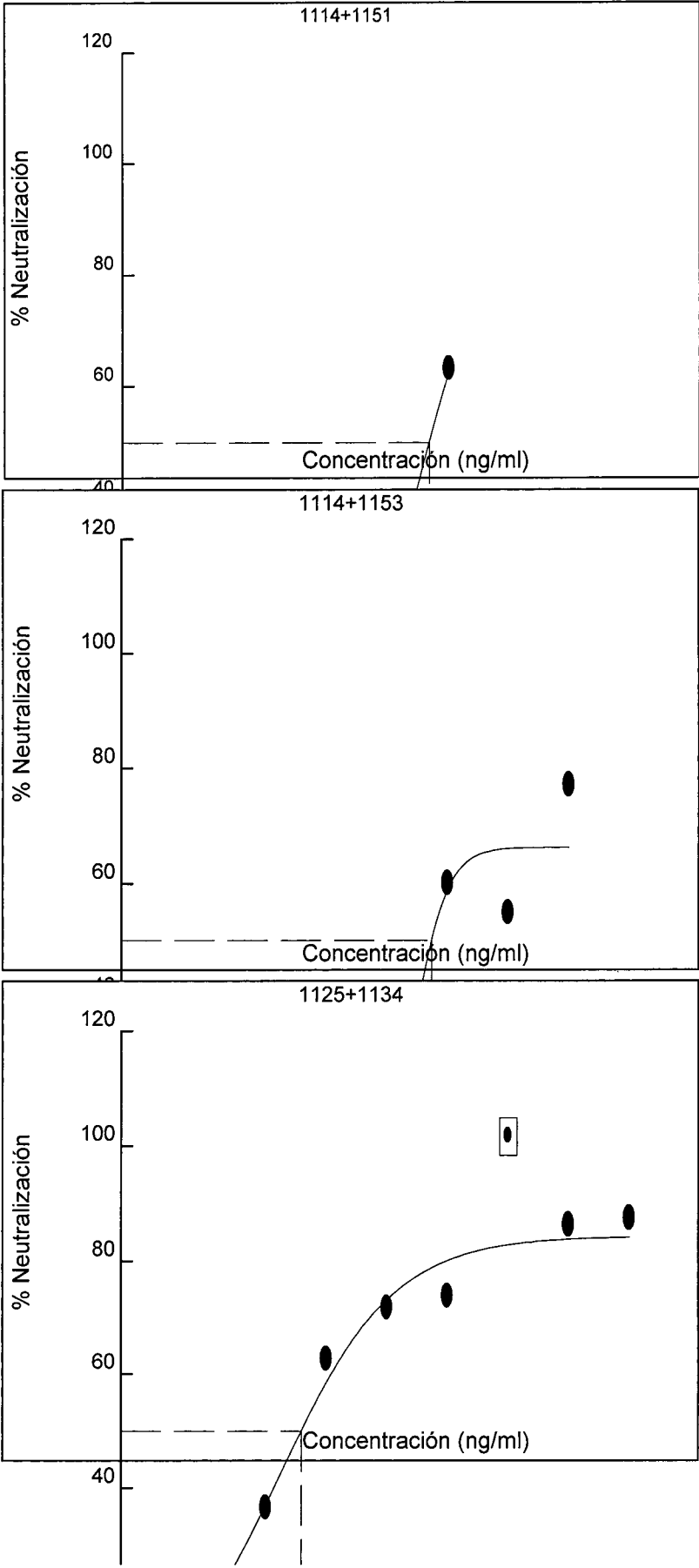


Figura 30 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para Mabs pareados (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para combinaciones de 1114+1151, 1114+1153, 1125+1134 respectivamente)



125
~~126~~

Figura 31 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para combinaciones de 1125+1134+1114, 1125+1134+927, 1125+1151+1114 respectivamente)

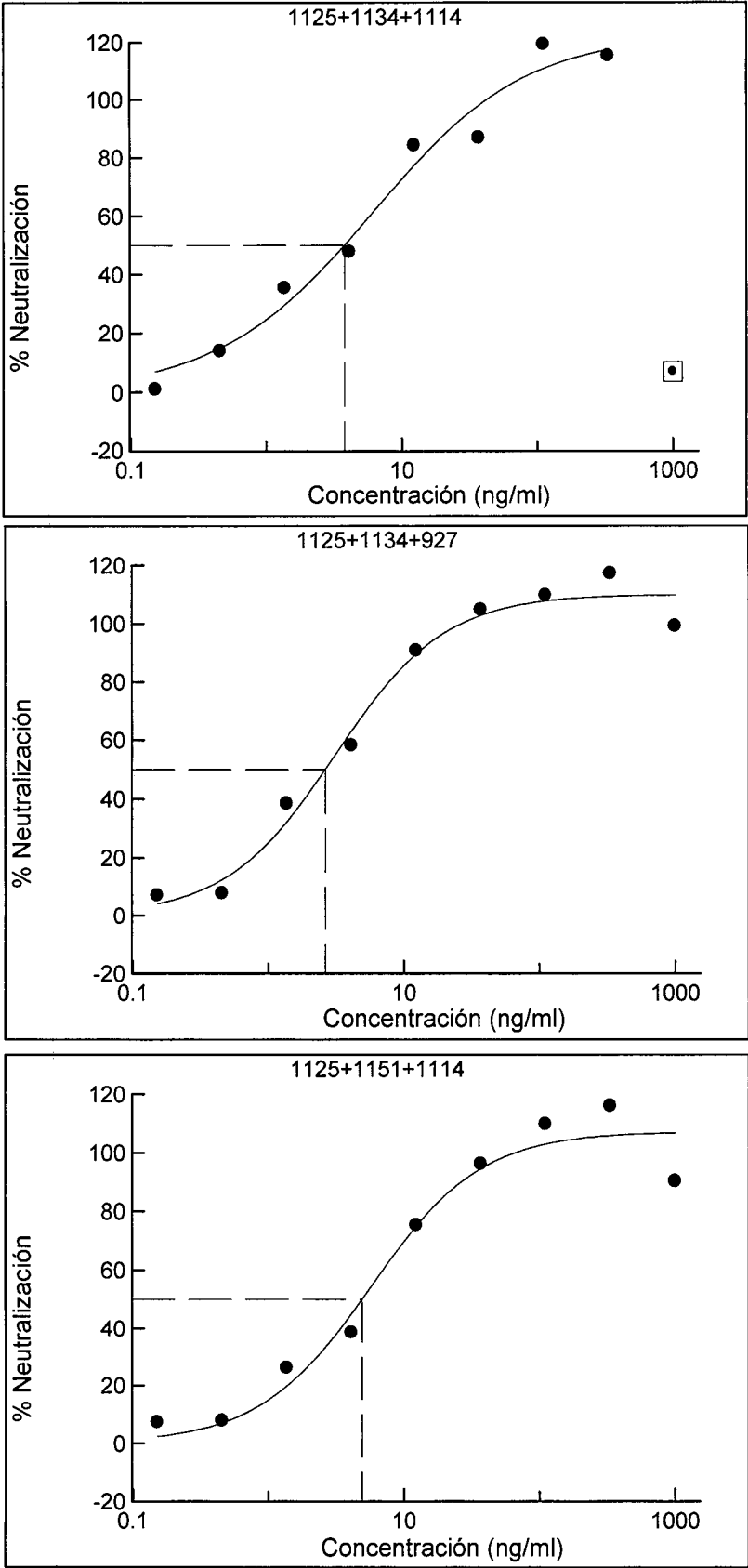
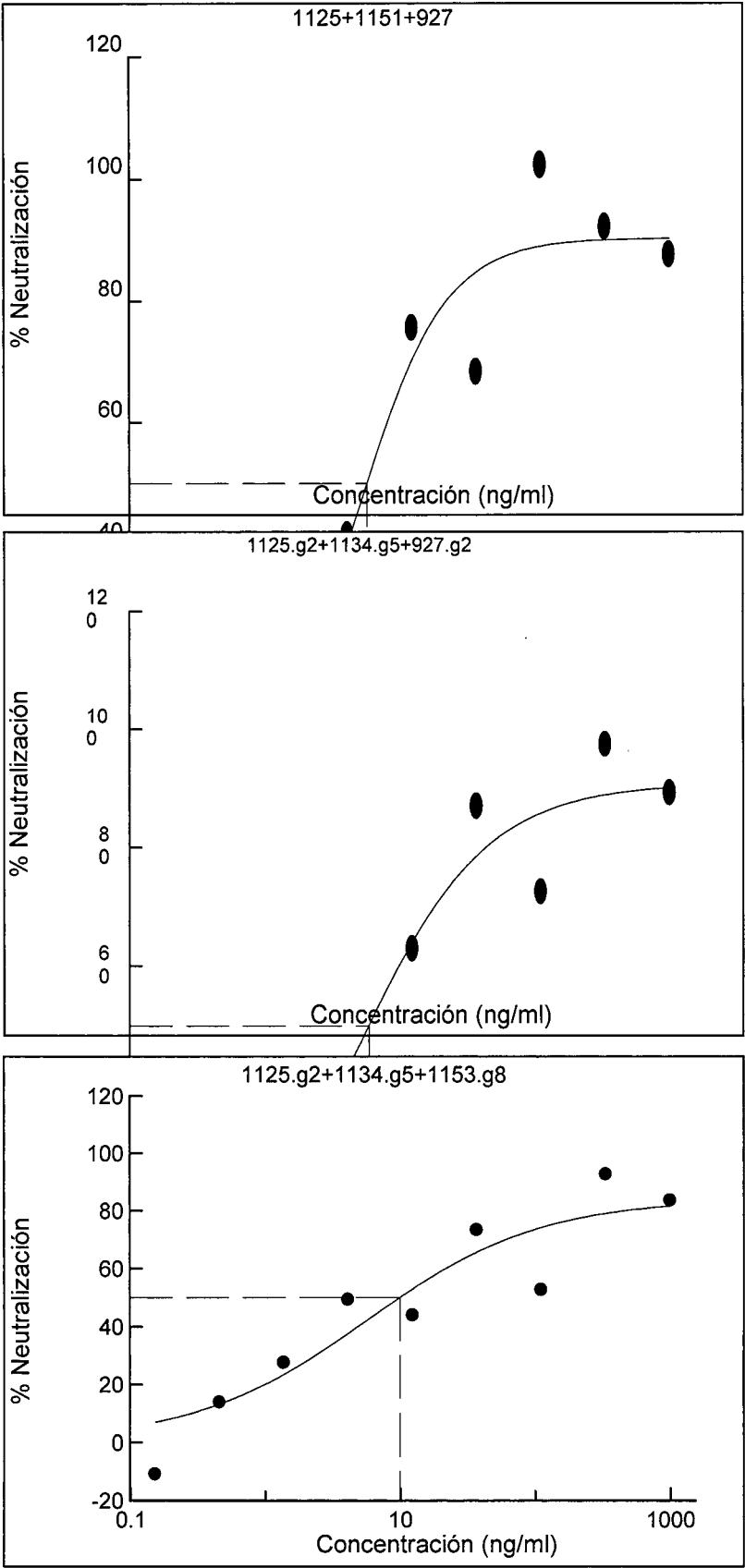


Figura 32 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab (eje Y neutralización; eje X concentración ng/ml para 1125.+1151+927, 1125.g2+1134.g5+927.g2 respectivamente)



127
+08

Figura 33 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de tres Mab

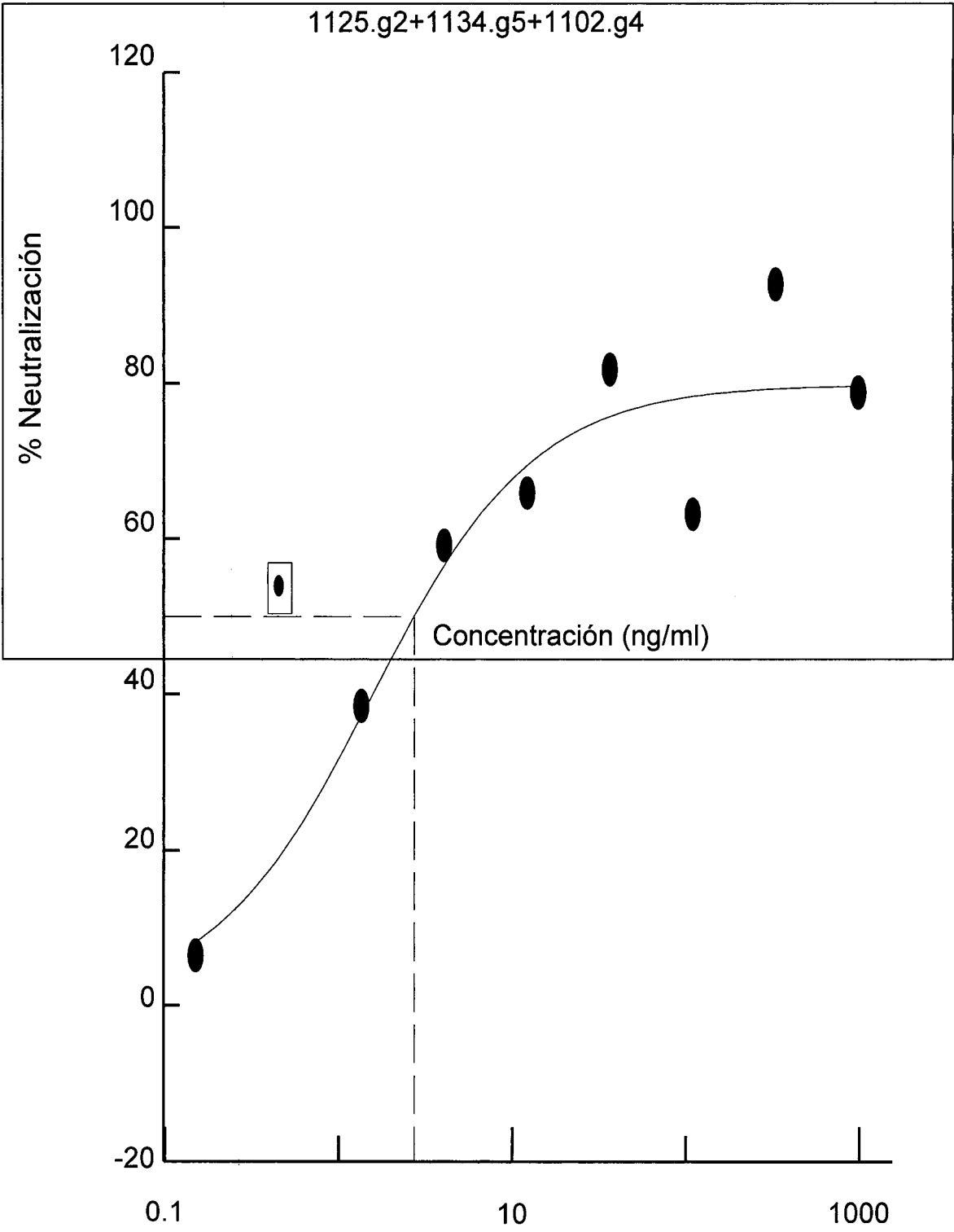


Figura 34 Datos de neutralización in-vitro de anti TcdB (ribotipo 003) para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina

128

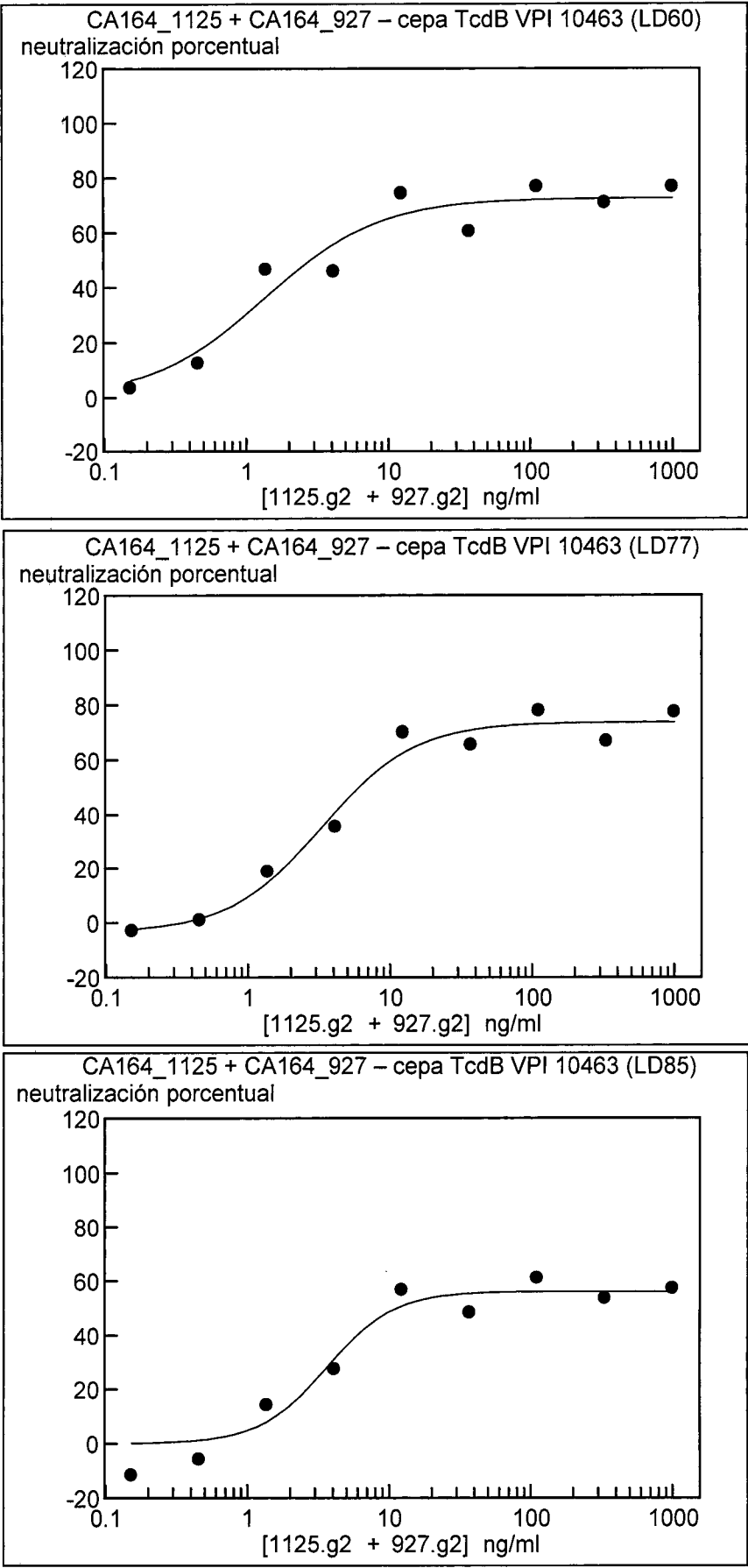
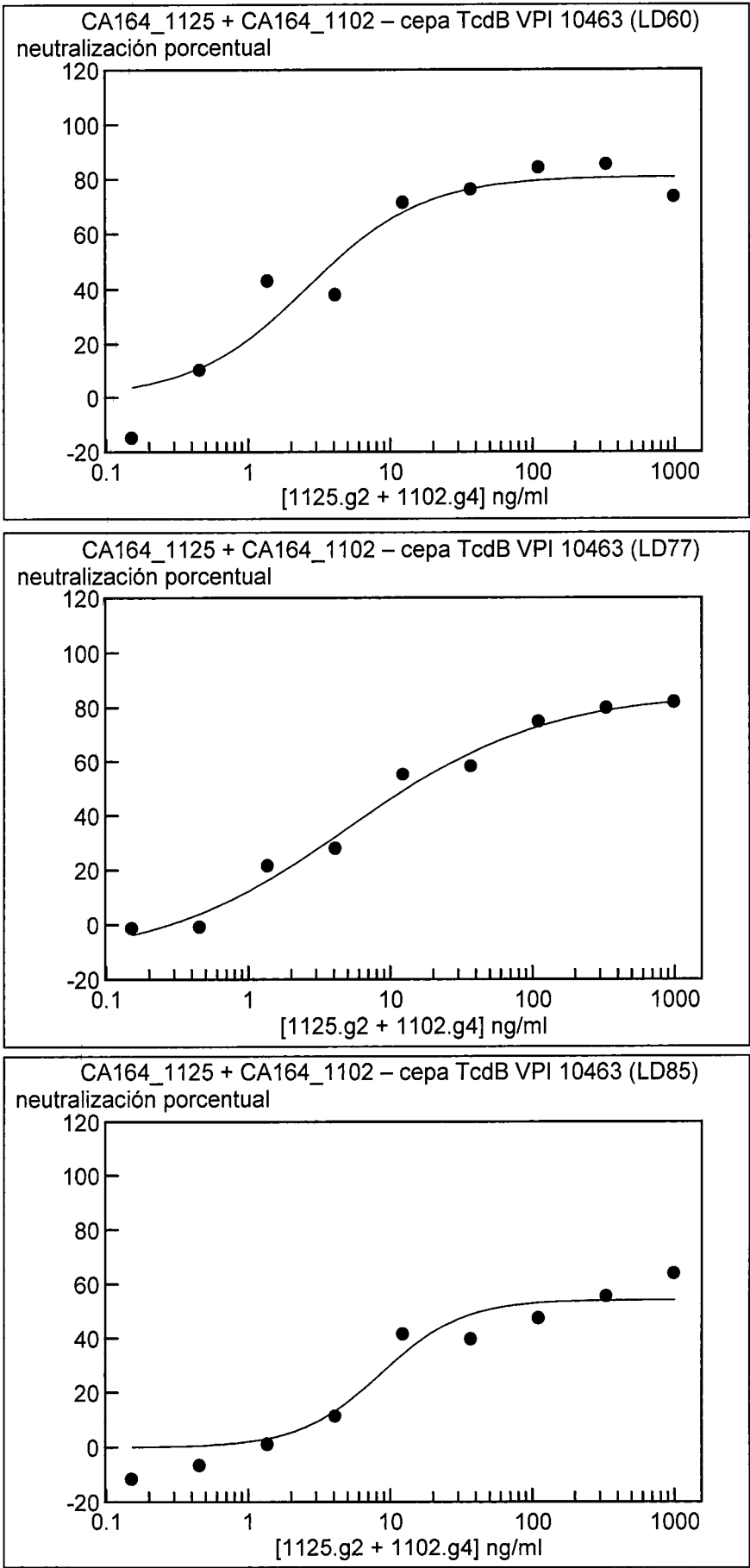


Figura 35 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina



131
130

Figura 36 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina

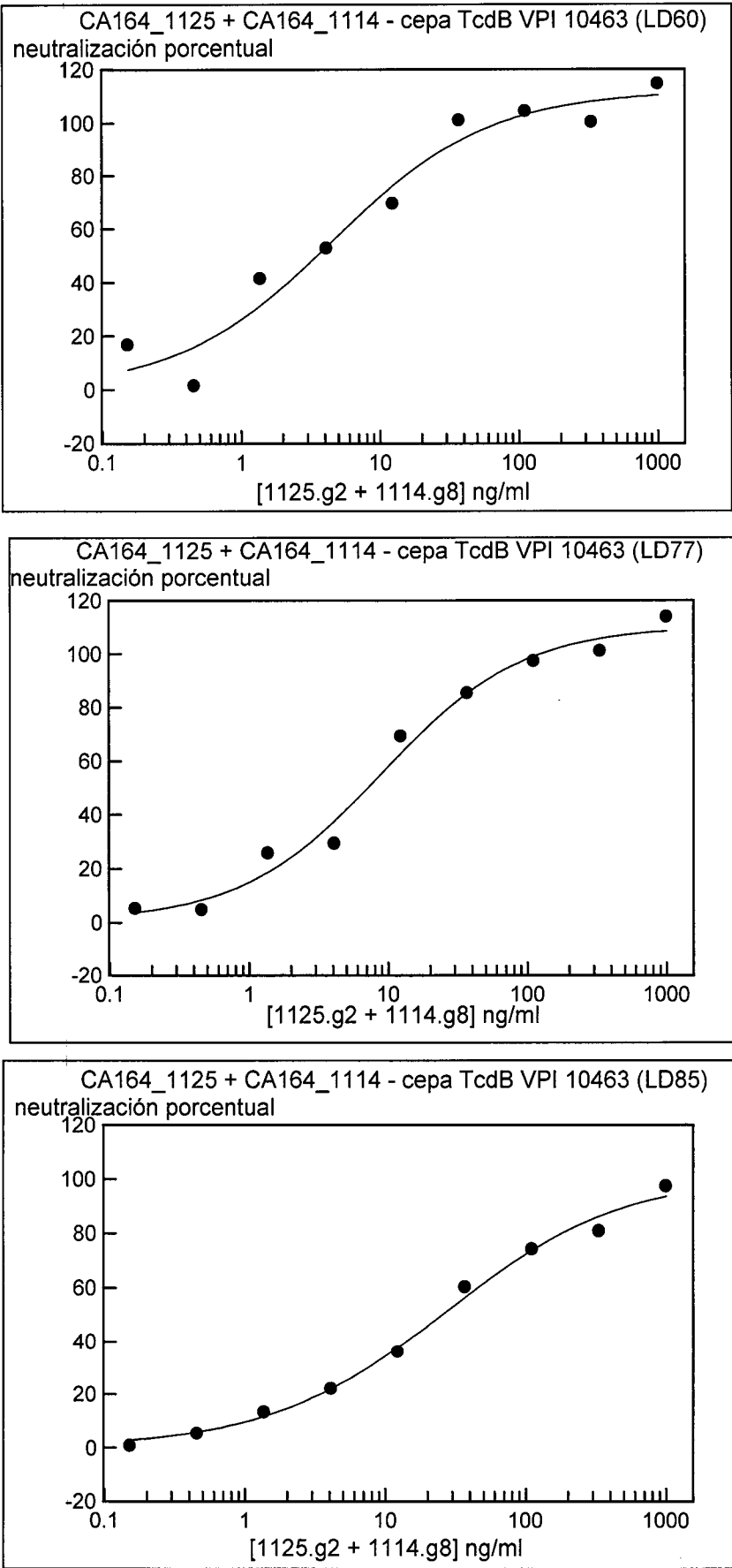
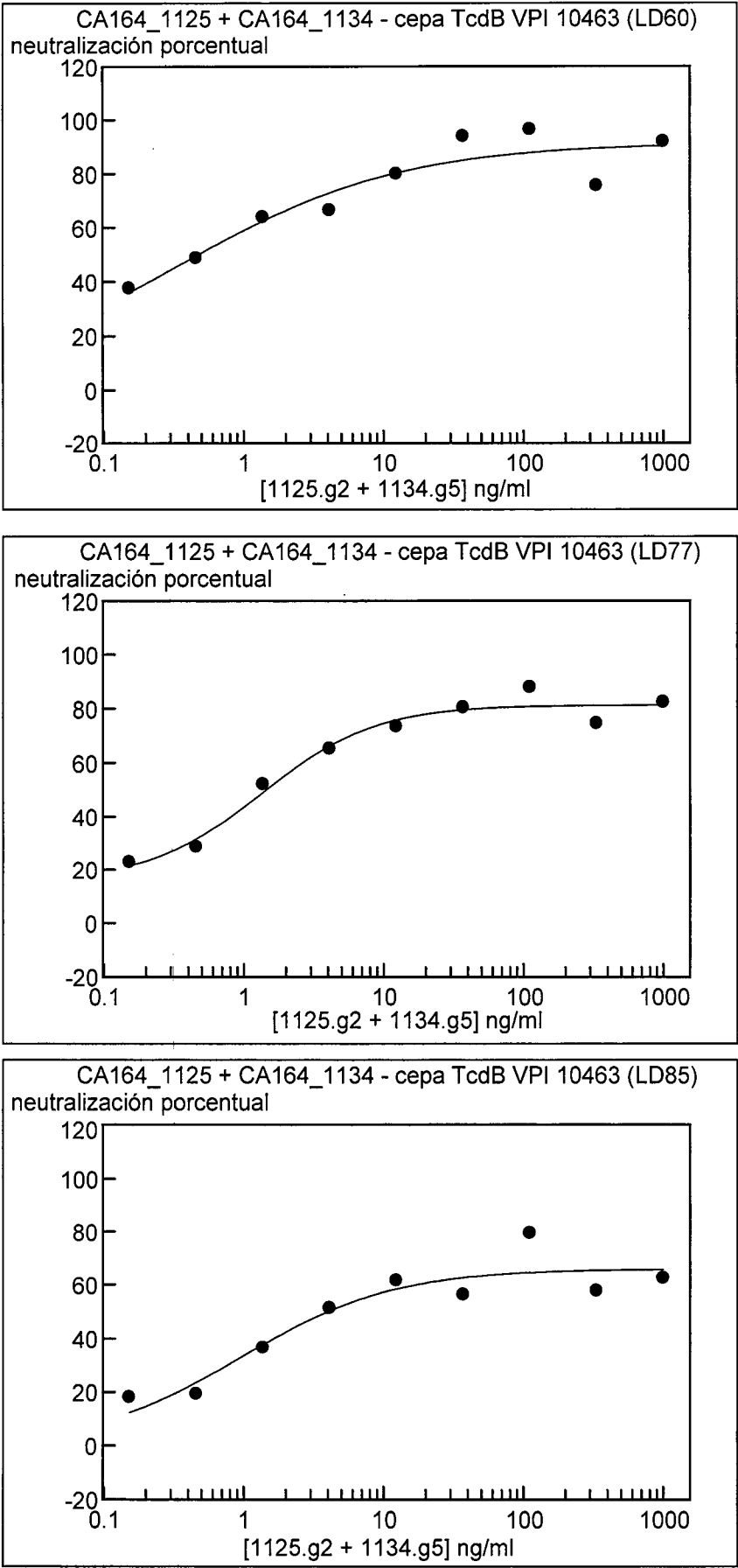


Figura 37 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina ¹³²



132
133

Figura 38 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina

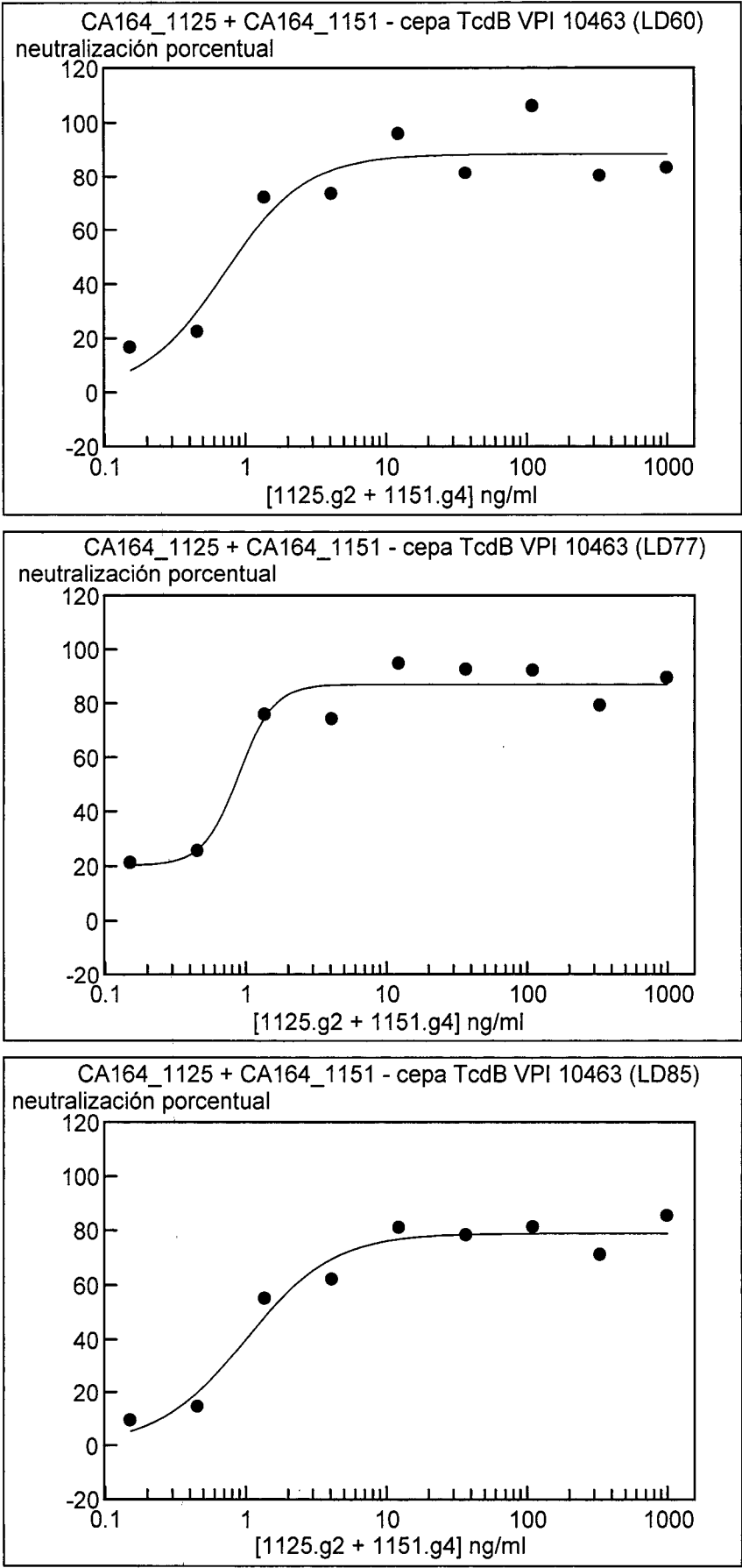


Figura 39 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina

134

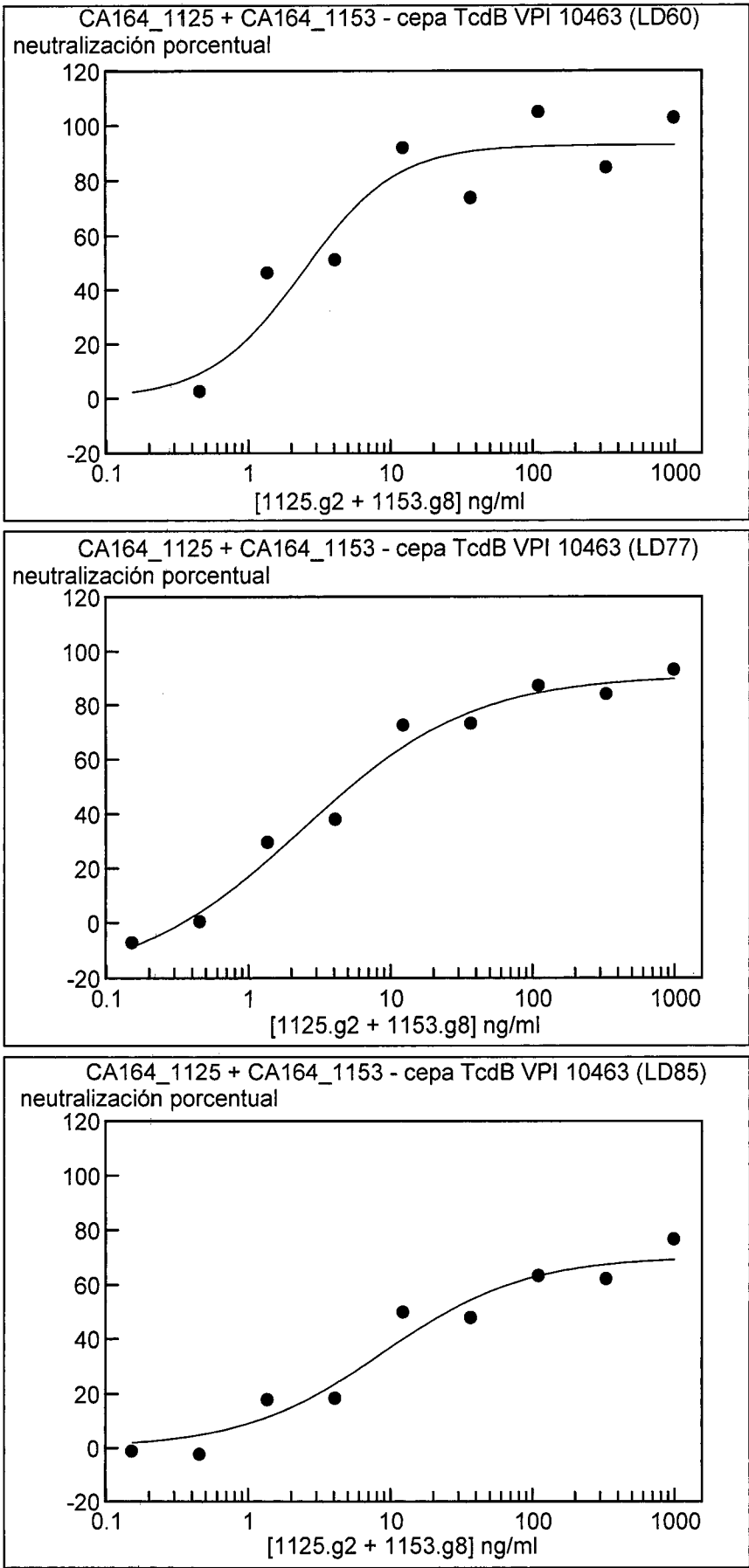
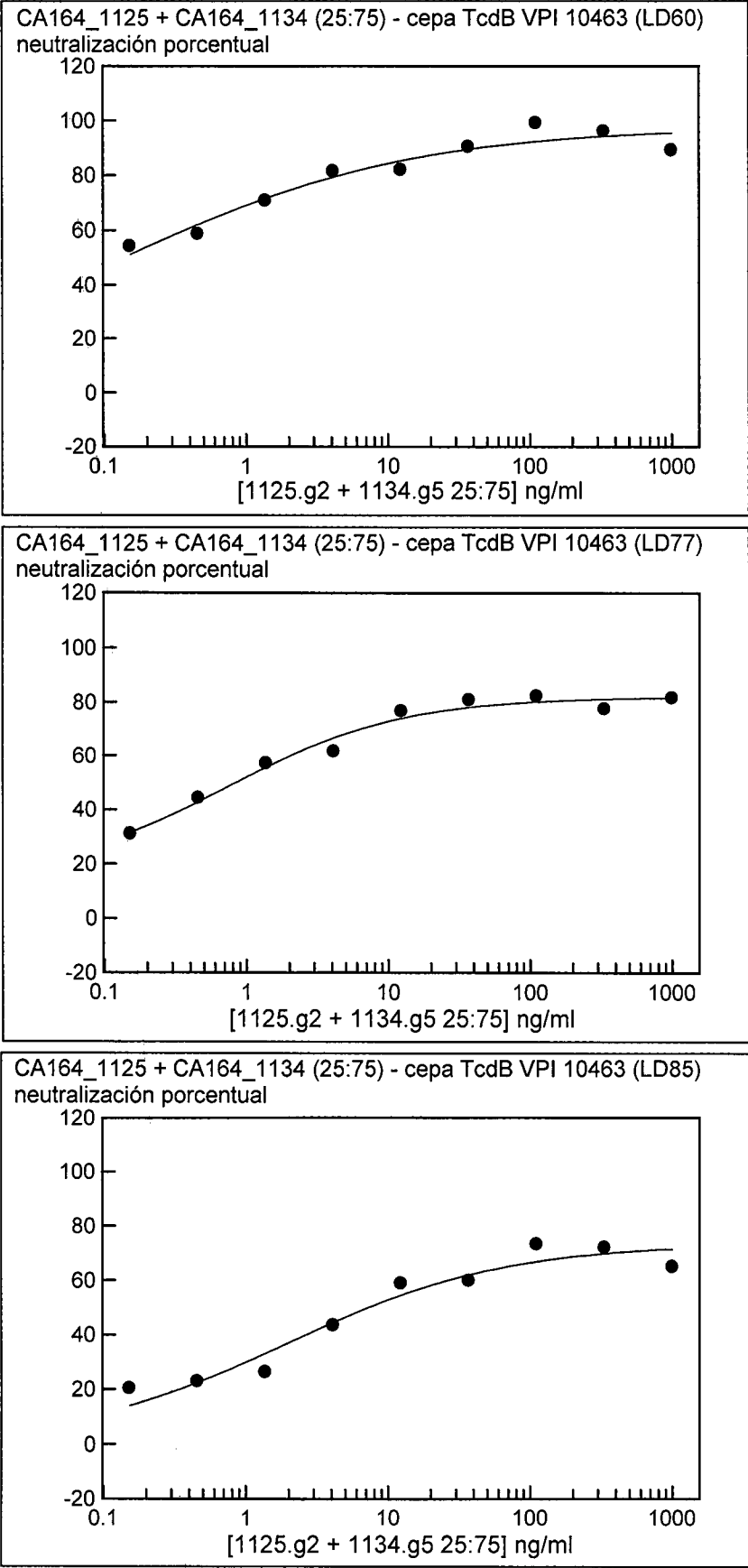


Figura 40 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes concentraciones de toxina



139
156

Figura 41 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes relaciones de Mab relativas y diferentes concentraciones de toxina

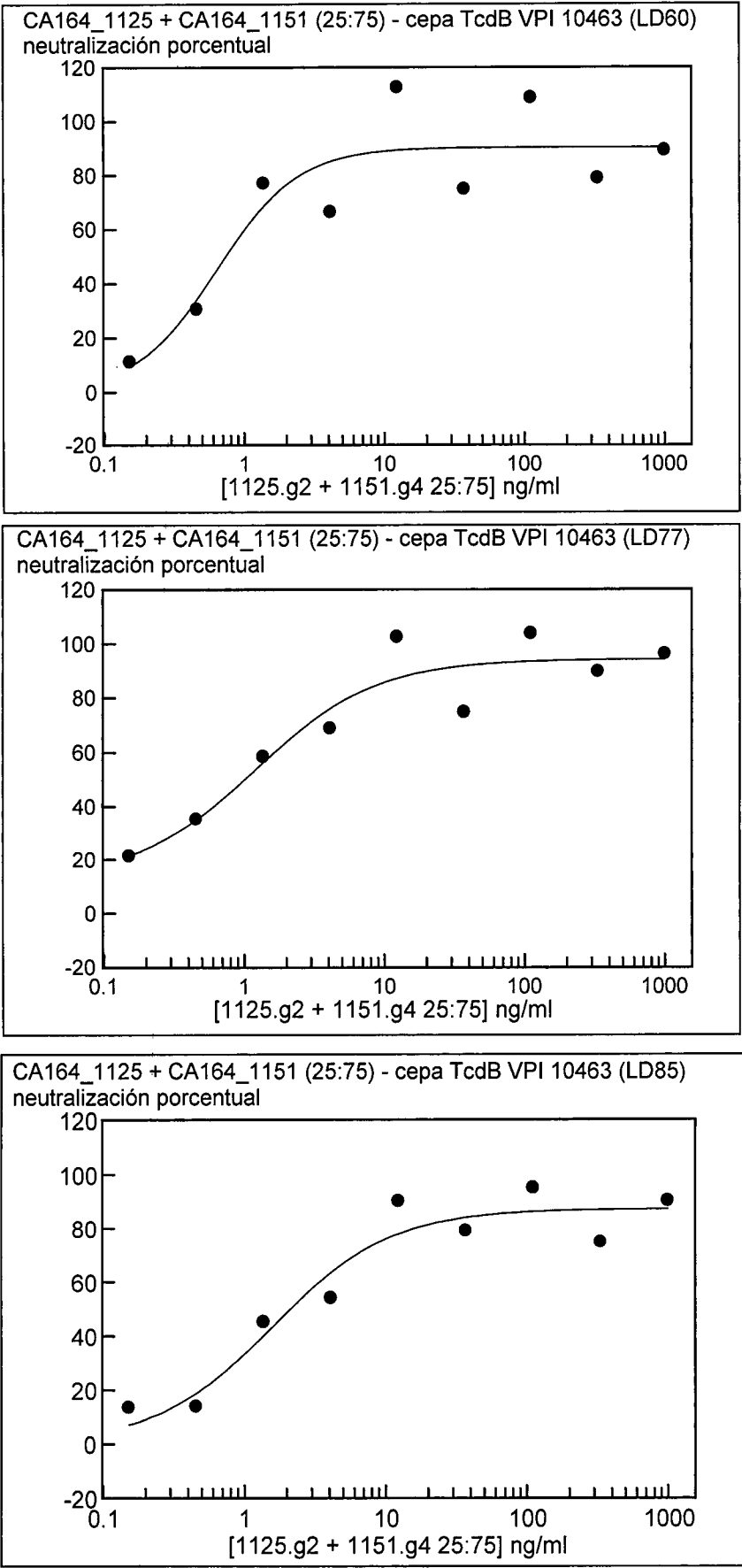


Figura 42 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes relaciones de Mab relativas y diferentes concentraciones de toxina

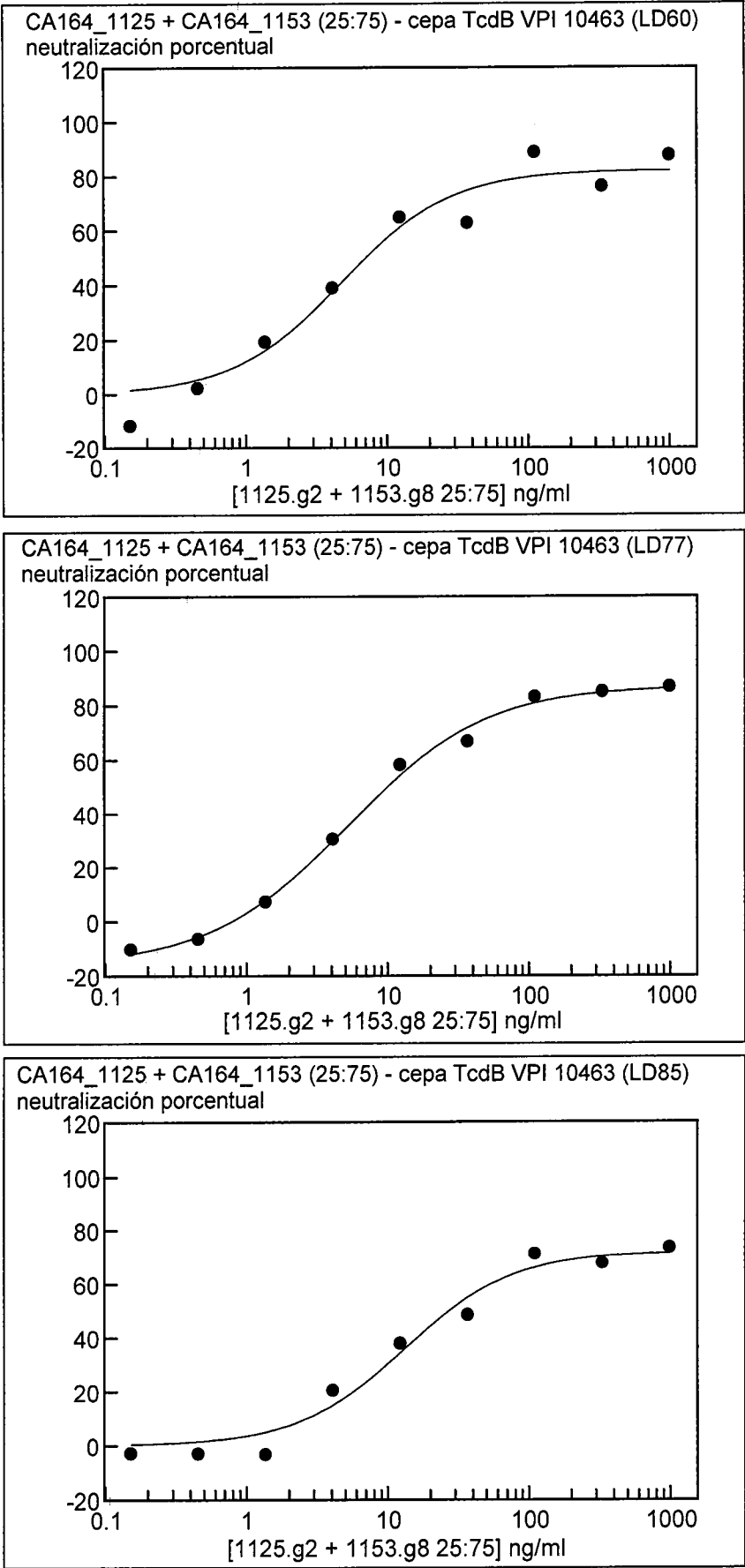


Figura 43 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes relaciones de Mab relativas y diferentes concentraciones de toxina

430

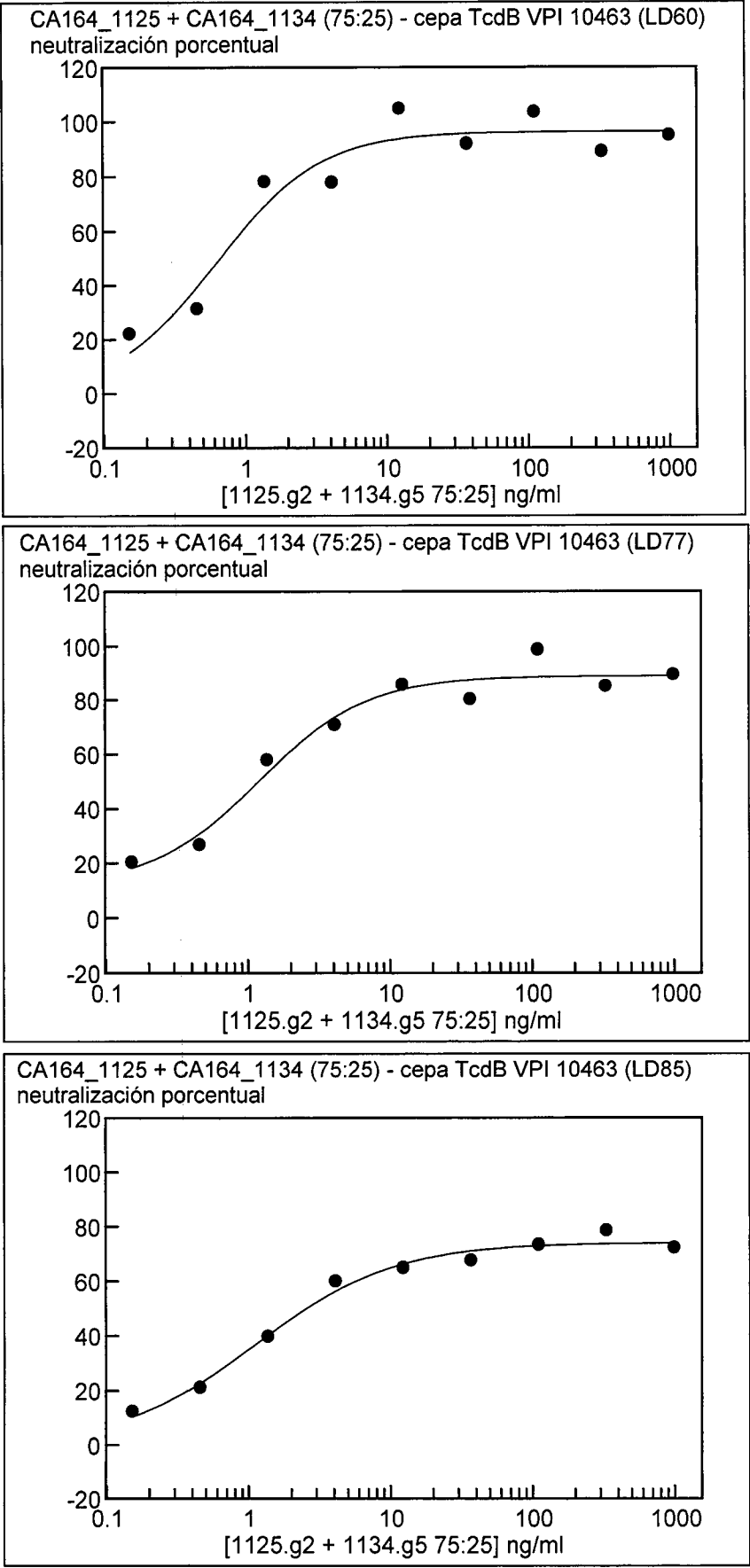
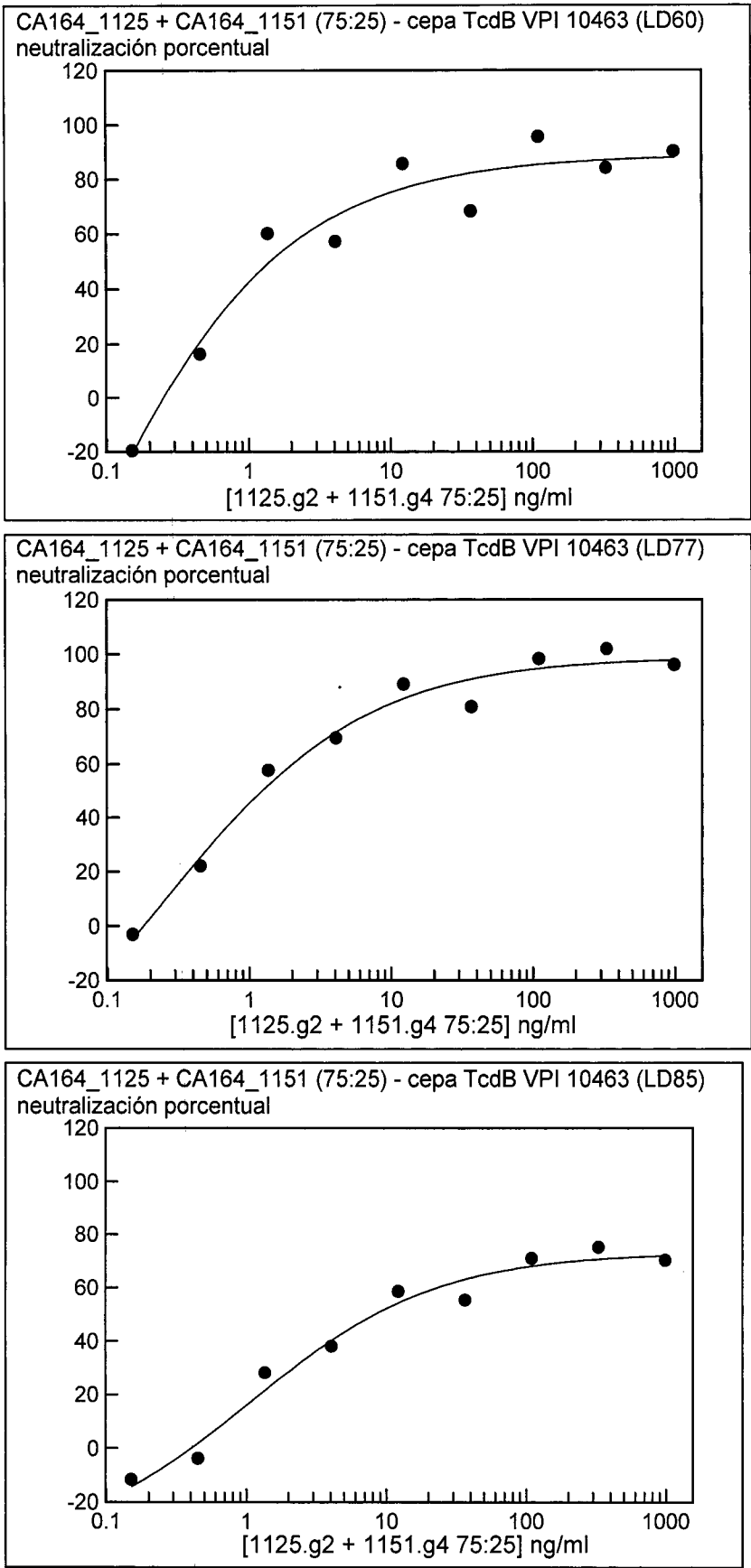
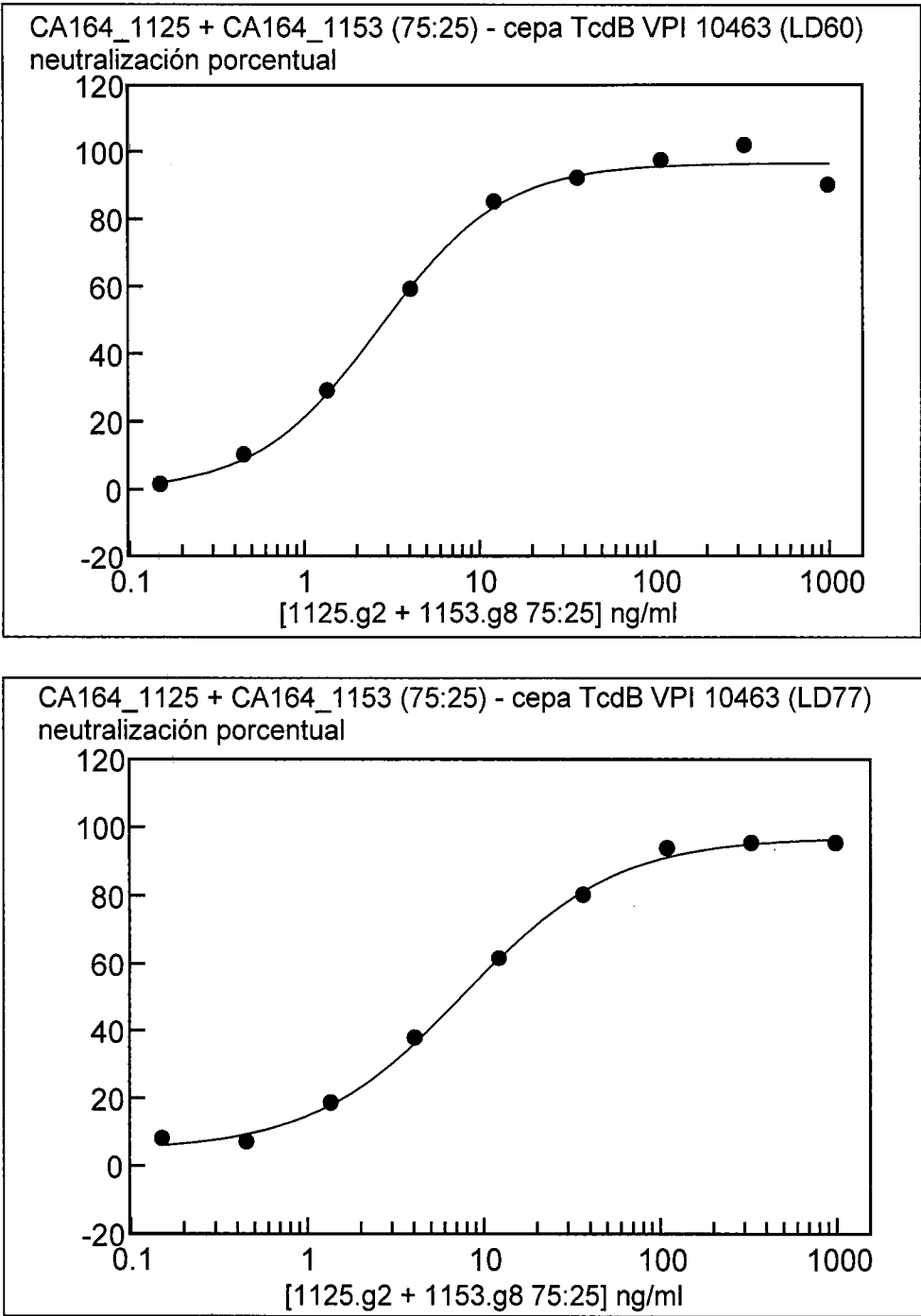


Figura 44 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes relaciones de Mab relativas y diferentes concentraciones de toxina



139
240

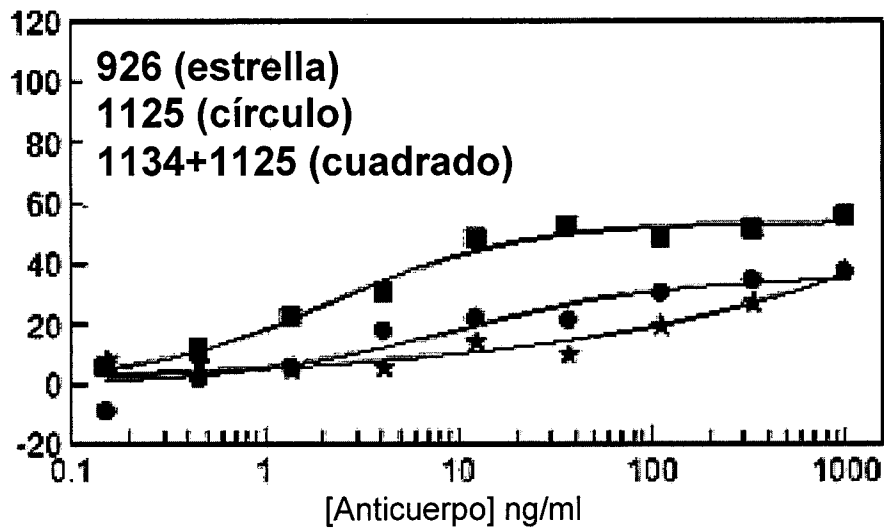
Figura 45 Datos de neutralización in-vitro (ribotipo 003) anti TcdB para mezclas de dos Mab con diferentes relaciones de Mab relativas y diferentes concentraciones de toxina



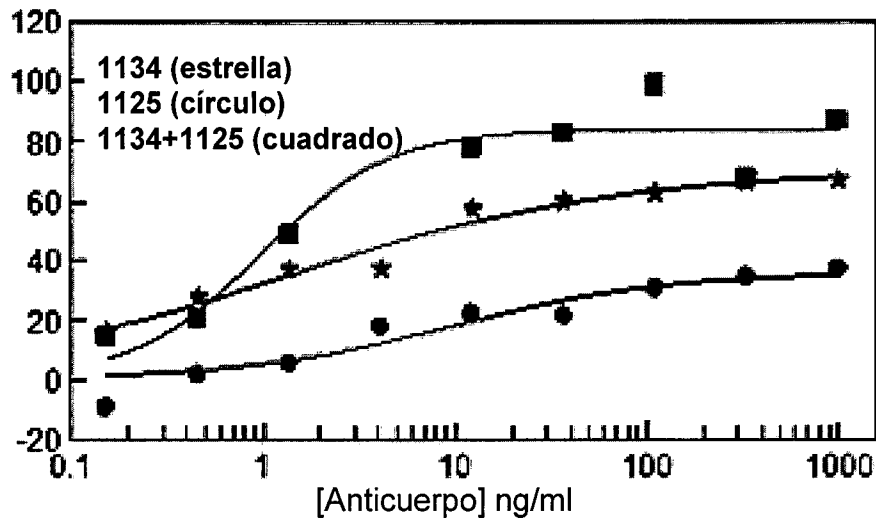
140
44T

Figura 46 Neutralización de la cepa TcdB VPI 10463, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina constante (LD80)

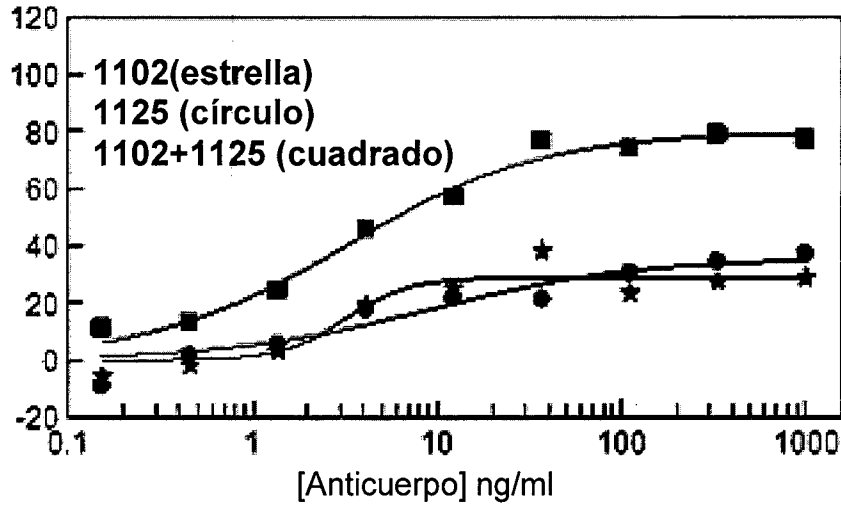
neutralización porcentual



neutralización porcentual



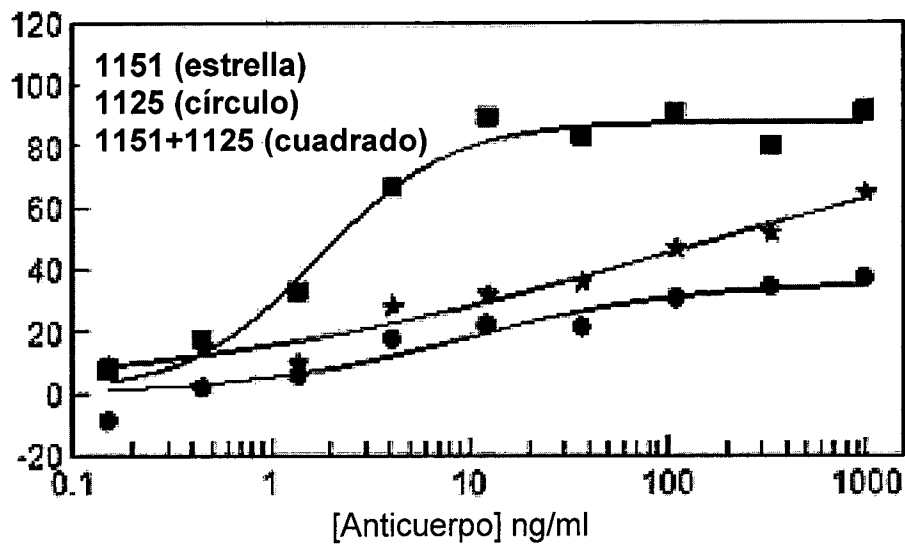
neutralización porcentual



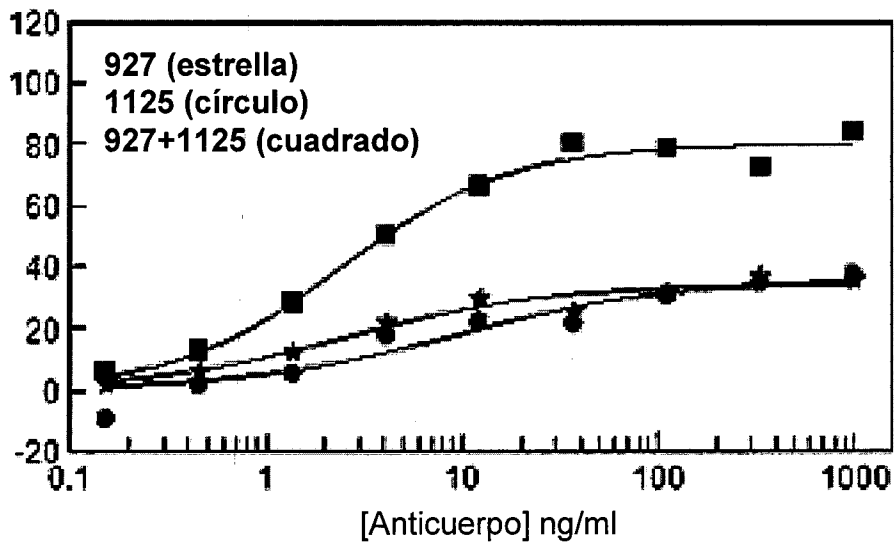
141
~~142~~

Figura 47 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina constante (LD80)

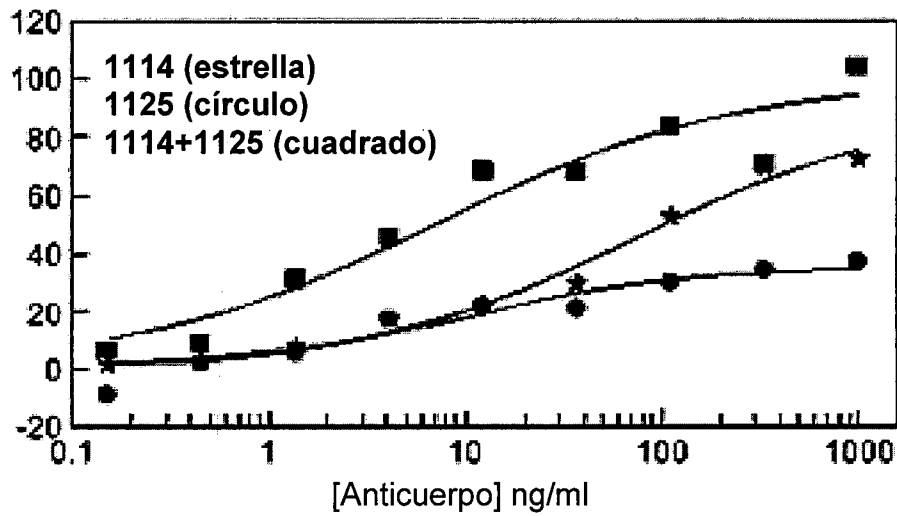
neutralización porcentual



neutralización porcentual

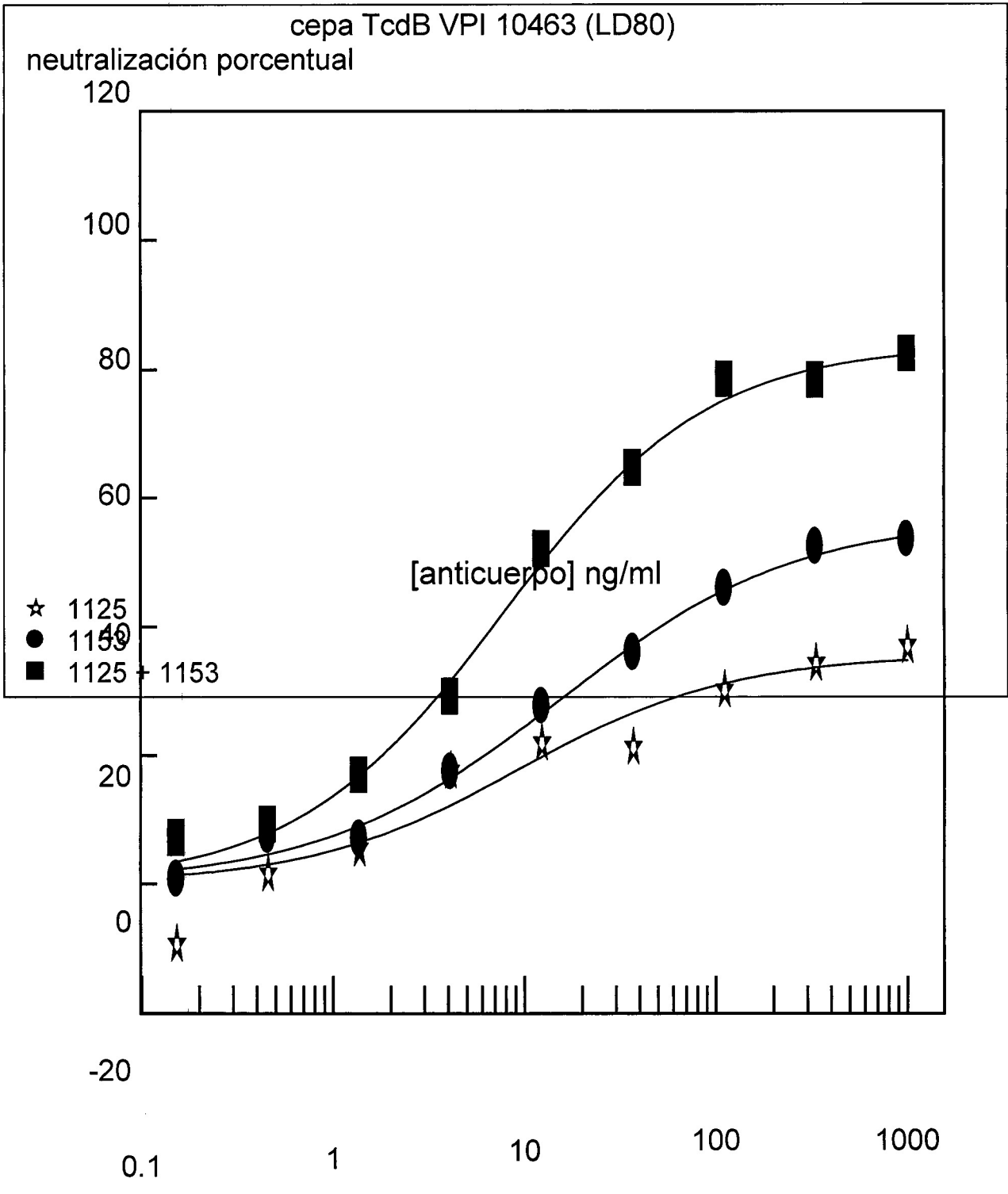


neutralización porcentual



142
143

Figura 48 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina constante (LD80)



~~144~~

Figura 49 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado - *straddling*)

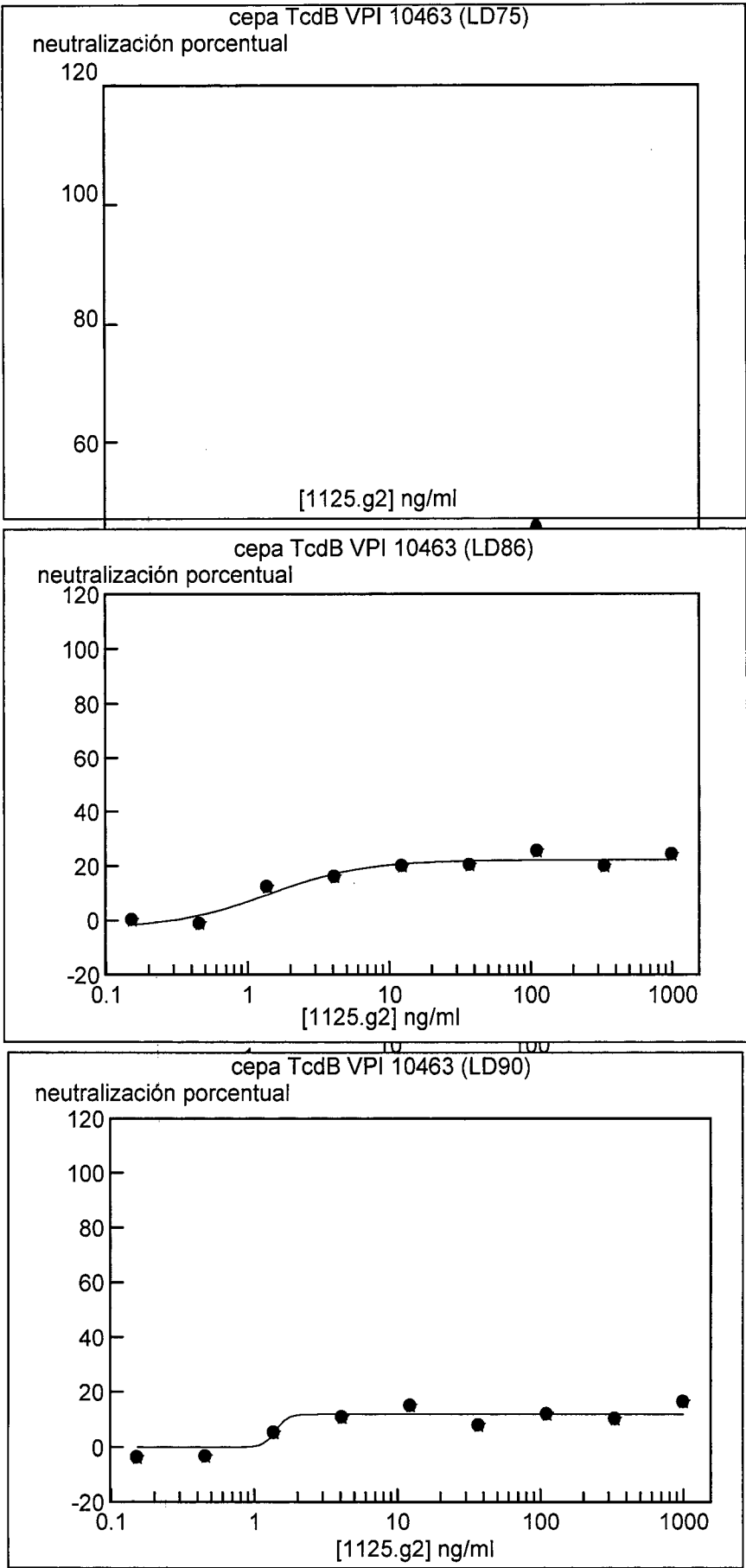
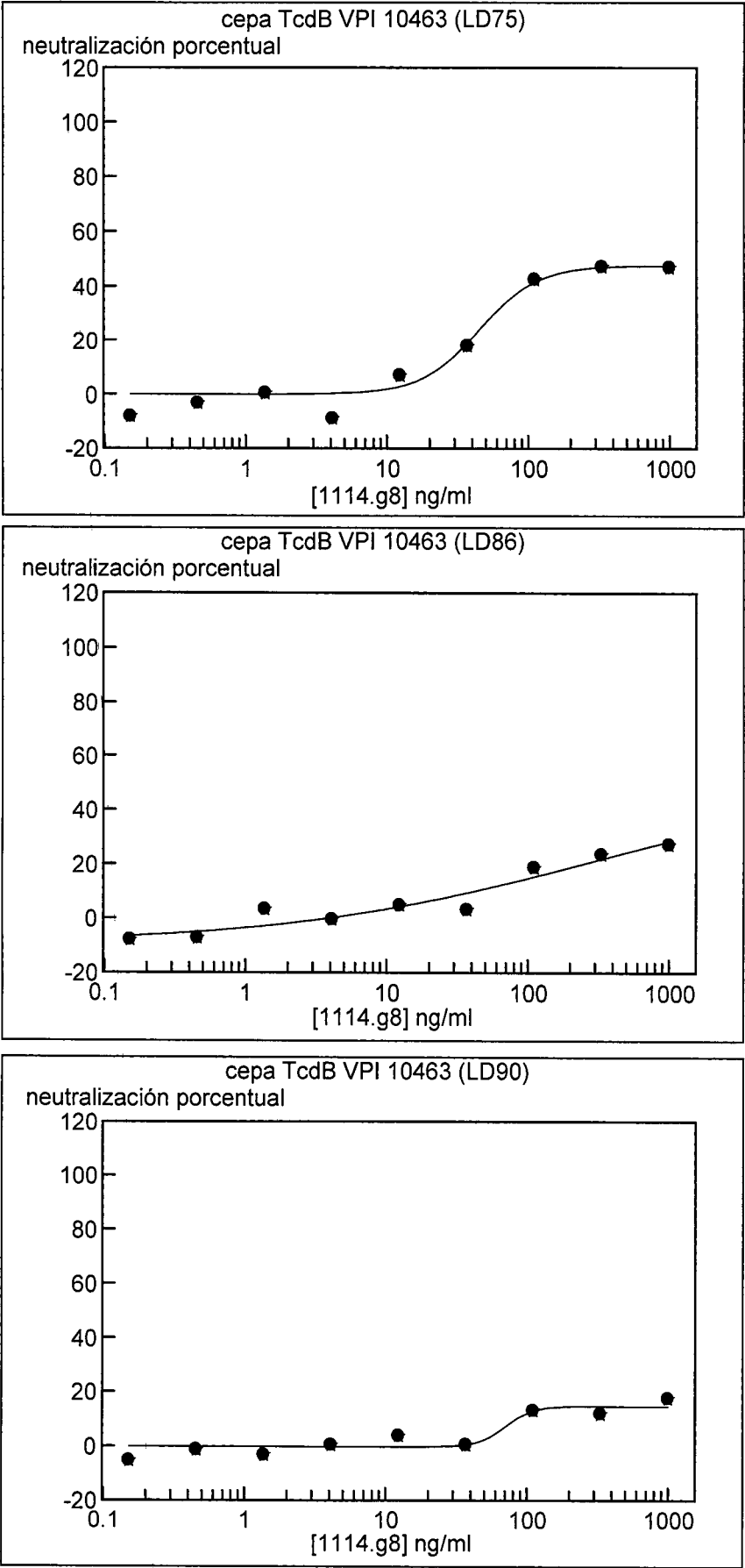
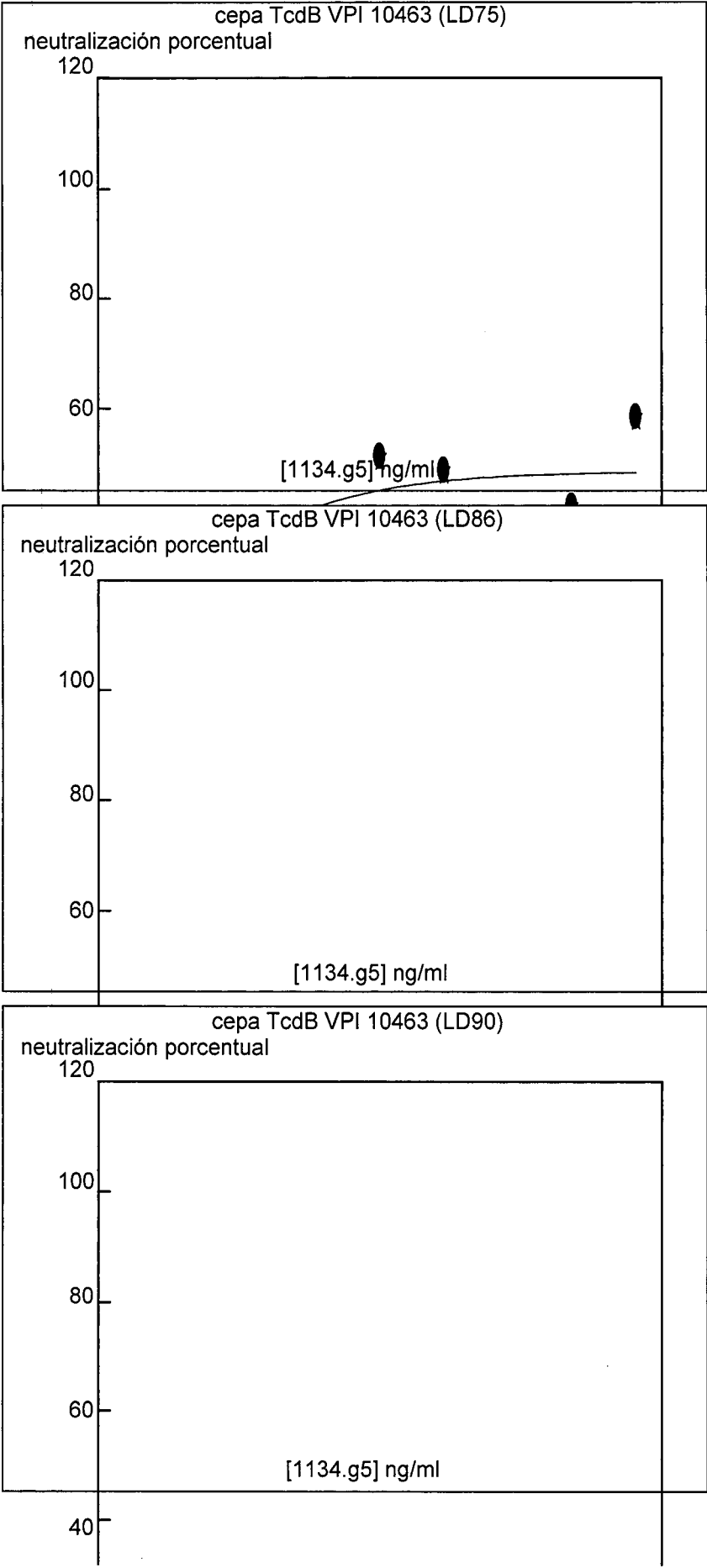


Figura 50 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)



149
~~146~~

Figura 51 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)



146
~~547~~

Figura 52 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)

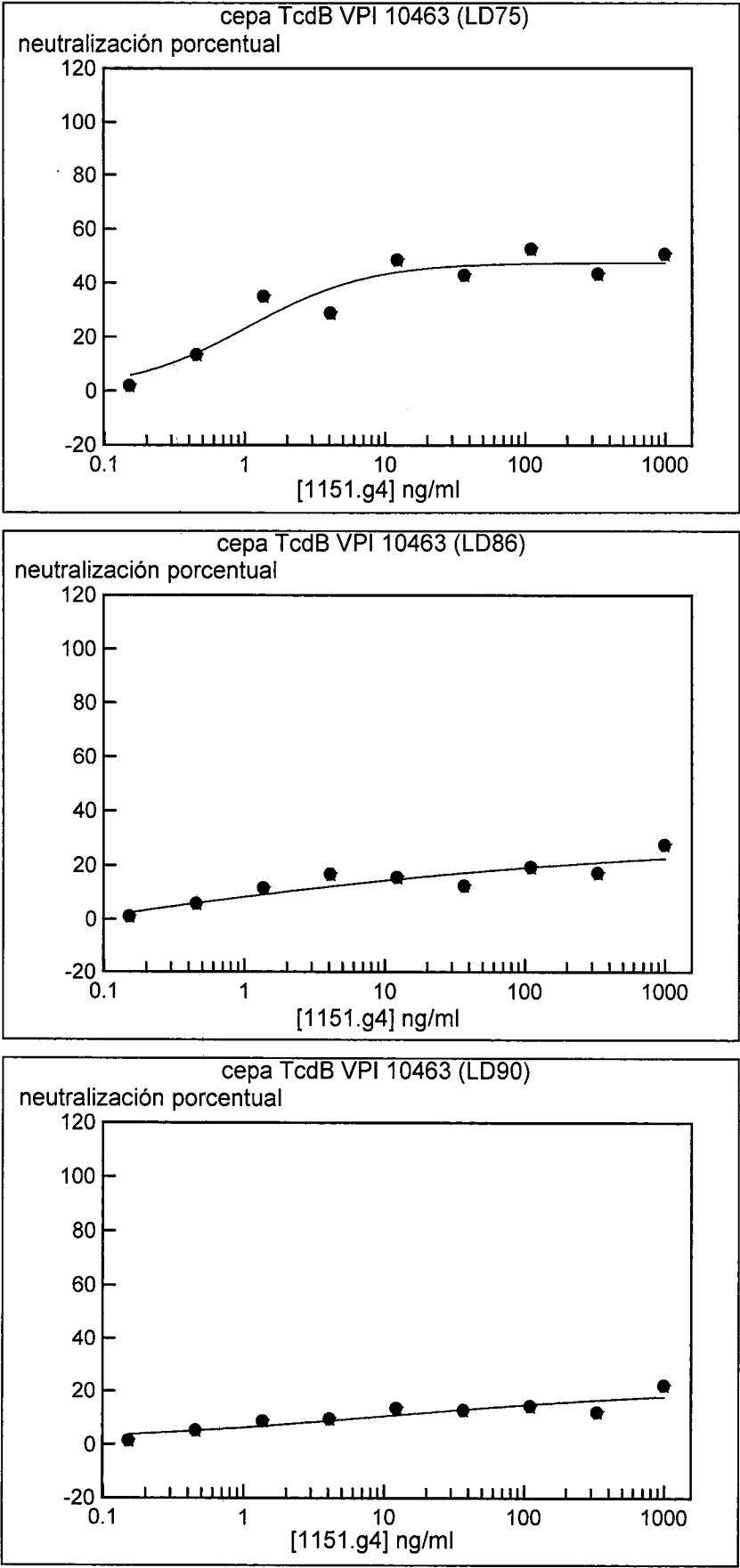


Figura 53 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)

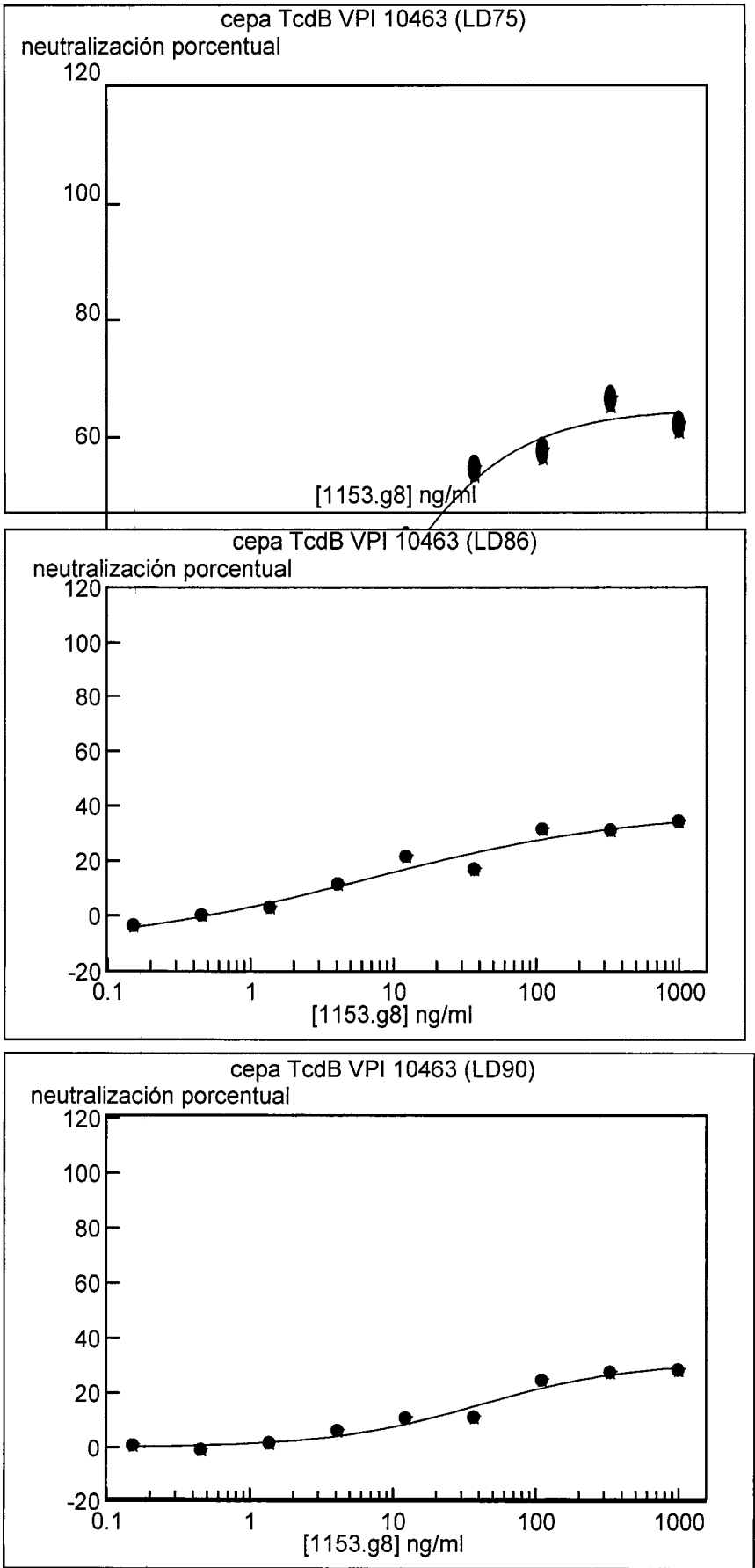


Figura 54 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)

247

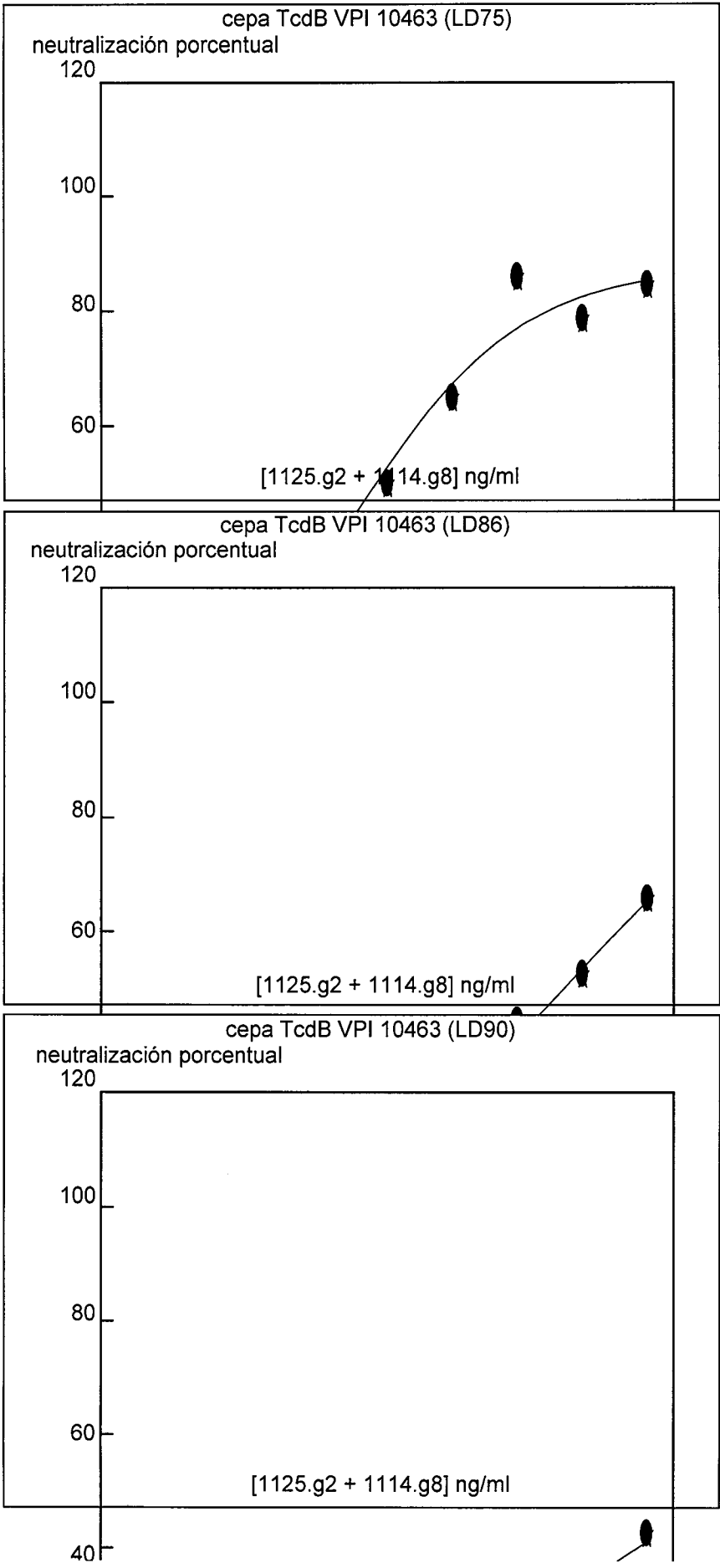


Figura 55 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)

150

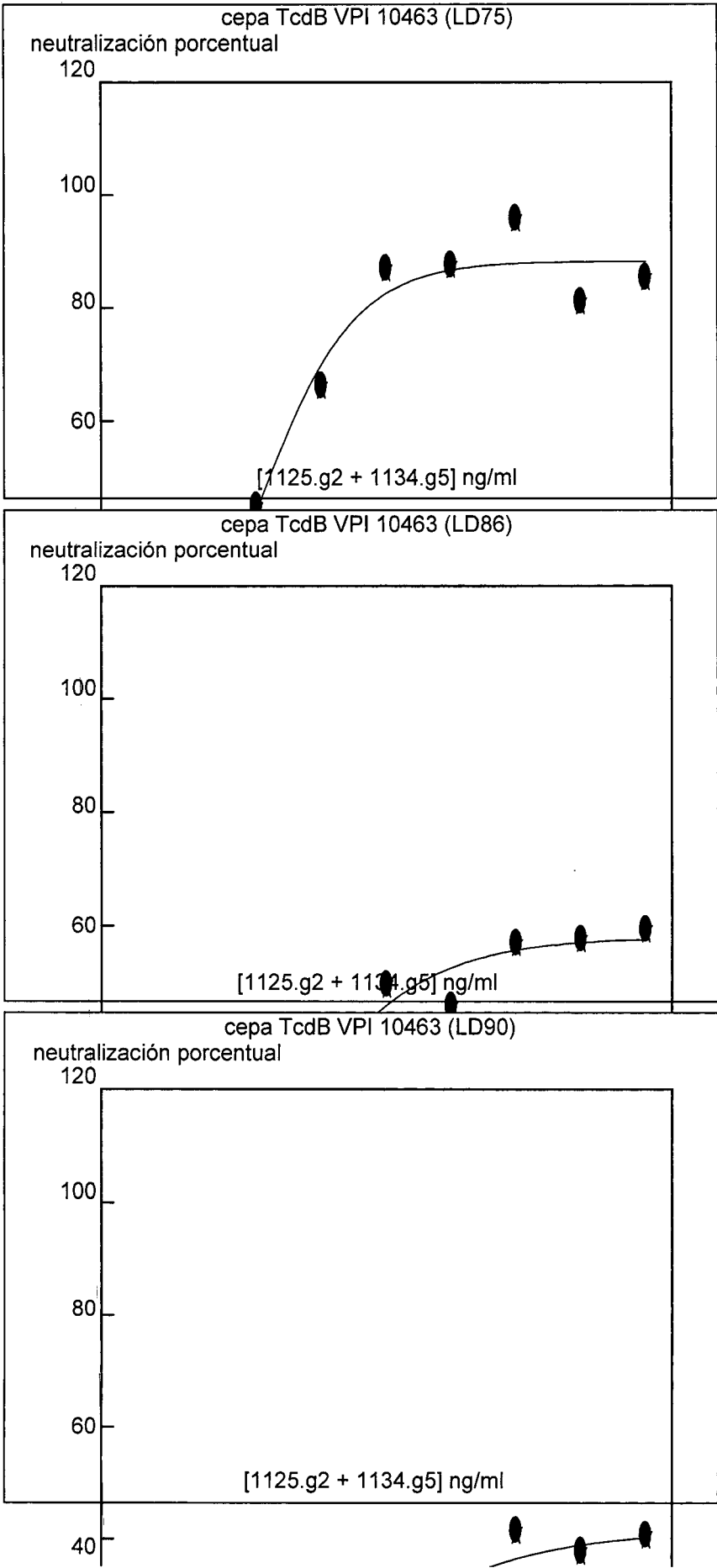
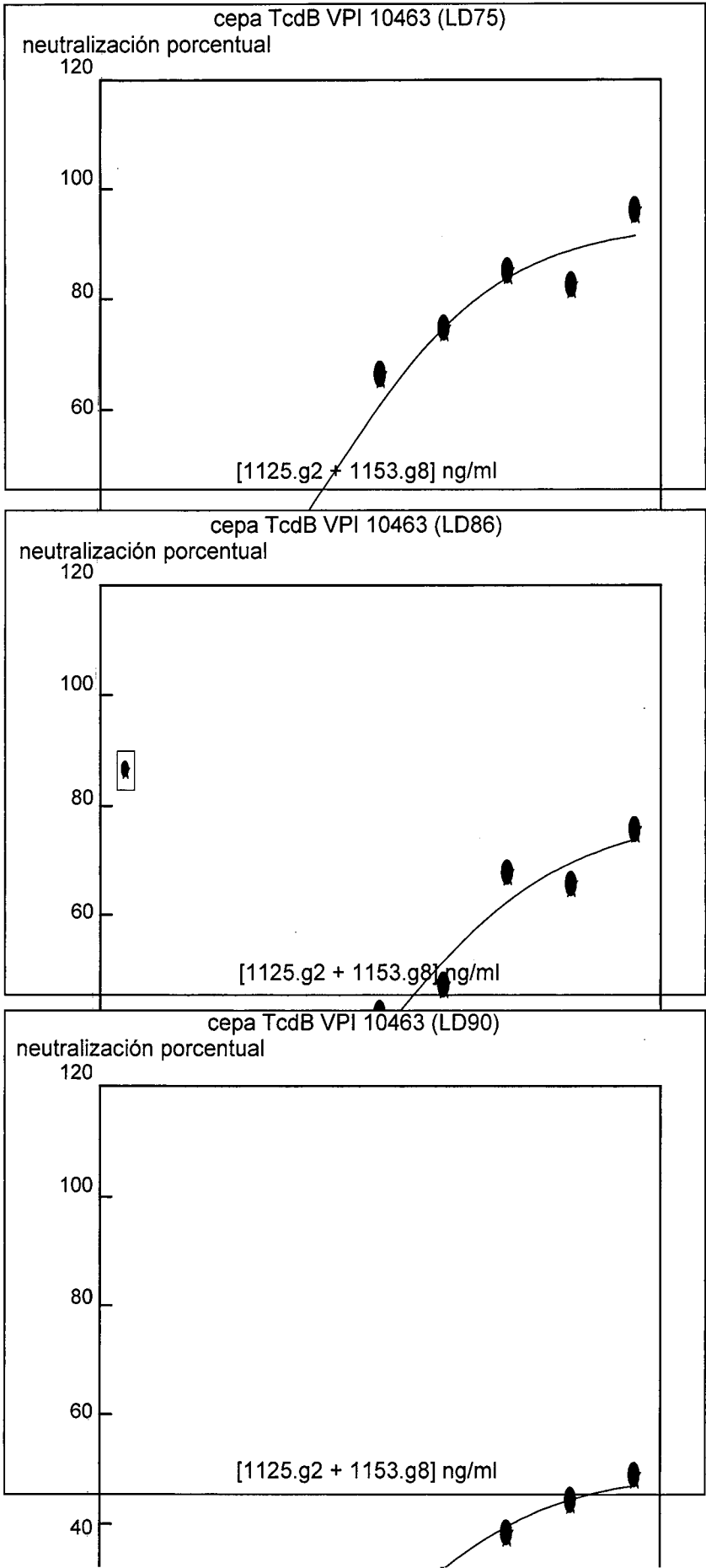


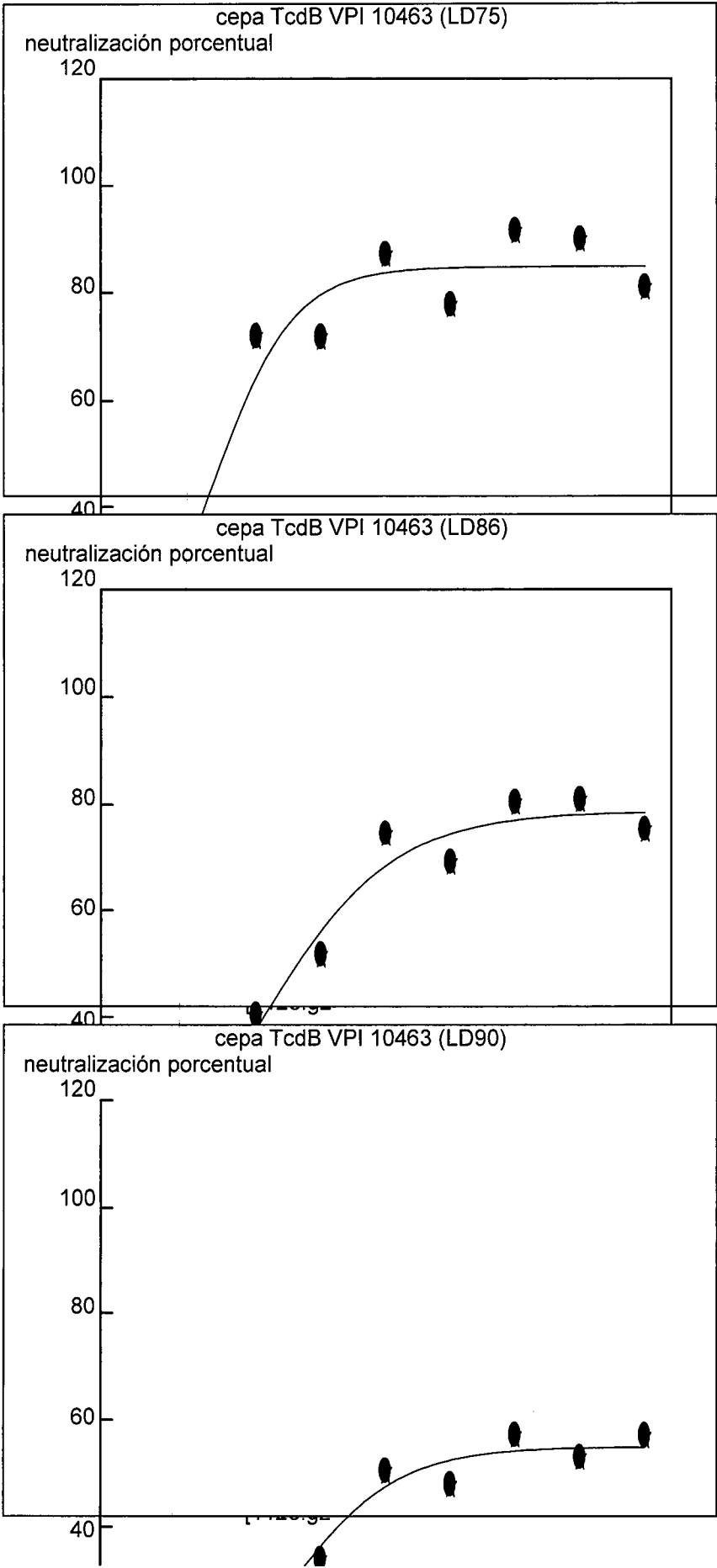
Figura 56 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)

154



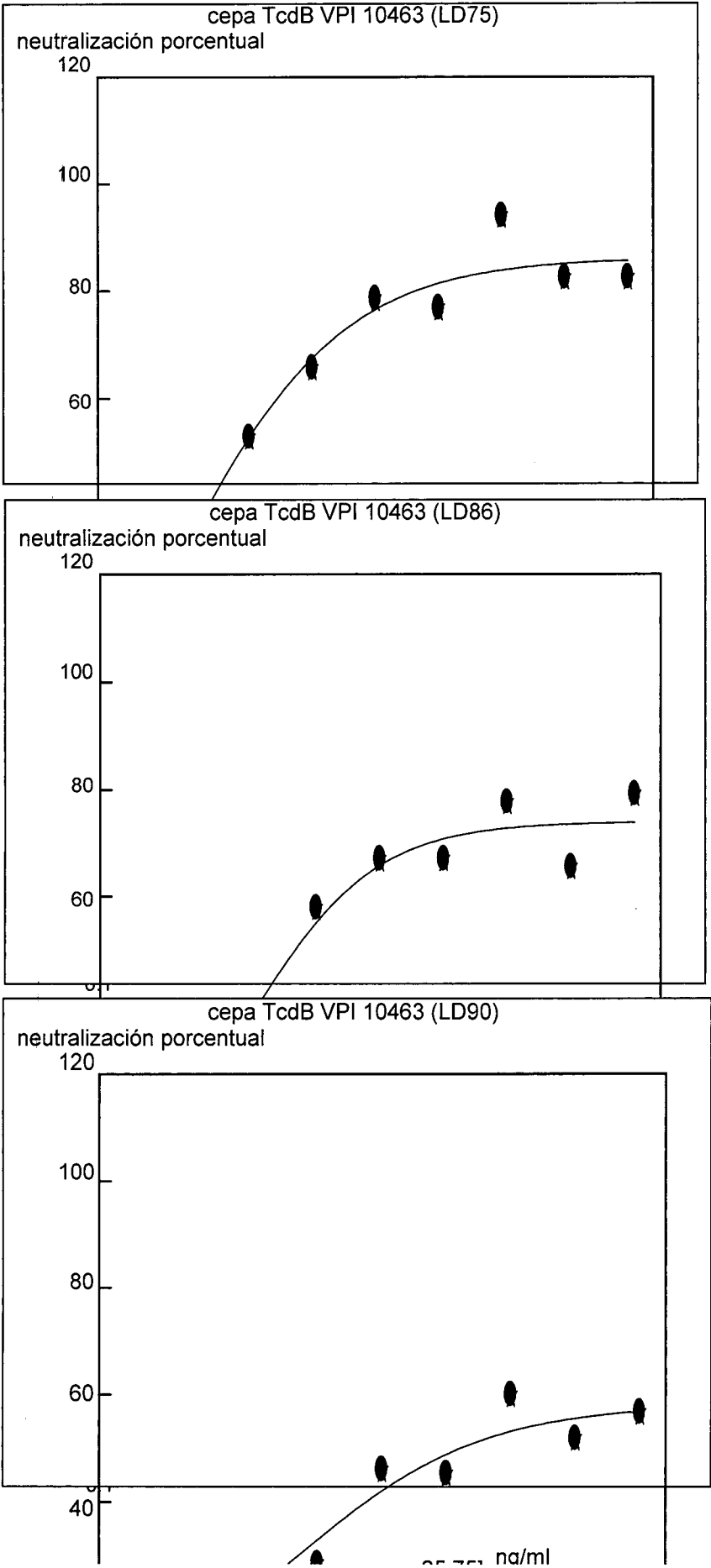
152
151

Figura 57 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)



152
153

Figura 58 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)



133
154

Figura 59 Neutralización de TcdB, anticuerpos individuales y en parejas, dosis de toxina variable (puenteado)

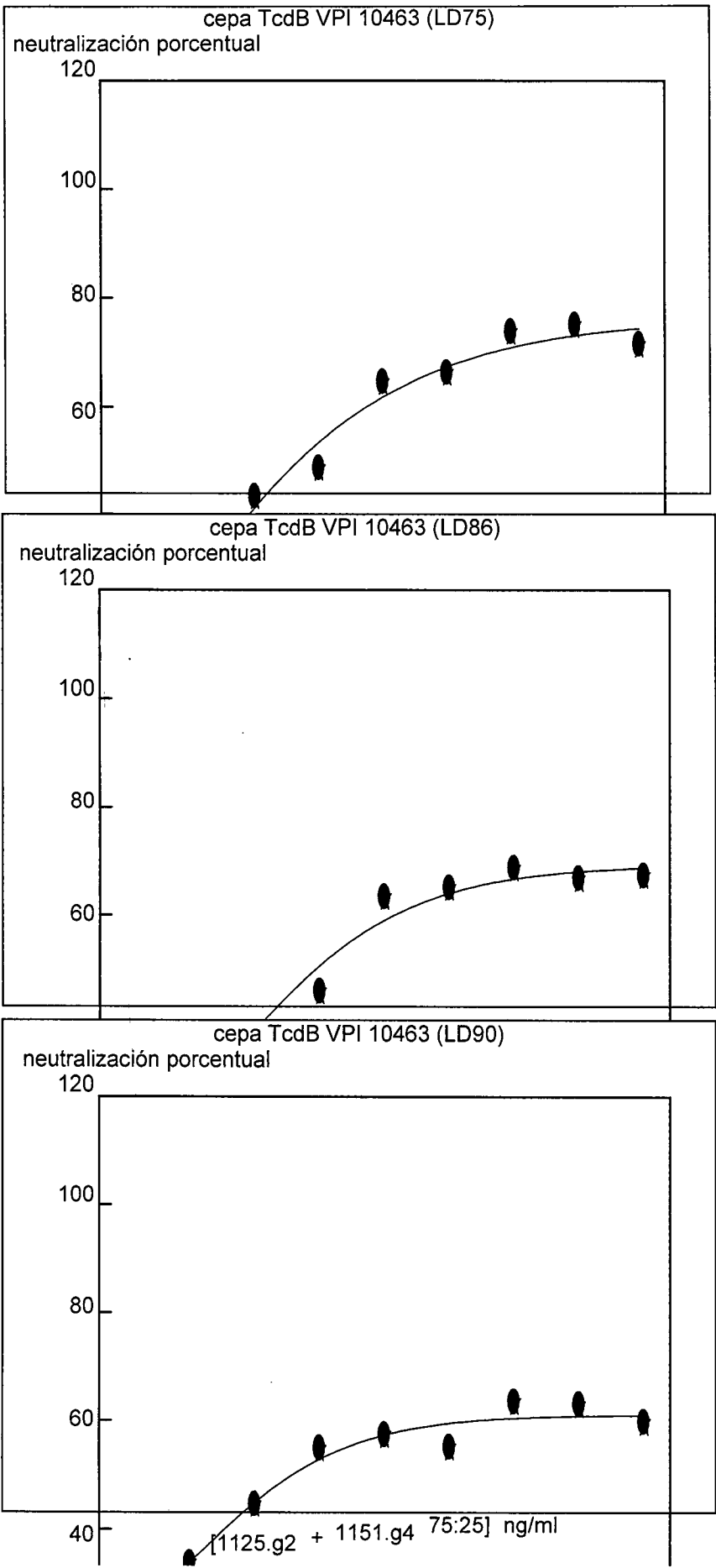


Figura 60 Secuencia de aminoácidos para TcdA SEQ ID NO: 171

MSLISKEELI KLAISIRPRE NEYKTILTNL DEYNKLTNN NENKYLQLKK LNESIDVFMN
 KYKTSSRNRA LSÑLKKDILK EVILIKNSNT SPVEKNLHFV WIGGEVSDIA LEYIKQWADI
 NAEYNIKLWY DSEAFVLNTL KKAIVESSTT EALQLLEEEI QNPQFDNMKF YKKRMEFIYD
 RQKRFINYYK SQINKPTVPT IDDIKSHLV SEYNRDETVL ESYRTNSLRK INSNHGIDIR
 ANSLFTEQEL LNIYSQELLN RGNLAAASDI VRLALKNFG GVYLDVDMLP GIHSDLFKTI
 SRPSSIGLDR WEMIKLEAIM KYKKYINNYT SENFDKLDQQ LKDNFKLIIE SKSEKSEIFS
 KLENLNVSDL EIKIAFALGS VINQALISKQ GSYLTNLVIE QVKNRYQFLN QHLNPAIESD
 NNFTDTTKIF HDSLFSATA ENSMFLTKIA PYLQVGFME ARSTISLSGP GAYASAYYDF
 INLQENTIEK TLKASDLIEF KFPENNLSQL TEQEINSLWS FDQASAKYQF EKYVRDYTGG
 SLSEDNGVDF NKNTALDKNY LLNNKIPSNN VEEAGSKNYV HYIIQLQGDD ISYEATCNLF
 SKNPKNSSIII QRNMNESAKS YFLSDDGESI LELNKYRIPE RLKNKEKVKV TFIGHGKDEF
 NTSEFARLSV DLSLSNEISSF LDTIKLDISP KNVEVNLLGC NMFSYDFNVE ETYPGKLLLS
 IMDKITSTLP DVNKNISITIG ANQYEVIRINS EGRKELLAHS GKWINKEEAI MSDLSKEYI
 FFDSIDNKLK AKSKNIPGLA SISEDIKTLL LDASVSPDTK FILNNLKLNI ESSIGDYIYY
 EKLEPVKNII HNSIDDLIDE FNLLNVSD ELYELKKLNNL DEKYLISFED ISKNNSTYSV
 RFINKSNGES VYVETEKEIF SKYSEHITKE ISTIKNSIIT DVNGNLLDNI QLDHTSQVNT
 LNAAFFIQSL IDYSSNKDVL NDLSTSVKVQ LYAQLFSTGL NTIYDSIQLV NLISNAVNDT

INVLPTITEG IPIVSTILDG INLGAAIKEL LDEHDPLLKK ELEAKVGVLA INMSLSIAAT
 VASIVGIGAE VTIFLLPIAG ISAGIPSLVN NELILHDKAT SVVNYFNHLS ESKKYGPLKT
 EDDKILVPID DLVISEIDFN NNSIKLGTCN ILAMEGGSGH TVTGNIDHFF SSPSISSHIP
 SLSIYSAIGI ETENLDFSCK IMMLPNAPSR VFWWETGAVP GLRSLNDGT RLLDSIRDLY
 PGKFYWRFYA FFDYAITTLK PVYEDTNIKI KLDKDTRNFI MPTITTNEIR NKLSYSFDGA
 GGTYSLLLSS YPISTNINLS KDDLWIFNID NEVREISIEN GTIKKGKLIK DVLSKIDINK
 NKLIIGNQTI DFSGDIDNKD RYIFLTCELD DKISLIIEIN LVAKSYSLLL SGDKNYLISN
 LSNTIEKINT LGLDSKNIAY NYTDESNNKY FGAISKTSQK SIIHYKKDSK NILEFYNDST
 LEFNSKDFIA EDINVFMKDD INTITGKYV DNNTDKSIDF SISLVSKNQV KVNGLYLINES
 VYSSYLDFVK NSDGHHTSN FMNLFLDNIS FWKLFGFENI NFVIDKYFTL VGKTNLGYVE
 FICDNNKNID IYFGEWKTSS SKSTIFSGNG RNVVVEPIYN PDTGEDISTS LDFSYEPLYG
 IDRYINKVLI APDLYTSLIN INTNYSNEY YPEIIVLNPN TFHKKVNINL DSSSFYKWS
 TEGSDFILVR YLEESNKKIL QKIRIKGILS NTQSFNKMSI DFKDIKKLSL GYIMSNFKSF
 NSENELDRDH LGFKIIDNKT YYYDEDSKLV KGLININNSL FYFDPIEFNL VTGWQTINGK
 KYYFDINTGA ALTSYKIING KHFFYNNDGV MQLGVFKGPD GFYFAPANT QNNNIEGQAI
 VYQSKFLTLN GKYYYFDNNS KAVTGWRIIN NEKYFNPNN AIAAVGLQVI DNNKYFNPD
 TAIISKGWQT VNGSRYFYDT DTAIAFNGYK TIDGKHFFYD SDCVVKIGVF STSNGFEYFA
 PANTYNNNIE GQAIYVQSKF LTLNGKKYYF DNNSKAVTGL QTIDSKYYF NTNTAEAATG
 WQTIDGKKYY FNTNTAEAAT GWQTIDGKKY YFNTNTAIAS TGYTIINGKH FYFNTDGIMQ

136
155

IGVFKGPNGF EYFAPANTDA NNIEGQAILY QNEFLTLNGK KYYFGSDSKA VTGWRIINNK
KYYFNPNNAI AAHLCTINN DKYYFSYDGI LQNGYITIER NNFYFDANNE SKMVTGVFKG
PNGFEYFAPA NTHNNNIEGQ AIVYQNKFLT LNGKKYYFDN DSKAVTGWQT IDGKKYYFNL
NTAEAAATGWQ TIDGKKYYFN LNTAEAAATGW QTIDGKKYYF NTNTFIASSTG YTSINGKHFY
FNTDGIMQIG VFKGPNGFEY FAPANTDANN IEGQAILYQN KFLTLNGKKY YFGSDSKAVT
GLRTIDGKKY YFNTNTAVAV TGWQTINGKK YYFNTNTSIA STGYTIISGK HFYFNTDGIM
QIGVFKGPDG FEYFAPANTD ANNIEGQAIR YQNRFLYLHD NIYYFGNNSK AATGWVTIDG
NRYYPFEPNTA MGANGYKTID NKNFYFRNGL PQIGVFKGSN GFEYFAPANT DANNIEGQAI

RYQNRFLHLL GKIYYFGNNS KAVTGWQTIN GKVYYFMPDT AMAAAGGLFE IDGVIYFFGV
DGVKAPGIYG

Figura 61 Secuencia de aminoácidos para TcdB SEQ ID NO: 172

MSLVNRKQLE KMANVRFRTO EDEYVAILDA LEEYHNMSSEN TVVEKYLKLE DINSLTDIYI
DTYKKSGRNL ALKKFKEYLV TEVLELKNNN LTPVEKNLHF VWIGGQINDT AINYINQWKD
VNSDYNVNVF YDSNAFLINT LKKTVVESAI NDTLESFREN LNDPRFDYNK FFRKRMEIYI
DKQKNFINYY KAQREENPEL IIDDIVKTYL SNEYSKEIDE LNTYIEESLN KITQNSGNDV
RNFEEFKNGE SFNLYEQELV ERWNLAASD ILRISALKEI GGMVLDVDMLE PGIQPDLFES
IEKPSSVTVD FWEMTKLEAI MKYKEYIPEY TSEHFDMLDE EVQSSFESVL ASKSDKSEIF
SSLGDMEASP LEVKIAFNSK GIINQGLISV KDSYCSNLIV KQIENRYKIL NNSLNPAISE
DNDFNNTTNT FIDSIMAEAN ADNGRFMMEL GKYLVRGFFP DVKTTINLSG PEAYAAAYQD
LLMFKEGSMN IHLIEADLRN FEISKTNISQ STEQEMASLW SFDDARAKAQ FEYKRNIFYE
GSLGEDDNLDF SQNIVVDKE YLLEKISSLA RSSERGIYHY IVQLQGDKIS YEACNLFAK
TPYDSVLFQK NIEDSEIAYY YNPGDGEIQE IDKYKIPSII SDRPKIKLTF IGHGKDEFNT
DIFAGFDVDS LSTEIEAAID LAKEDISPKE IEINLLGCNM FSYVINVEET YPGKLLLKVK

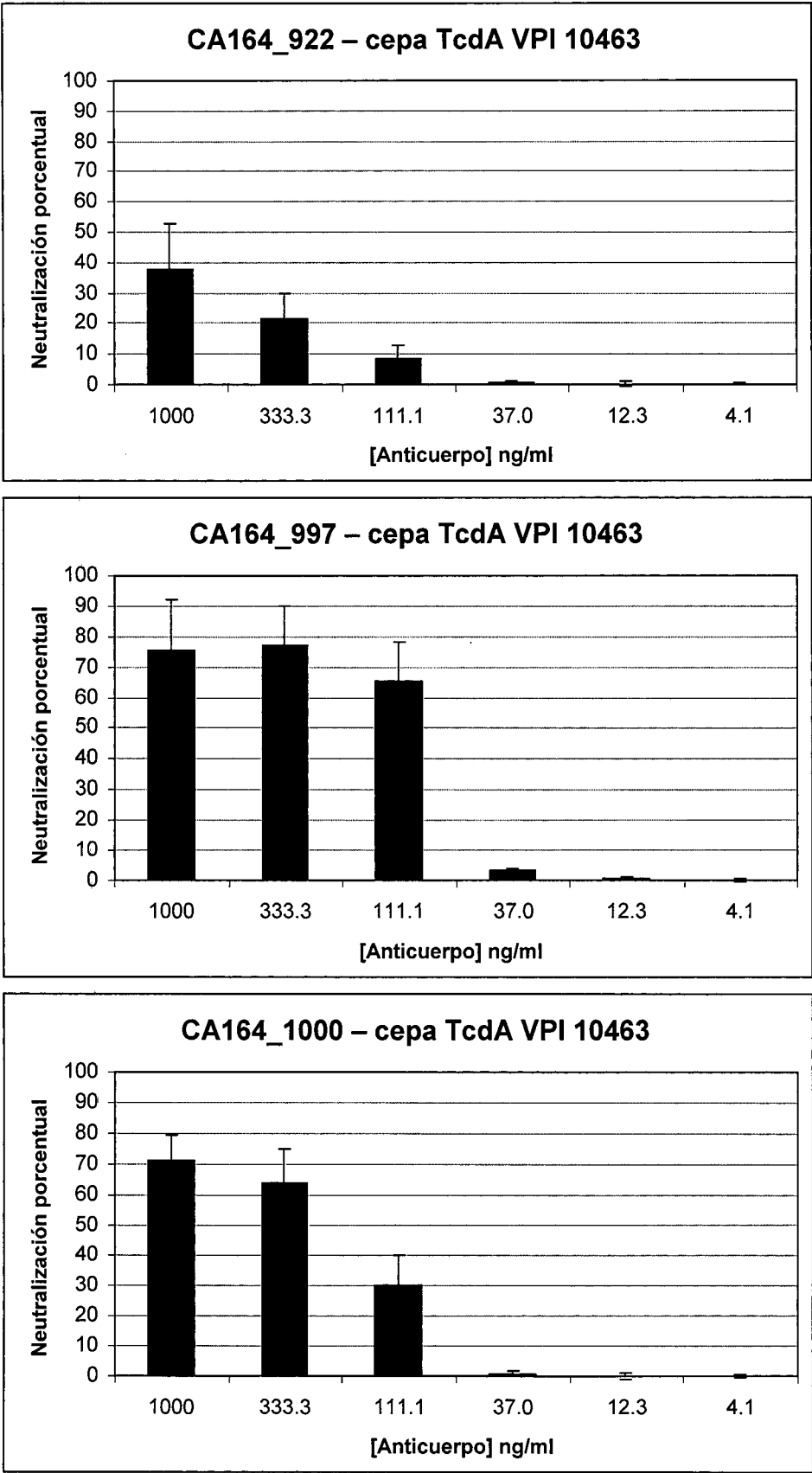
DKISELMPSI SQDSIIVSAN QYEVRLNSEG RRELLDHSGE WINKEESIIE DISSKEYISF
NPKENKITVK SKNLPELSTL LQEIERNNSNS SDIELEEKVM LTECEINVIS NIDTQIVEER
IEEAKNLTSD SINYIKDEFK LIESISDALC DLKQQNELED SHFISFEDIS ETDEGFSIRF
INKETGESIF VETEKTIFFSE YANHITTEIS KIKGTIFDTV NGKLVKKVNL DTTHEVNTLN
AAFFIQSLIE YNSSKESLSN LSVAMKVQVY AQLFSTGLNT ITDAAKVVEL VSTALDETID
LLPTLSEGLP IIATIIDGVS LGAAIKELSE TSDPLLRQEI EAKIGIMAVN LTTATTAIIT
SSLGIASGFS ILLVPLAGIS AGIPSLVNE LVLRDKATKV VDYFKHVSLV ETEGVFTLLD
DKIMMPQDDL VISEIDFNNN SIVLGKCEIW RMEGGSGHTV TDDIDHFFSA PSITYREPHL

SIYDVLEVQK EELDLSKDLM VLPNAPNRVF AWETGWTPGL RSLENDGTKL LDRIRDNYEG
EFYWRYFAFI ADALITTLKP RYEDTNIRIN LDSNTRSFIV PIITTEYIRE KLSYSFYGSG
GTYALSLSQY NMGINIELSE SDVWIIDVDN VVRDVTIESD KIKKGDIEG ILSTLSIEEN
KIILNSHEIN FSGEVNGSNG FVSLTFSILE GINAIIEVDL LSKSYKLLIS GELKILMLNS

NHIQQKIDYI GFNSELQKNI PYSFVDSEGK ENGFINGSTK EGLFVSELPD VVLISKVYMD
DSKPSFGYYS NNLKDVKVIT KDNVNILTGY YLKDDIKISL SLTLQDEKTI KLNSVHLDLDES
GVAEILKFMN RKGNTNTSDS LMSFLESMNI KSIFVNFLQS NIKFILDANF IISGTTSIGQ
FEFICDENDN IQPYFIKFNT LETNYTLYVG NRQNMIVEPN YDLDDSGDIS STVINFSQKY
LYGIDSCVNK VVISPNIYTD EINITPVYET NNTYPEVIVL DANYINEKIN VNINDLSIRY
VWSNDGNDFI LMSTSEENKV SQVKIRFVNV FKDKTLANKL SFNFSDKQDV PVSEIILSFT
PSYYEDGLIG YDLGLVSLYN EKFYINNFGM MVSGLIYIND SLYYFKPPVN NLITGFVTVG
DDKYYFNPIN GGAASIGETI IDDKNYYFNQ SGVLQTGVFS TEDGFKYFAP ANTLDENLEG
EAIDFTGKLI IDENIYYFDD NYRGAVEWKE LDGEMHYFSP ETGKAFKGLN QIGDYKYYFN
SDGVMQKGFV SINDNKHYFD DSGVMKVGYT EIDGKHFYFA ENGEMQIGVF NTEDGFKYFA
HHNEDLGNEE GEEISYSGIL NFNNKIYYFD DSFTAVVGWK DLEDGSKYYF DEDTAEAYIG
LSLINDGQYY FNDDGIMQVG FVTINDKVFY FSDSGIIESG VQNIDDNYFY IDDNGIVQIG
VFDTSDGYKY FAPANTVNDN IYQAVEYSG LVRVGEDVYY FGETYTIETG WIYDMENESD
KYYFNPETKK ACKGINLIDD IKYYFDEKGI MRTGLISFEN NNYYFNENGE MQFGYINIED
KMFYFGEDGV MQIGVFNTPD GFKYFAHQNT LDENFEGESI NYTGWLDLDE KRYYFTDEYI
AATGSVIIDG EEYYFDPDTA QLVISE

157
~~158~~

Figura 62 Datos de monocapa Caco-2 (Resistencia Eléctrica Trans-Epitelial) – TcdA



158
AST

Figura 62A

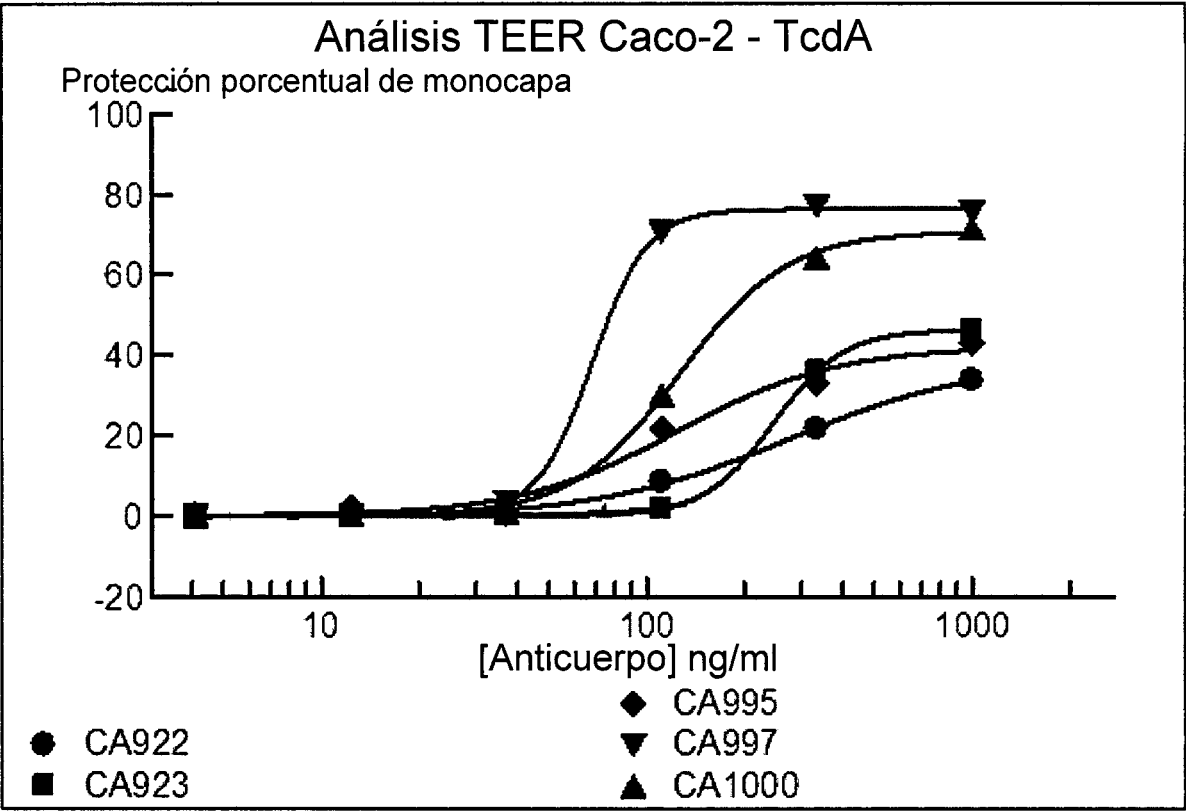


Figura 63

Supervivencia de hámsteres luego de la prueba de provocación con *Clostridium difficile*.

Mezcla de 3 Mab con dosis alta y baja de UCB: CA997.g1 (50%), CA1125.g2 (25%) y CA1151.g4 (25%) vs controles

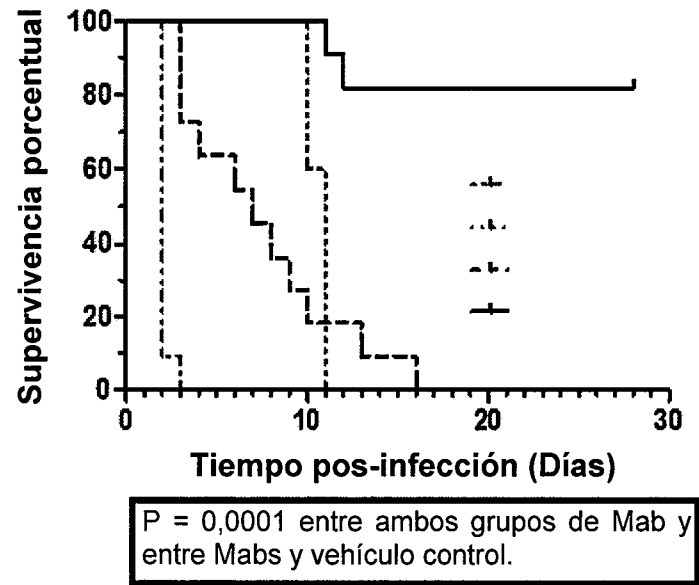
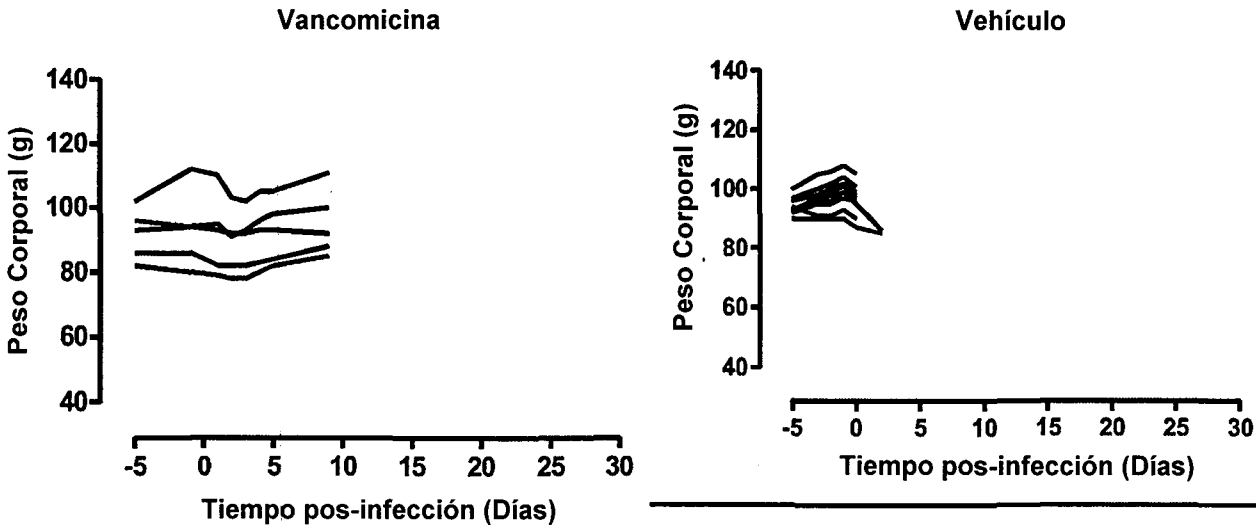


Figura 64 Variaciones en peso corporal de los hámsteres



462

Figura 65

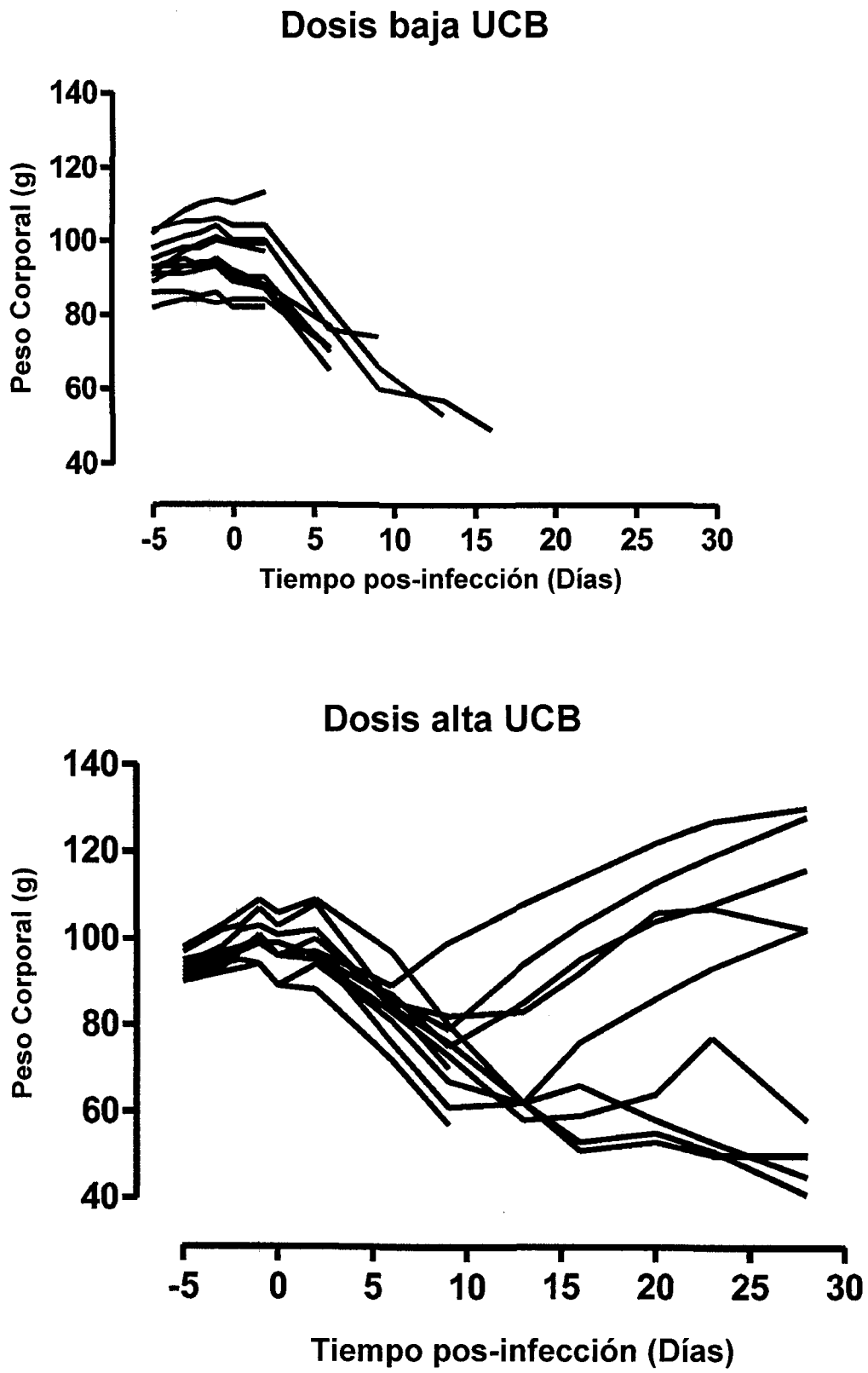


Figura 66

Control PBS

Dosis alta UCB



Figura 67 Farmacocinética del suero de una IgG1 humana en ratones y hámsteres

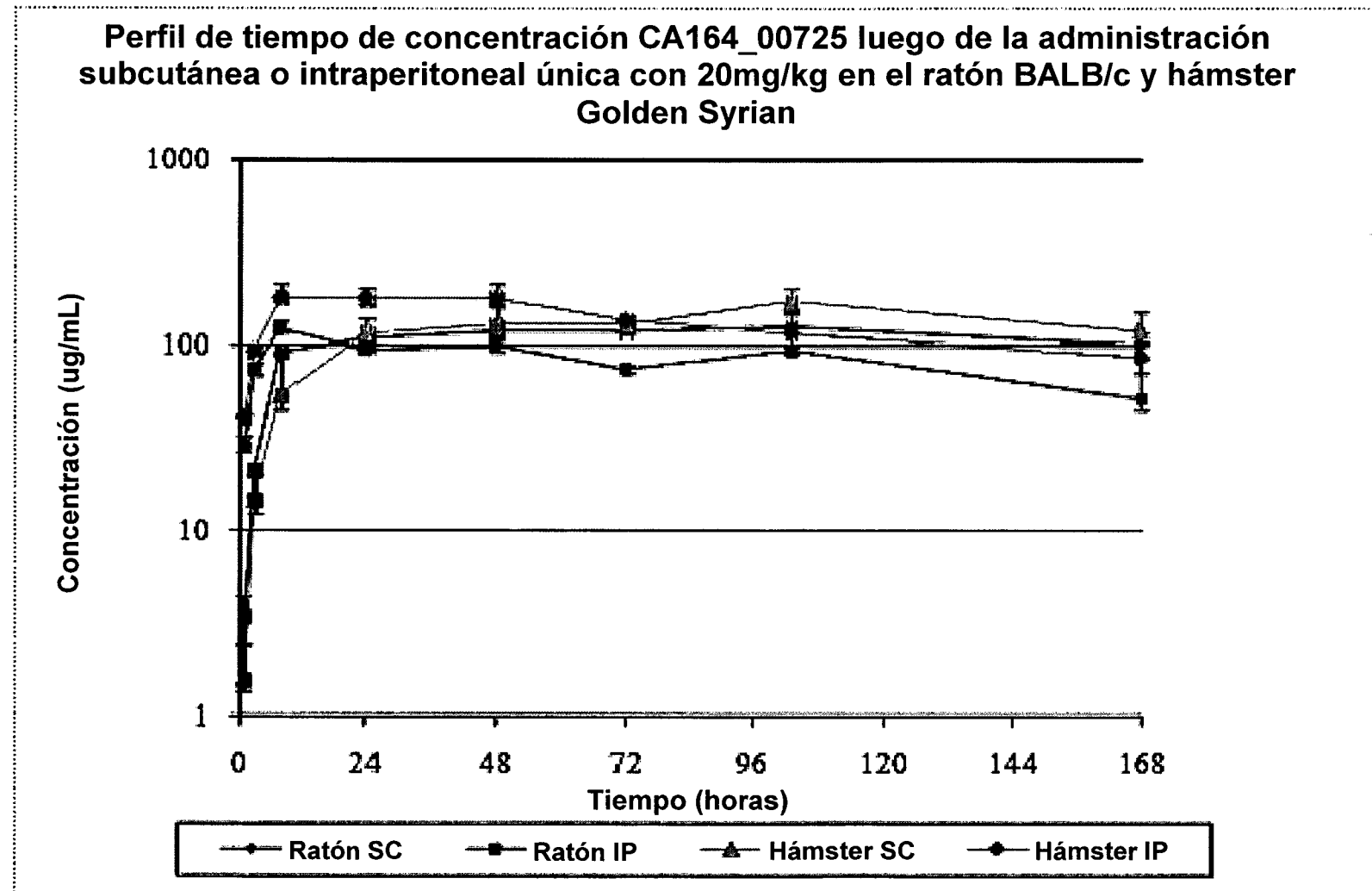


Figura 68 Efecto de la Agitación *mediante* Mezcla Vorticial sobre Moléculas IgG1 anti-TcdB en PBS, pH 7,4 (n=3)

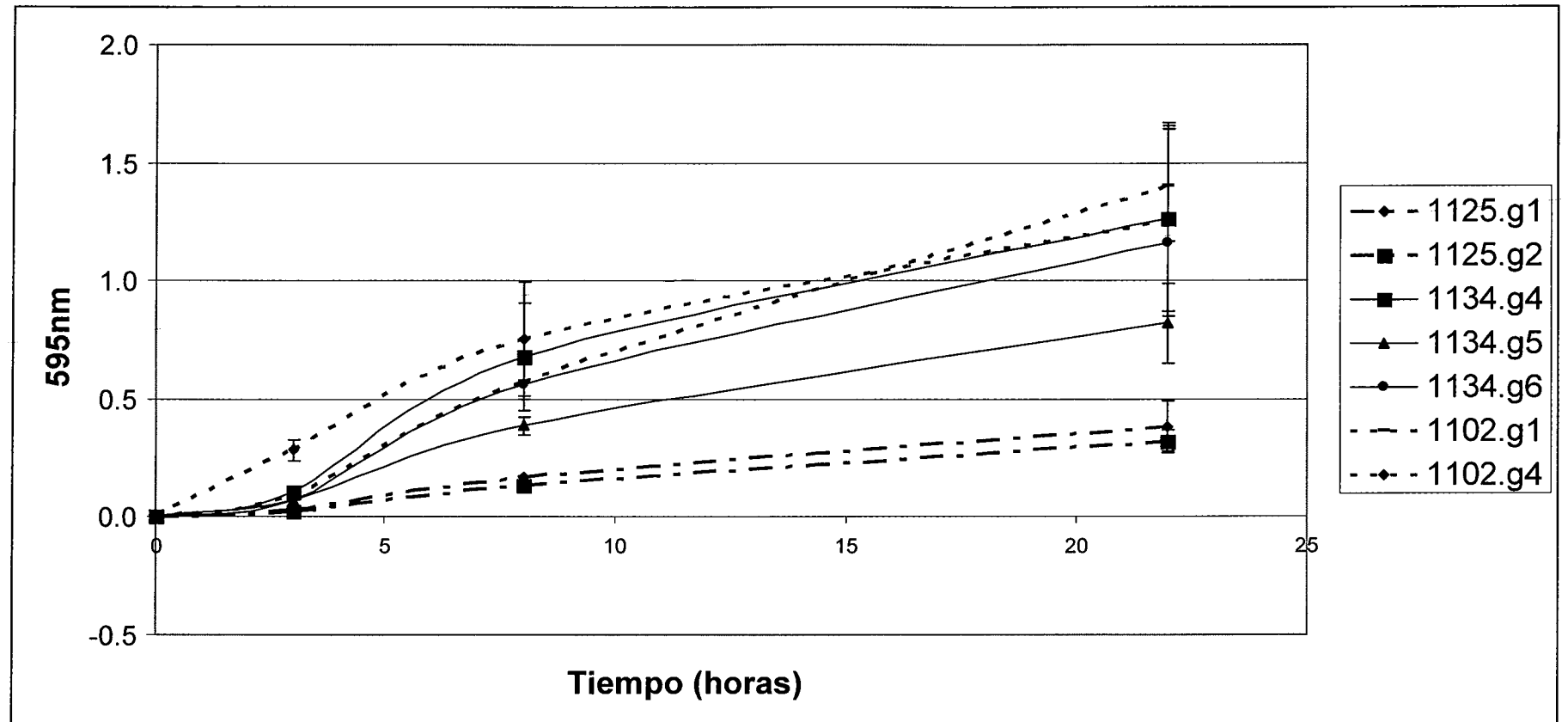
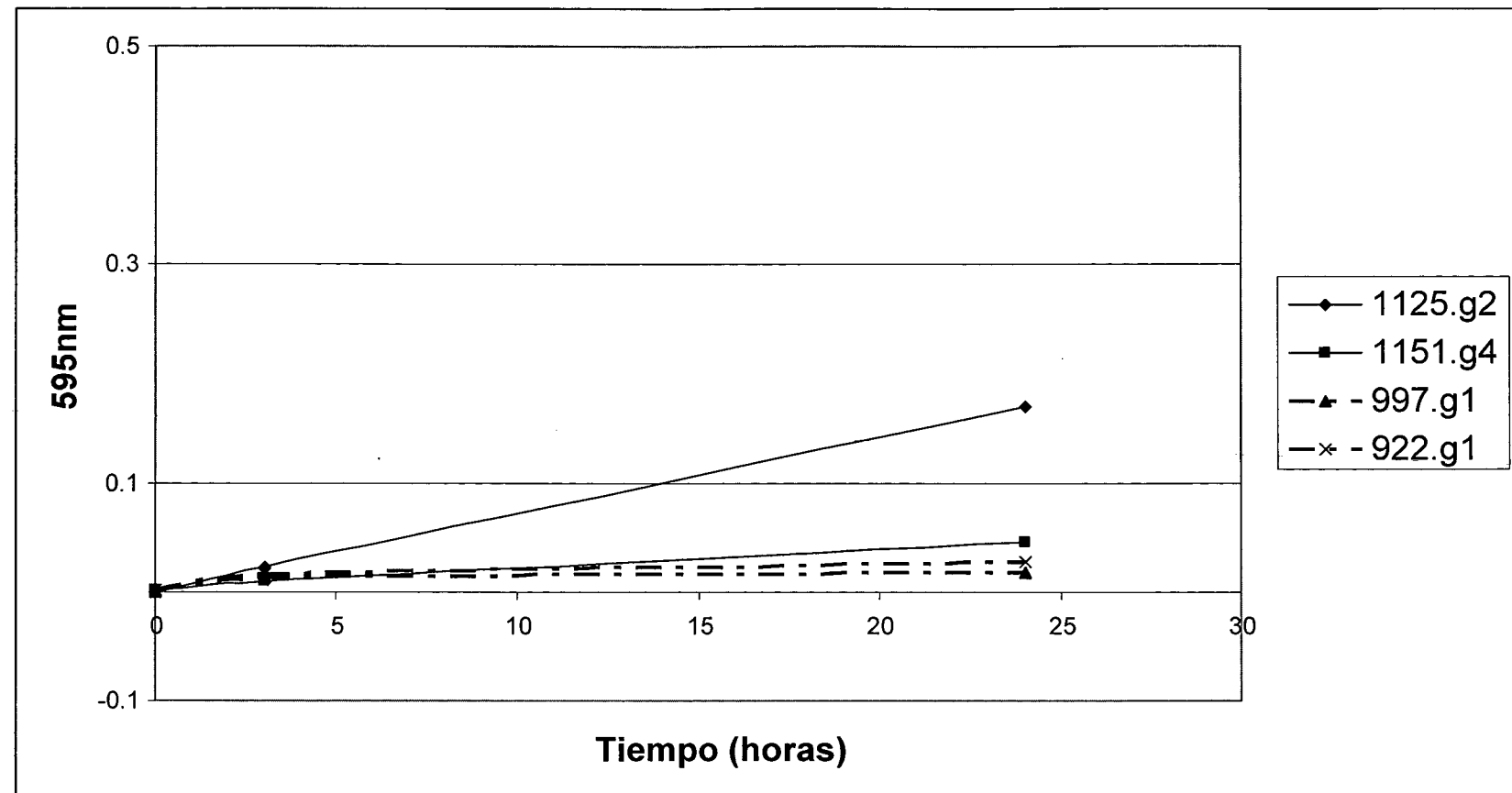


Figura 69: Comparación de la Estabilidad de Agregación de Moléculas IgG1 anti-TcdA y anti-TcdBof en PBS pH 7,4



166
169

Figura 70 Neutralización contra el ribotipo 003

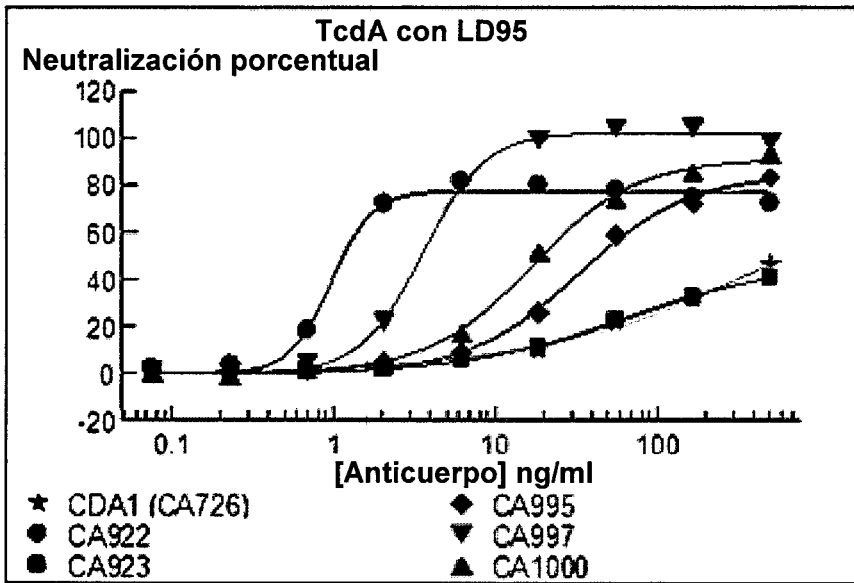
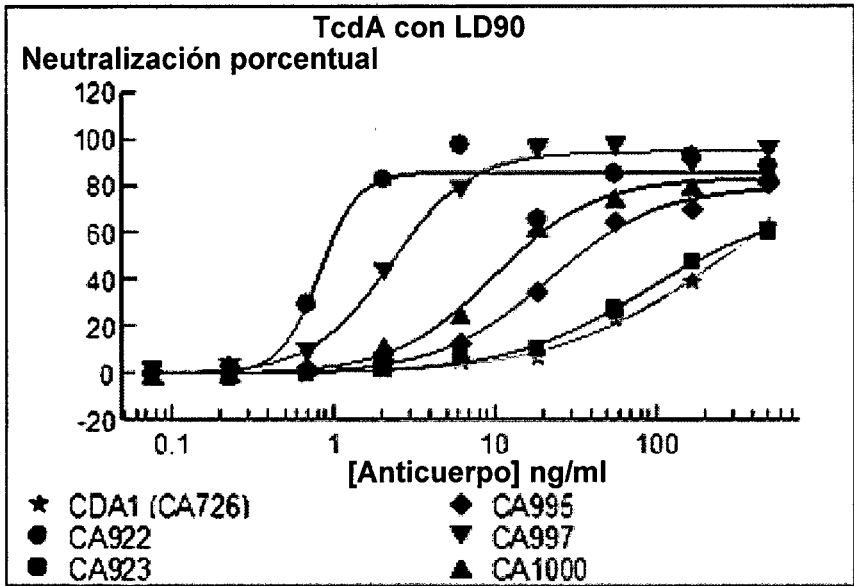
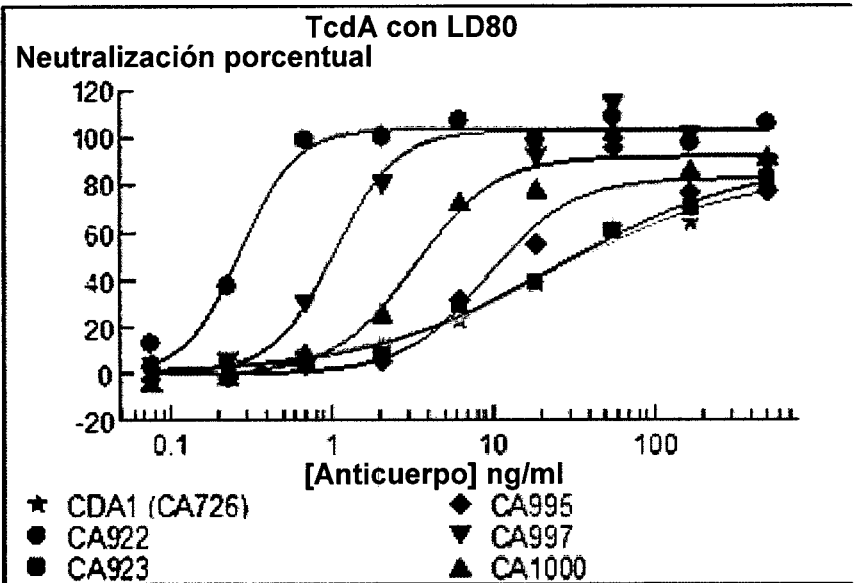


Figura 71 Neutralización contra el ribotipo 003

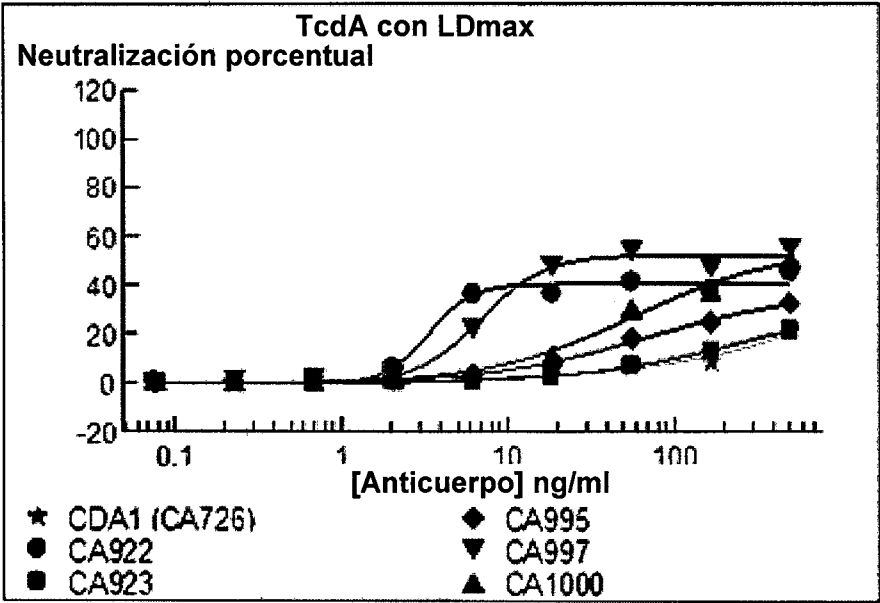
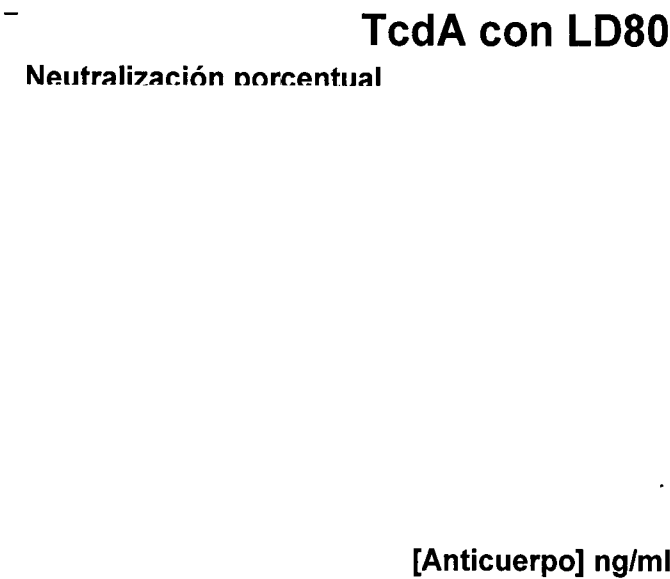


Figura 72 Neutralización contra el ribotipo 027



162
~~160~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
SEQUENCE LISTING

<110> UCB Pharma S.A.
<120> Antibodies capable of neutralising the major exotoxins TcdA and TcdB of Clostridium difficile
<130> G0159-W0
<150> US 61/535,532
<151> 2011-09-16
<150> US 61/638,731
<151> 2012-04-26
<160> 194
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Antibody CDR
<400> 1
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Antibody CDR
<400> 2
Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Antibody CDR
<400> 3
Gln Tyr Thr His Tyr Ser His Thr Ser Lys Asn Pro
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Antibody CDR
<400> 4
Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

168
~~167~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 5

Ile Ile Ser Ser Gly Gly His Phe Thr Trp Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 6

Ala Tyr Val Ser Gly Ser Ser Phe Asn Gly Tyr Ala Leu
1 5 10

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial

169
~~170~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Polynucleotide encoding variable region of anti-TcdA antibody
922.g1

<400> 8
gaccctgtga tgacccagag tccgagcact ctttctgcct ccgtgggaga ccgcgtgacc 60
attacatgtc aggcttcaca aagtatctcc aatgctctgg cctggatatca gcagaaaccc 120
ggcaaagccc ctaagctgct catctactct gcatcaagcc tggctagcgg cgtgccaagc 180
cgattcaagg ggagcgggttc tggcactgag ttacgctga ccatcagtag cttgcagcct 240
gacgattttg caacctatta ctgccagtac acacactact cccatacatc taaaaaccca 300
ttcggagggg gtactaaggt cgaaataaag 330

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

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 922

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ile Ile Ser Ser Gly Gly His Phe Thr Trp Tyr Ala Asn Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95
Ala Tyr Val Ser Gly Ser Ser Phe Asn Gly Tyr Ala Leu Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 10
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding variable region of anti-TcdA antibody
922 (heavy chain variable region)

<400> 10
gaagtgcaat tgggtggaaag tggcggagga ctggtgcaac ccgggggtag tctgcgactg 60
agctgtgctg cctccggctt taccattagc tcctactata tgagctgggt tcgacaggcc 120
cctggaaaag gactcgaatg gatcggcatc atatcttccg gtgggcattt cacctgggtac 180

120
121

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

gcaaactggg ctaaggggag attcacgatt agcagcgact ccacaaccgt gtacctgcaa 240
atgaacagcc tgagggatga ggacactgcc acatatttct gcgcacgcgc ttacgtgagc 300
ggaagctcat ttaatggcta tgcactgtgg gggcaaggaa cactcgtgac tgtctcg 357

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 11

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

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 12

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 13

Gln Tyr Ser His Tyr Gly Thr Gly Val Phe Gly Ala
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 14

Ala Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 15

Ile Ile Ser Ser Gly Ser Asn Ala Leu Lys Trp Tyr Ala Ser Trp Pro

171
~~172~~

1 5 LIST SEC COLO-17184-841-001-4 15
10

Lys Gly

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 16

Asn Tyr Val Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
1 5 10

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

<220>
<223> Anitbody ariable region of anti-TcdA antibody 923

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA antibody 923.g1

<400> 18

gacgtcgtga tgactcagag cccatctagt ctgagcgcta gcgtcggaga ccgagtcaca 60
attacctgtc aagcctccca gagcatctcc aactacctgg cctggtacca acagaaacct 120
ggcaaggtgc ccaagctgct gatctatagt gcttccacac tcgcaagcgg cgttccgtca 180

172
~~173~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
cgctttaagg gatctggctc tggcactcag ttcaccttga cgatctcaag cctgcagcca 240
gaagatgtgg ccacctatta ctgccagtat tcccactacg ggactgggggt gttcggtgcc 300
tttggagggtg ggaccaaagt ggagataaag 330

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 923

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 20
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA
antibody 923.g1

<400> 20
gaagttcaac ttgtggaatc tggaggcggg ctcgtgcagc ctggtggaag ccttagactg 60
agctgcgctg catccgcatt ttccctgtcc aactactaca tgagctgggt gcgacaagca 120
ccaggcaagg gactggaatg gattggcatc ataagctccg gttccaatgc cctgaaatgg 180
tacgcatcat ggccgaaagg ccgctttacc ataagcaagg actccaccac cgtctatctg 240
cagatgaact cattgcgtgc cgaggacact gcaacgtact tctgtgctcg caactacgtg 300
ggaagcggat cttattatgg catggatctg tggggacaag gtacactcgt gaccgtctcg 360

<210> 21
<211> 11
<212> PRT

123
124

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 21

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

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 22

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 23

Gln Cys Thr Asp Tyr Ser Gly Ile Tyr Phe Gly Gly
1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 24

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 25

Ile Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Thr Phe Thr Trp Tyr Ala Ser Trp
1 5 10 15

Ala Lys Gly

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR
<400> 26

Ala Tyr Val Gly Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Asp Pro
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 993
<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA antibody 933.g1

<400> 28
gatgtcgtga tgactcagtc cccctctaca ttgagtgcct ctgtcgggtga tcgagttacc 60
atcacctgtc aagcaagcca gagcatcagc tcctacttct cttggtacca gcaaaagccg 120
ggaaaagccc ctcaactgct gatttatggg gcctcaacac tggcttctgg cgtgccatca 180
agattcaagg gatctggctc cggcactgag cttacactga ccattagctc cctgcaacct 240
gacgattttg ctacctacta ctgccagtgc accgactata gtgggatata tttcggcgga 300
tttgggggag ggacgaaagt ggaaatcaag 330

<210> 29
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

174

175

126
(75)

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 993 (heavy chain)

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 30
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA antibody 993.g1

<400> 30
gaagttcagc tggctcgagag cggaggcgga ctggtgcaac ctggtggtag cctgaaactc 60
tcttgtagctg cctccggggtt ttccctgagc tcttactata tgtcatgggt gagacaggct 120
cccgggaaag gattggaatg gatcgggatt atctcctccg gctcttccac cactttcaca 180
tggtacgcct catgggcaaa ggggaggttt accataagca agacaagcac gaccgtgtat 240
cttcagatga actccctgaa gacggaggat actgccacct acttttgcg tcgggcctat 300
gtgggctcaa gctcttacta tggcttcgac ccatggggac agggcacact tgtgaccgtc 360
tcg 363

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 31

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

176
177

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 32

Gly Ala Ala Asn Leu Ala Ser
1 5

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 33

Gln Asn Asn Tyr Gly Val His Ile Tyr Gly Ala Ala
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 34

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Asp Met Ile
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 35

Phe Ile Asn Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 36

Val Asp Asp Tyr Ile Gly Ala Trp Gly Ala Gly Leu
1 5 10

<210> 37
<211> 110
<212> PRT

118
177

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 995

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Poly nucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA antibody 995. g1

<400> 38

gacgtcgtga tgacacagag cccttcaaca ctgtctgcaa gcgtgggcga tagggtcacc 60

ataacgtgcc aggcctctca atccatcaac aactatttta gctggtacca gcagaagcca 120

ggcaaggctc cgaaacttct gatctacgga gctgccaaacc tggcaagtgg cgtgccatca 180

cggttcaagg gatccgggag cggtactgag tataccctga ccatttcac tctccaaccc 240

gacgatttcg ccacctactc ctgccagaat aattacggcg tgcacatcta tggagctgcc 300

tttggcgggtg ggacaaaagt ggaaattaag 330

<210> 39

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 995 (heavy chain)

<400> 39

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

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

128
177

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 40
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA antibody

<400> 40
gaagttcagc tggctcgagag tgggggaggg cttgtgcaac ctggtggctc cctccgtctg 60
agctgtactg cttctggatt ctactgagc aattacgaca tgatctgggt gcgacaggca 120
cccggcaaag gactggagta cattggcttc atcaacaccg ggggtataac gtactatgcc 180
tcatgggcta aggggcgctt tacaattagt agggattcct ctaccgtgta cctgcagatg 240
aactcactga gagccgagga cactgccaca tatttctgcg ctcggttgga tgactatatc 300
ggggcctggg gcgccggatt gtggggccaa ggaacactgg tcaccgtctc g 351

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 41

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 42

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

179
~~180~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 43

Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Asn Asp Asp Gly Ile Ala
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 44

Gly Ile Asp Leu Ser Ser His His Met Cys
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 45

Val Ile Tyr His Phe Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 46

Ala Ser Ile Ala Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Pro
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 997

<400> 47

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

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

180
181

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

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

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

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

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

<210> 48
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for
anti-TcdA antibody 997.g1

<400> 48
gcactcgtga tgacacagag cccgagtagc tttagtgcct caaccggtga tagggtcact 60
attacttgcc aagcctctca gagtatatct agctatctga gctggtagca gcaaagccc 120
gggaaggctc ctacttgct gatctaccgg gcttccacat tggcctccgg cgttcctca 180
cgcttttagcg gctccggatc cggaaccgag tacaccctga ctatctcttg cctgcaatct 240
gaggacttcg caacctacta ttgtctgggc gtctacggat atagcaacga tgacgggatc 300
gccttcggcg gcggtaccaa agtggaaatt aag 333

<210> 49
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 997 (heavy chain)

<400> 49

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

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

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

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

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

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

181
102

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

Val Thr Val Ser
115

<210> 50
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for
anti-TcdA anitbody 997.g1 (heavy chain)

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

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 51

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 52

Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 53

Gln Gly Asn Ala Tyr Thr Ser Asn Ser His Asp Asn Ala
1 5 10

182
403

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 54

Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asp Ala Val Gly
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 55

Ile Ile Ala Thr Phe Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 56

Thr Gly Ser Trp Tyr Tyr Ile Ser Gly Trp Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Leu

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

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 1000

<400> 57

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

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

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

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

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

184
183

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

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

<210> 58
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA antibody 1000.g1

<400> 58
gaaatcgtga tgacgcagtc accaagcaca ctgagcgctt ctgtgggaga tcgggtcaca 60
ataacctgtc aggcctccca gagcatctac tcttatctgg catggtacca gcagaagcca 120
gggaaagctc ccaagctgct gatttatgac gccagcactt tggcttccgg tgttcctagt 180
aggttcaaag gctccggaag cggtaccgag tttaccctga ccatctcatc tctgcaaccc 240
gatgactttg ccacatacta ttgccagggg aatgcctaca cttccaactc acacgacaac 300
gcattcgggg gaggcaccaa agtcgaaatt aag 333

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

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdA antibody 1000 (heavy chain)

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

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

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

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

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

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

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

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

184
185

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<210> 60
<211> 375
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdA antibody 1000.g1 (heavy chain)

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

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 61

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Leu Met His
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 62

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 63

Gln Gln Thr Trp Asn Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

185
160

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala
1 5 10

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 65

Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 66

Val Ile Arg Gly Tyr Val Met Asp Ala
1 5

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 926

<400> 67

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

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

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

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

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

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

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

186
107

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<210> 68
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 926.g1

<400> 68
gataccgtgc tgaccagag ccctgctaca ttgtcactga gccccgggga gagggccaca 60
ttgagctgcc gggcttcaaa atccgtgtcc accctcatgc actggtttca gcaaaagccc 120
gggcaggccc caaaactgct gatctacctc gcatctaacc ttgaatctgg cgtgccggcc 180
cgcttttagtg gctccggaag cggaaccgac ttcacactga cgattagctc cctggagcct 240
gaggatttcg ccgtgtacta ttgccagcaa acttggaatg acccttggac tttcgggggc 300
ggtactaagg tcgaaataaa g 321

<210> 69
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 926 (heavy chain)

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 70
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 926.g1 (heavy chain)

187
188

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<400> 70
gaggtggaac tgctcgaatc tgggtggtggg ctggtgcagc ccggtggatc tctgagattg 60
tcatgcgagg catccggctt taccttttcc aactacggaa tggcctgggt gagacaggcc 120
ccaacgaagg ggctcgaatg ggttacaagc atcagctctt ctgggggatc tacttactat 180
cgcgatagcg tcaaaggccg gtttaccatt agccgagata atgccaaatc aagcctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag ggctgaggac accgccacat actattgtac aaccgtgata 300
aggggctacg tgatggacgc atggggacag gggacattgg ttaccgtctc g 351

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 71

Arg Ala Ser Gly Ser Val Ser Thr Leu Met His
1 5 10

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 72

Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 73

His Gln Ser Trp Asn Ser Asp Thr
1 5

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 74

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala
1 5 10

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

107 188

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 75

Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Arg Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 76

Ile Ser Arg Ser His Tyr Phe Asp Cys
1 5

<210> 77

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 927

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

<210> 78

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 927.g2

<400> 78

189
445

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

gacacacaga tgacccagag cccatccact ttgtctgcat ccgtgggcca ccgagtgaca	60
atcacctgta gagcaagcgg ttccgtgagc acactgatgc attggtacca gcagaagcct	120
gggaaggctc ccaagctgct gatctacaaa gccagcaacc ttgcctccgg cgttccaagc	180
cggtttagcg gttccggatc tggaaccgag ttcaccctga ccataatcaag cctgcaaccc	240
gacgacttcg ccacctaata ttgccaccag agctggaata gcgacacgtt cgggcaaggc	300
acaaggctgg aaatcaaa	318

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 927 (heavy chain)

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 80
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 927.g2 (heavy chain)

<400> 80

gaggtgcaac ttgtggaaag cggagggggc gtggtccaac ccggaagaag tctccgtctt	60
tcttgcgccg caagtggctt caccttttcc aactacggaa tggcctgggt tcgacaagct	120
cctgggaaag gattggagtg ggtggccact atcaactatg acggacgcac gacacactac	180
cgagactctg ttaaggggcg ctttacgatt tcccgcgaca atagcaagag caccctctac	240
ctgcaaatga atagcctccg ggccgaggat actgctgtgt actattgtac ctccatctca	300

190
19+

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
cggagccact acttcgattg ctgggggacaa ggcacactcg tgactgtctc g

351

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 81

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn His Leu Ala
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 82

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 83

Gln Gln Tyr Asp Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 84

Gly Phe Ser Leu Gln Ser Tyr Thr Ile Ser
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 85

Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Pro Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 86
<211> 11

191
~~122~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 86

Pro Arg Trp Tyr Pro Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

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

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1099

<400> 87

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

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

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

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

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

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

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

<210> 88
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1099.g2

<400> 88
gacgtccagc tcactcaatc tccctccttt ctgtctgctt ctgtgggcga tcgctgaca 60
ataacctgca aggcctccaa atcaattagc aaccatctgg catggtatca ggagaagcct 120
ggcaaagcca ataagctgct gatccactcc ggctcaactc tgcaatccgg taccccaagc 180
cgatttagcg gatctgggag cggaaccgag ttcacactta ccattagctc cctgcaaccg 240
gaggacttcg ccacctatta ctgccagcaa tacgacgaat acccctatac gttcggccaa 300
gggacaagat tggaaatcaa gcgtacg 327

<210> 89
<211> 118

192
193

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1099 (heavy chain)

<400> 89

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Gln Ser Tyr
20 25 30

Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 90
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1099.g2 (heavh chain)

<400> 90
gaagttcagc tgcaggaatc tggacctggc ttggtgaaac caagcgagac acttagtctc 60
acttgcaccg tttccggctt ctcccttcaa tcctacacga tctcttgggt gcggcaacca 120
cccgggaaag gactggaatg gatcgagcc attagcgggg gagggagcac ctattacaac 180
ttgcctctca agagccgcgt gaccatatcc cgtgacacaa gcaagagcca ggtttccctg 240
aagctgagct ccgtgactgc tgccgatacg gctgtttact attgcacccg acctcgctgg 300
tatccccgtt cctatttcga ctactgggga agaggcacac tggttaccgt ctcg 354

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 91

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Thr Ser Ile His
Página 26

193
194

1 5

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 92

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 93

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Leu Tyr Thr
1 5

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDRs

<400> 94

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Tyr Met Ala
1 5 10

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 95

Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Thr Ile Ile Gln Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 96

Arg Gln Gly Thr Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Phe
1 5 10

194
195

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1102

<400> 97

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Thr Ser
20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 98
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1102.g4

<400> 98
aacatcgtgc tgacacagtc tcttgcaacc ctttactgt ctccaggtga acgagcaacc 60
ctgagttgta gagccagtca gaggatctcc acgagcattc actggtatca gcaaaagcct 120
gggcaagctc ccagactctt gatcaagtac gcctctcaga gcataagtgg cattccagct 180
aggtttagcg gctcaggctc aggaacagac ttactctga ccatcagctc cctggaaccg 240
gaggactttg ccgtctatta ctgccagcaa tcctactcca gtctgtacac cttcgggcag 300
ggtactaaac tggagataaa g 321

<210> 99
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1102 (heavy chain)

<400> 99

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

195
196

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

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

Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Thr Ile Ile Gln Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 100
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB
antibody 1002.g4 (heavy chain)

<400> 100
gaagtgcagc tggtcgaatc cgggggaggt ttggtgcaac caggtggctc actgagactg 60
agctgtgccg tttccggctt tacgttctca gacagttata tggcctgggt gcgtcaagca 120
cctggaaaag ggctggagtg gattgccagt atcagctatg gtgggaccat aatccagtac 180
ggcgatagcg tcaagggcag gtttactatc tccagggaca acgccaagtc aagcctttac 240
ctgcagatga attctctccg cgcagaggat accgctgtgt attactgcgc tagacggcag 300
ggaacctacg ctcgatacct ggacttctgg ggtcagggaa cactcggtac agtctcg 357

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 101

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Leu His
1 5 10

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

196
~~197~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<400> 102

Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 103

His Gln Ser Trp Asn Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anitbody CDR

<400> 104

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala
1 5 10

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 105

Ile Ile Asn Tyr Asp Ala Ser Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody CDR

<400> 106

Tyr Gly Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody variable region for anti-TcdB anitbody 1114

<400> 107

197
198

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 108
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for
anti-TcdB antibody 1114.g2

<400> 108
gcgacgcaaa tgactcagtc gccctcatcg cttagcgcgt ccgtcggaga tagagtgcg 60
atcacctgcc gcgcatcaga gtcggtgtcc acactcctcc actggtatca gcagaaaccg 120
gggaaggcac caaaactctt gatctacaaa gccagcaacc ttgcgtccgg tgtcccgtca 180
aggttctccg ggagcgggtc ggggacagac tttactttga ccatttcgtc gcttcagccg 240
gaggacttcg ccacctatta ctgtcatcag tcatggaact cacctccac atttgccag 300
ggaacgaaac tcgaaatcaa g 321

<210> 109
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1114 (heavy
chain)

<400> 109

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

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

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

198
197

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
Ala Ile Ile Asn Tyr Asp Ala Ser Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Tyr Gly Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 110
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding anitbody variable region for anti-TcdB
antibody 1114.g2 (heavy chain)

<400> 110
gaagtacaac tcgtagagtc aggggggtggg ctggtccaac ctggcggctc ccttcggctt 60
tcgtgtgccg cctcgggatt cacgttttagc aattacggta tggcctgggt gaggcaggca 120
ccagggaagg gtcttgagtg ggtagcgatc atcaactatg atgcaagcac caccactac 180
agggatagcg tcaagggacg ctttactatc agccgggata atgcgaaatc ctcgctctat 240
ctgcagatga actccctcag agccgaggac accgcagtgt actattgcac acgatacgga 300
cgctcgcaact atttcgacta ttgggggacag gggacgctcg taactgtctc g 351

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 111

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Leu His
1 5 10

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Anitbody CDR

<400> 112

Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

199
250

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 113

His Gln Ser Trp Asn Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 114

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ala
1 5 10

<210> 115
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 115

Ile Ile Asn Tyr Asp Ala Ser Thr Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 116

Tyr Gly Arg Ser His Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 117
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1114 graft 8

<400> 117

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

200
201

50 LIST SEC COLO-17184-841-001-4 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Trp Asn Ser Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 118
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1114.g8

<400> 118
gacacggtcc tgactcagtc gccctcatcg cttagcgcgt ccgtcggaga tagagtgcg 60
atcacctgcc gcgcatcaga gtcggtgtcc acactcctcc actggtatca gcagaaaccg 120
gggaaggcac caaaactctt gatctacaaa gccagcaacc ttgcgtccgg tgtcccgtca 180
aggttctccg ggagcgggttc ggggacagac ttactttga ccatttcgtc gcttcagccg 240
gaggacttcg ccacctatta ctgtcatcag tcatggaact cacctcccac atttggccag 300
ggaacgaaac tcgaaatcaa g 321

<210> 119
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1114 graft 8 (heavy chain)

<400> 119
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 120
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB
antibody 1114.g8

<400> 120
gaagtacaac tcgtagagtc aggggggtggg ctggtccaac ctggcggctc ccttcggctt 60
tcgtgtgccg cctcgggatt cacgttttagc aattacggta tggcctgggt gaggcaggca 120
ccagggaagg gtcttgagtg ggtagcgatc atcaactatg atgcaagcac caccactac 180
agggatagcg tcaagggacg ctttactatc agccgggata atgcgaaatc ctcgctctat 240
ctgcagatga actccctcag agccgaggac accgcagtgt actattgcac acgatacggg 300
cgctcgcact atttcgacta ttgggggacag gggacgctcg taactgtctc g 351

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 121

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Met Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 122
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 122

Asn Thr Asn Lys Leu His Thr
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 123

Leu Gln His Lys Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 124
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

202
203

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 124

Gly Phe Thr Phe Arg Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 125
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 125

Ser Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 126

Leu Thr Ile Thr Thr Ser Gly Asp Ser
1 5

<210> 127
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1125

<400> 127

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

203
204

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

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

<210> 128
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1125.g2

<400> 128
gatatacaaa tgactcagag ccctagctca ctgagcgctt ctgtgggcga tcgtgtgaca 60
atcacttgca aagcaagcca gaacatctat atgtacctga attggtacca gcaaaaaccg 120
ggaaaagctc ccaagcgctt gatttacaac accaataagc tgcataccgg cgtgccaagc 180
cgtttttagcg gatctggctc tggaaccgaa tatacactga ccataagctc cctgcaaccg 240
gaagactttg caacttacta ttgcctccag cacaaatcct tcccctatac gttcggacaa 300
gggaccaaac tggaatcaa a 321

<210> 129
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1125 (heavy chain)

<400> 129
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Ser
20 25 30
Phe Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Thr Ile Thr Thr Ser Gly Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

204
~~205~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB
antibody 1125.g2 (heavy chain)

<400> 130
gaagtgcagc tggtcgaaag cggcggagga ttggtgcaac ctggtggctc tcttcgcctg 60
tcttgcgctg caagcggctt tacgttccgc gatagcttta tggcttgggt gcgacaagct 120
cctgggaaaag ggctggaatg ggtcgctagc ataagctacg aaggcgacaa gacttactat 180
ggggactctg tgaaaggccg attcaccatt agccgagaca acgcaaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg tgccgaagat accgccgtgt actattgcgc taggctgacg 300
atcactacaa gcggagatag ctggggacaa gggacaatgg tgaccgtctc gagc 354

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 131

Lys Ala Ser Gln His Val Gly Thr Asn Val Asp
1 5 10

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 132

Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Thr
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 133

Leu Gln Tyr Asn Tyr Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 134

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Phe Gly Met Ser
1 5 10

205
206

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 135

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 136

Arg Ala Tyr Ser Ser Pro Phe Ala Phe
1 5

<210> 137
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1129

<400> 137

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

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

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

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

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

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

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

<210> 138
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

206
207

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1129.g1

<400> 138
gacacccaga tgactcagtc tccgtcaagc ctttctgcct ctgttggaga tcgagtcaca 60
attacgtgca aggcaagcca acacgtgggt accaacgtgg actggtatca acagaagcca 120
gggaaggtcc ccaaactgct gatctacggt gccagtattc gctataccgg cgtgcctgat 180
cgcttcaccg gaagcggggtc agggaccgat ttcacactga caatcagctc cctgcaacct 240
gaagacgtgg ctacttacta ctgcctgcag tacaactata atccctacac ctttggccag 300
ggcaccaaac tggagataaa g 321

<210> 139
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1129 (heavy chain)

<400> 139
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Arg Ala Tyr Ser Ser Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 140
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1129.g1(heavy chain)

<400> 140
gaggtgcaac ttgtggaatc aggaggtggc gtggttcagc ccggtagatc acttcgtctg 60
agttgtgcaa caagcggctt tatcttctcc aacttcggga tgtcttgggt tagacaggct 120

202
238

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

cctggttaagg gcctcgaatg ggtgggctagt attagcccaa gcgggggaaa cgcctactat	180
agggacagcg tgaaaggacg cttcactatc agccgagata actccaagac cacgctgtat	240
ctgcagatga atagtctgag ggccgaggat accgcagtgt actactgcac tcgacgggcc	300
tattcttccc cttttgcctt ttggggacag gggactctgg tgacagtctc gagc	354

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 141

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn His Leu Ala
1 5 10

<210> 142
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 142

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Pro
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 143

Gln Gln Tyr Asp Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 144
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 144

Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Thr
1 5 10

<210> 145
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 145

208
209

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 146

Pro Arg Trp Tyr Pro Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 147
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1134

<400> 147

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

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

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

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

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

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

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

<210> 148
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB
antibody 1134.g5

<400> 148
gacgtccagc tcactcaatc tccctccttt ctgtctgctt ctgtgggcga tcgcgtgaca 60
ataacctgca aggcctccaa atcaattagc aaccatctgg catggtatca ggagaagcct 120
ggcaaagcca ataagctgct gatccactcc ggctcaactc tgcaaccggg taccccaagc 180
cgatttagcg gatctgggag cggaaccgag ttcacactta ccattagctc cctgcaaccg 240
gaggacttcg ccacctatta ctgccagcaa tacgacgaat acccctatac gttcggccaa 300

209
no

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

gggacaagat tggaaatcaa g 321

<210> 149
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1134 (heavy chain)

<400> 149

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 150
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1134.g5 (heavy chain)

<400> 150
gaagttcagc tgcaggaatc tggacctggc ttggtgaaac caagcgagac acttagtctc 60
acttgcaccg tttccggctt ctcccttaat tcctacacga tcacttgggt gcggcaacca 120
cccgggaaag gactggaatg gatcgagcc attagcgggg gagggagcac ctatttcaac 180
tcggctctca agagccgcgt gaccatatcc cgtgacacaa gcaagagcca ggtttccctg 240
aagctgagct ccgtgactgc tgccgatacg gctgtttact attgcacccg acctcgctgg 300
tatccccgtt cctatttcga ctactgggga agaggcacac tggttaccgt ctcg 354

<210> 151
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

210
244

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 151
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn Val Ala
1 5 10

<210> 152
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 152
Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 153
Gln Arg Val Tyr Gln Ser Thr Trp Thr
1 5

<210> 154
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 154
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Val His
1 5 10

<210> 155
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 155
Cys Ile Arg Thr Gly Gly Asn Thr Glu Tyr Gln Ser Glu Phe Lys Ser
1 5 10 15

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 156

211
~~212~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 157
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1151
<400> 157

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

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

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

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

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

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

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

<210> 158
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide encoding antibody variable region for anti-TcdB
antibody 1151.g1

<400> 158
gcgattcaaa tgactcagtc gccctcatcg cttagcgcgt ccgtcggaga tagagtgacg 60
atcacgtgca aagcatcaca aaatgtcggg aacaatgtgg catggtatca gcataaaccg 120
gggaaggcac caaaactctt gatctactac gccagcaaca ggtttactgg tgtccccgtca 180
aggttcacgg gaggggggta cgggacagac tttactttga ccatttcgtc gcttcagccg 240
gaggacttcg ccacctatta ctgtcagagg gtctaccagt caacgtggac atttggccag 300
ggaacgaaag tggaatcaa g 321

<210> 159
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1151 (heavy
chain)
<400> 159

213

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Cys Ile Arg Thr Gly Gly Asn Thr Glu Tyr Gln Ser Glu Phe Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser

<210> 160
<211> 342
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for
anti-TcdB antibody 1151.g4 (heavy chain)

<400> 160
gaagtacaac tccaagagtc ggggcctggt ctggtcaagc cgtccgaaac actttcgctg 60
acgtgtacgg tatcaggatt ctcaactaca tcatactacg tccactgggt gaggcagcca 120
cccgggaagg gtcttgagtg gatgggctgc attagaaccg gaggggaatac cgagtaccag 180
agcgaattta agagccgcgt cactatcagc cgggatacgt ccaaaaacca ggtgtcgctc 240
aaattgtcct ccgtgacggc cgctgacacc gcagtgtact attgcgcgcg aggaaactat 300
ggctttgcgt attggggaca ggggacgctc gtaactgtct cg 342

<210> 161
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 161

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 162
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

213
~~214~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 162

Asn Ile Gln Ser Leu His Thr
1 5

<210> 163
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 163

Phe Gln His Asn Ser Gly Trp
1 5

<210> 164
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 164

Gly Phe Thr Phe Thr Gln Ala Ala Met Phe
1 5 10

<210> 165
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 165

Arg Ile Ser Thr Lys Ser Asn Asn Phe Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 166
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Antibody CDR

<400> 166

Pro Ala Tyr Tyr Tyr Asp Gly Thr Val Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 167
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

214
~~215~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1153.g8

<400> 167

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

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

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

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

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

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

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

<210> 168

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for anti-TcdB antibody 1153.g8

<400> 168

gatatacaga tgactcagtc cccttctagc ctttcagctt ccgtgggcga tagagtgact	60
atcacgtgta aggctagtca gaacattaac aagtatctgg actggtacca gcagaaaccc	120
gggaagggttc ccaagctgct gatctacaac atccagtcct tgcatacagg cattcctagc	180
cggttttagcg gatctgggttc agggaccgac ttcaccctga caatcagctc tctgcaacca	240
gaagacgtgg ccacctatta ctgcttccag cacaatagtg gctggacttt tggacaaggt	300
accaggctgg agatcaaa	318

<210> 169

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Antibody variable region for anti-TcdB antibody 1153 (graft 8 heavy chain)

<400> 169

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

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

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Gly Ile
Página 48

215
~~216~~

35
Ala Arg Ile Ser Thr Lys Ser Asn Asn Phe Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Ala Pro Ala Tyr Tyr Tyr Asp Gly Thr Val Pro Phe Ala
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 170
<211> 369
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Polynucleotide sequence encoding antibody variable region for
anti-TcdB antibody 1153.g8 (heavy chain)

<400> 170
gaggttcagc tgggtggaatc aggaggggggt ctggtgcaac caggaggctc cctgaaactg 60
tcttgcgccg caagcggctt tacgtttacc caggccgcta tgttctgggt taggcaggcc 120
agtgggaagg gtcttgaagg catcgcaaga atcagcacca agagcaacaa tttcgctacg 180
tactatccgg actccgtgaa aggccggttt accatttctc gcgatgacag caagaacacc 240
gtgtacctgc agatgaacag tctcaagacc gaggacacag ccgtgtacta ttgtactgct 300
ccgcctatt attacgatgg cacagtgcct ttcgcatact ggggacaggg tactttgggtg 360
actgtctcg 369

<210> 171
<211> 2710
<212> PRT
<213> Clostridia

<400> 171
Met Ser Leu Ile Ser Lys Glu Glu Leu Ile Lys Leu Ala Tyr Ser Ile
1 5 10 15
Arg Pro Arg Glu Asn Glu Tyr Lys Thr Ile Leu Thr Asn Leu Asp Glu
20 25 30
Tyr Asn Lys Leu Thr Thr Asn Asn Asn Glu Asn Lys Tyr Leu Gln Leu
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asp Val Phe Met Asn Lys Tyr Lys Thr
50 55 60
Ser Ser Arg Asn Arg Ala Leu Ser Asn Leu Lys Lys Asp Ile Leu Lys
65 70 75 80

216
~~217~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Glu Val Ile Leu Ile Lys Asn Ser Asn Thr Ser Pro Val Glu Lys Asn
85 90 95

Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Glu Val Ser Asp Ile Ala Leu Glu
100 105 110

Tyr Ile Lys Gln Trp Ala Asp Ile Asn Ala Glu Tyr Asn Ile Lys Leu
115 120 125

Trp Tyr Asp Ser Glu Ala Phe Leu Val Asn Thr Leu Lys Lys Ala Ile
130 135 140

Val Glu Ser Ser Thr Thr Glu Ala Leu Gln Leu Leu Glu Glu Glu Ile
145 150 155 160

Gln Asn Pro Gln Phe Asp Asn Met Lys Phe Tyr Lys Lys Arg Met Glu
165 170 175

Phe Ile Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Phe Ile Asn Tyr Tyr Lys Ser Gln
180 185 190

Ile Asn Lys Pro Thr Val Pro Thr Ile Asp Asp Ile Ile Lys Ser His
195 200 205

Leu Val Ser Glu Tyr Asn Arg Asp Glu Thr Val Leu Glu Ser Tyr Arg
210 215 220

Thr Asn Ser Leu Arg Lys Ile Asn Ser Asn His Gly Ile Asp Ile Arg
225 230 235 240

Ala Asn Ser Leu Phe Thr Glu Gln Glu Leu Leu Asn Ile Tyr Ser Gln
245 250 255

Glu Leu Leu Asn Arg Gly Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Val Arg
260 265 270

Leu Leu Ala Leu Lys Asn Phe Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met
275 280 285

Leu Pro Gly Ile His Ser Asp Leu Phe Lys Thr Ile Ser Arg Pro Ser
290 295 300

Ser Ile Gly Leu Asp Arg Trp Glu Met Ile Lys Leu Glu Ala Ile Met
305 310 315 320

Lys Tyr Lys Lys Tyr Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Glu Asn Phe Asp Lys
325 330 335

Leu Asp Gln Gln Leu Lys Asp Asn Phe Lys Leu Ile Ile Glu Ser Lys
340 345 350

Ser Glu Lys Ser Glu Ile Phe Ser Lys Leu Glu Asn Leu Asn Val Ser
355 360 365

Asp Leu Glu Ile Lys Ile Ala Phe Ala Leu Gly Ser Val Ile Asn Gln
370 375 380

217
~~218~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Ala Leu Ile Ser Lys Gln Gly Ser Tyr Leu Thr Asn Leu Val Ile Glu
385 390 395 400

Gln Val Lys Asn Arg Tyr Gln Phe Leu Asn Gln His Leu Asn Pro Ala
405 410 415

Ile Glu Ser Asp Asn Asn Phe Thr Asp Thr Thr Lys Ile Phe His Asp
420 425 430

Ser Leu Phe Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asn Ser Met Phe Leu Thr Lys
435 440 445

Ile Ala Pro Tyr Leu Gln Val Gly Phe Met Pro Glu Ala Arg Ser Thr
450 455 460

Ile Ser Leu Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Ala Ser Ala Tyr Tyr Asp Phe
465 470 475 480

Ile Asn Leu Gln Glu Asn Thr Ile Glu Lys Thr Leu Lys Ala Ser Asp
485 490 495

Leu Ile Glu Phe Lys Phe Pro Glu Asn Asn Leu Ser Gln Leu Thr Glu
500 505 510

Gln Glu Ile Asn Ser Leu Trp Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ala Lys Tyr
515 520 525

Gln Phe Glu Lys Tyr Val Arg Asp Tyr Thr Gly Gly Ser Leu Ser Glu
530 535 540

Asp Asn Gly Val Asp Phe Asn Lys Asn Thr Ala Leu Asp Lys Asn Tyr
545 550 555 560

Leu Leu Asn Asn Lys Ile Pro Ser Asn Asn Val Glu Glu Ala Gly Ser
565 570 575

Lys Asn Tyr Val His Tyr Ile Ile Gln Leu Gln Gly Asp Asp Ile Ser
580 585 590

Tyr Glu Ala Thr Cys Asn Leu Phe Ser Lys Asn Pro Lys Asn Ser Ile
595 600 605

Ile Ile Gln Arg Asn Met Asn Glu Ser Ala Lys Ser Tyr Phe Leu Ser
610 615 620

Asp Asp Gly Glu Ser Ile Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Arg Ile Pro Glu
625 630 635 640

Arg Leu Lys Asn Lys Glu Lys Val Lys Val Thr Phe Ile Gly His Gly
645 650 655

Lys Asp Glu Phe Asn Thr Ser Glu Phe Ala Arg Leu Ser Val Asp Ser
660 665 670

Leu Ser Asn Glu Ile Ser Ser Phe Leu Asp Thr Ile Lys Leu Asp Ile
675 680 685

218
219

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Ser Pro Lys Asn Val Glu Val Asn Leu Leu Gly Cys Asn Met Phe Ser
690 695 700

Tyr Asp Phe Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Leu Ser
705 710 715 720

Ile Met Asp Lys Ile Thr Ser Thr Leu Pro Asp Val Asn Lys Asn Ser
725 730 735

Ile Thr Ile Gly Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly
740 745 750

Arg Lys Glu Leu Leu Ala His Ser Gly Lys Trp Ile Asn Lys Glu Glu
755 760 765

Ala Ile Met Ser Asp Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ile Phe Phe Asp Ser
770 775 780

Ile Asp Asn Lys Leu Lys Ala Lys Ser Lys Asn Ile Pro Gly Leu Ala
785 790 795 800

Ser Ile Ser Glu Asp Ile Lys Thr Leu Leu Leu Asp Ala Ser Val Ser
805 810 815

Pro Asp Thr Lys Phe Ile Leu Asn Asn Leu Lys Leu Asn Ile Glu Ser
820 825 830

Ser Ile Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Glu Lys Leu Glu Pro Val Lys Asn
835 840 845

Ile Ile His Asn Ser Ile Asp Asp Leu Ile Asp Glu Phe Asn Leu Leu
850 855 860

Glu Asn Val Ser Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Lys Lys Leu Asn Asn Leu
865 870 875 880

Asp Glu Lys Tyr Leu Ile Ser Phe Glu Asp Ile Ser Lys Asn Asn Ser
885 890 895

Thr Tyr Ser Val Arg Phe Ile Asn Lys Ser Asn Gly Glu Ser Val Tyr
900 905 910

Val Glu Thr Glu Lys Glu Ile Phe Ser Lys Tyr Ser Glu His Ile Thr
915 920 925

Lys Glu Ile Ser Thr Ile Lys Asn Ser Ile Ile Thr Asp Val Asn Gly
930 935 940

Asn Leu Leu Asp Asn Ile Gln Leu Asp His Thr Ser Gln Val Asn Thr
945 950 955 960

Leu Asn Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Asp Tyr Ser Ser Asn
965 970 975

Lys Asp Val Leu Asn Asp Leu Ser Thr Ser Val Lys Val Gln Leu Tyr

219
~~220~~

980 LIST SEC COLO-17184-841-001-4
985 990

Ala Gln Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Tyr Asp Ser Ile Gln
995 1000 1005

Leu Val Asn Leu Ile Ser Asn Ala Val Asn Asp Thr Ile Asn Val
1010 1015 1020

Leu Pro Thr Ile Thr Glu Gly Ile Pro Ile Val Ser Thr Ile Leu
1025 1030 1035

Asp Gly Ile Asn Leu Gly Ala Ala Ile Lys Glu Leu Leu Asp Glu
1040 1045 1050

His Asp Pro Leu Leu Lys Lys Glu Leu Glu Ala Lys Val Gly Val
1055 1060 1065

Leu Ala Ile Asn Met Ser Leu Ser Ile Ala Ala Thr Val Ala Ser
1070 1075 1080

Ile Val Gly Ile Gly Ala Glu Val Thr Ile Phe Leu Leu Pro Ile
1085 1090 1095

Ala Gly Ile Ser Ala Gly Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu
1100 1105 1110

Ile Leu His Asp Lys Ala Thr Ser Val Val Asn Tyr Phe Asn His
1115 1120 1125

Leu Ser Glu Ser Lys Lys Tyr Gly Pro Leu Lys Thr Glu Asp Asp
1130 1135 1140

Lys Ile Leu Val Pro Ile Asp Asp Leu Val Ile Ser Glu Ile Asp
1145 1150 1155

Phe Asn Asn Asn Ser Ile Lys Leu Gly Thr Cys Asn Ile Leu Ala
1160 1165 1170

Met Glu Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr Gly Asn Ile Asp His
1175 1180 1185

Phe Phe Ser Ser Pro Ser Ile Ser Ser His Ile Pro Ser Leu Ser
1190 1195 1200

Ile Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Glu Thr Glu Asn Leu Asp Phe Ser
1205 1210 1215

Lys Lys Ile Met Met Leu Pro Asn Ala Pro Ser Arg Val Phe Trp
1220 1225 1230

Trp Glu Thr Gly Ala Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Glu Asn Asp
1235 1240 1245

Gly Thr Arg Leu Leu Asp Ser Ile Arg Asp Leu Tyr Pro Gly Lys
1250 1255 1260

220
221

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Phe	Tyr	Trp	Arg	Phe	Tyr	Ala	Phe	Phe	Asp	Tyr	Ala	Ile	Thr	Thr
1265						1270					1275			
Leu	Lys	Pro	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Ile	Lys	Ile	Lys	Leu	Asp
1280						1285					1290			
Lys	Asp	Thr	Arg	Asn	Phe	Ile	Met	Pro	Thr	Ile	Thr	Thr	Asn	Glu
1295						1300					1305			
Ile	Arg	Asn	Lys	Leu	Ser	Tyr	Ser	Phe	Asp	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr
1310						1315					1320			
Tyr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ser	Thr	Asn	Ile	Asn
1325						1330					1335			
Leu	Ser	Lys	Asp	Asp	Leu	Trp	Ile	Phe	Asn	Ile	Asp	Asn	Glu	Val
1340						1345					1350			
Arg	Glu	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Lys	Leu
1355						1360					1365			
Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Ser	Lys	Ile	Asp	Ile	Asn	Lys	Asn	Lys	Leu
1370						1375					1380			
Ile	Ile	Gly	Asn	Gln	Thr	Ile	Asp	Phe	Ser	Gly	Asp	Ile	Asp	Asn
1385						1390					1395			
Lys	Asp	Arg	Tyr	Ile	Phe	Leu	Thr	Cys	Glu	Leu	Asp	Asp	Lys	Ile
1400						1405					1410			
Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ile	Asn	Leu	Val	Ala	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu
1415						1420					1425			
Leu	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ile	Ser	Asn	Leu	Ser	Asn
1430						1435					1440			
Thr	Ile	Glu	Lys	Ile	Asn	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ser	Lys	Asn	Ile
1445						1450					1455			
Ala	Tyr	Asn	Tyr	Thr	Asp	Glu	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Phe	Gly	Ala
1460						1465					1470			
Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Gln	Lys	Ser	Ile	Ile	His	Tyr	Lys	Lys	Asp
1475						1480					1485			
Ser	Lys	Asn	Ile	Leu	Glu	Phe	Tyr	Asn	Asp	Ser	Thr	Leu	Glu	Phe
1490						1495					1500			
Asn	Ser	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Glu	Asp	Ile	Asn	Val	Phe	Met	Lys
1505						1510					1515			
Asp	Asp	Ile	Asn	Thr	Ile	Thr	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Asn	Asn
1520						1525					1530			
Thr	Asp	Lys	Ser	Ile	Asp	Phe	Ser	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Asn
1535						1540					1545			

221
222

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Gln	Val	Lys	Val	Asn	Gly	Leu	Tyr	Leu	Asn	Glu	Ser	Val	Tyr	Ser
1550						1555					1560			
Ser	Tyr	Leu	Asp	Phe	Val	Lys	Asn	Ser	Asp	Gly	His	His	Asn	Thr
1565						1570					1575			
Ser	Asn	Phe	Met	Asn	Leu	Phe	Leu	Asp	Asn	Ile	Ser	Phe	Trp	Lys
1580						1585					1590			
Leu	Phe	Gly	Phe	Glu	Asn	Ile	Asn	Phe	Val	Ile	Asp	Lys	Tyr	Phe
1595						1600					1605			
Thr	Leu	Val	Gly	Lys	Thr	Asn	Leu	Gly	Tyr	Val	Glu	Phe	Ile	Cys
1610						1615					1620			
Asp	Asn	Asn	Lys	Asn	Ile	Asp	Ile	Tyr	Phe	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr
1625						1630					1635			
Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ile	Phe	Ser	Gly	Asn	Gly	Arg	Asn	Val
1640						1645					1650			
Val	Val	Glu	Pro	Ile	Tyr	Asn	Pro	Asp	Thr	Gly	Glu	Asp	Ile	Ser
1655						1660					1665			
Thr	Ser	Leu	Asp	Phe	Ser	Tyr	Glu	Pro	Leu	Tyr	Gly	Ile	Asp	Arg
1670						1675					1680			
Tyr	Ile	Asn	Lys	Val	Leu	Ile	Ala	Pro	Asp	Leu	Tyr	Thr	Ser	Leu
1685						1690					1695			
Ile	Asn	Ile	Asn	Thr	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Glu
1700						1705					1710			
Ile	Ile	Val	Leu	Asn	Pro	Asn	Thr	Phe	His	Lys	Lys	Val	Asn	Ile
1715						1720					1725			
Asn	Leu	Asp	Ser	Ser	Ser	Phe	Glu	Tyr	Lys	Trp	Ser	Thr	Glu	Gly
1730						1735					1740			
Ser	Asp	Phe	Ile	Leu	Val	Arg	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Asn	Lys	Lys
1745						1750					1755			
Ile	Leu	Gln	Lys	Ile	Arg	Ile	Lys	Gly	Ile	Leu	Ser	Asn	Thr	Gln
1760						1765					1770			
Ser	Phe	Asn	Lys	Met	Ser	Ile	Asp	Phe	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Leu
1775						1780					1785			
Ser	Leu	Gly	Tyr	Ile	Met	Ser	Asn	Phe	Lys	Ser	Phe	Asn	Ser	Glu
1790						1795					1800			
Asn	Glu	Leu	Asp	Arg	Asp	His	Leu	Gly	Phe	Lys	Ile	Ile	Asp	Asn
1805						1810					1815			
Lys	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Asp	Ser	Lys	Leu	Val	Lys	Gly	Leu
1820						1825					1830			

222
223

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Ile	Asn	Ile	Asn	Asn	Ser	Leu	Phe	Tyr	Phe	Asp	Pro	Ile	Glu	Phe
1835						1840					1845			
Asn	Leu	Val	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr
1850						1855					1860			
Phe	Asp	Ile	Asn	Thr	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Ser	Tyr	Lys	Ile	Ile
1865						1870					1875			
Asn	Gly	Lys	His	Phe	Tyr	Phe	Asn	Asn	Asp	Gly	Val	Met	Gln	Leu
1880						1885					1890			
Gly	Val	Phe	Lys	Gly	Pro	Asp	Gly	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala
1895						1900					1905			
Asn	Thr	Gln	Asn	Asn	Asn	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Val	Tyr	Gln
1910						1915					1920			
Ser	Lys	Phe	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Asn
1925						1930					1935			
Asn	Ser	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Trp	Arg	Ile	Ile	Asn	Asn	Glu	Lys
1940						1945					1950			
Tyr	Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Asn	Ala	Ile	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Gln
1955						1960					1965			
Val	Ile	Asp	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Pro	Asp	Thr	Ala	Ile
1970						1975					1980			
Ile	Ser	Lys	Gly	Trp	Gln	Thr	Val	Asn	Gly	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Phe
1985						1990					1995			
Asp	Thr	Asp	Thr	Ala	Ile	Ala	Phe	Asn	Gly	Tyr	Lys	Thr	Ile	Asp
2000						2005					2010			
Gly	Lys	His	Phe	Tyr	Phe	Asp	Ser	Asp	Cys	Val	Val	Lys	Ile	Gly
2015						2020					2025			
Val	Phe	Ser	Thr	Ser	Asn	Gly	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn
2030						2035					2040			
Thr	Tyr	Asn	Asn	Asn	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Val	Tyr	Gln	Ser
2045						2050					2055			
Lys	Phe	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Asn	Asn
2060						2065					2070			
Ser	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Leu	Gln	Thr	Ile	Asp	Ser	Lys	Lys	Tyr
2075						2080					2085			
Tyr	Phe	Asn	Thr	Asn	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr
2090						2095					2100			
Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asn	Thr	Ala	Glu	Ala

223
224

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
2110 2115

2105

Ala	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asn
2120						2125					2130			
Thr	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly
2135						2140					2145			
Lys	His	Phe	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Ile	Gly	Val
2150						2155					2160			
Phe	Lys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr
2165						2170					2175			
Asp	Ala	Asn	Asn	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Leu	Tyr	Gln	Asn	Glu
2180						2185					2190			
Phe	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Asp	Ser
2195						2200					2205			
Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Trp	Arg	Ile	Ile	Asn	Asn	Lys	Lys	Tyr	Tyr
2210						2215					2220			
Phe	Asn	Pro	Asn	Asn	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	His	Leu	Cys	Thr	Ile
2225						2230					2235			
Asn	Asn	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ile	Leu	Gln	Asn
2240						2245					2250			
Gly	Tyr	Ile	Thr	Ile	Glu	Arg	Asn	Asn	Phe	Tyr	Phe	Asp	Ala	Asn
2255						2260					2265			
Asn	Glu	Ser	Lys	Met	Val	Thr	Gly	Val	Phe	Lys	Gly	Pro	Asn	Gly
2270						2275					2280			
Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr	His	Asn	Asn	Asn	Ile	Glu
2285						2290					2295			
Gly	Gln	Ala	Ile	Val	Tyr	Gln	Asn	Lys	Phe	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly
2300						2305					2310			
Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Asn	Asp	Ser	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Trp
2315						2320					2325			
Gln	Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asn	Thr	Ala
2330						2335					2340			
Glu	Ala	Ala	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr
2345						2350					2355			
Phe	Asn	Leu	Asn	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile
2360						2365					2370			
Asp	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asn	Thr	Phe	Ile	Ala	Ser
2375						2380					2385			

224
225

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Thr	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ile	Asn	Gly	Lys	His	Phe	Tyr	Phe	Asn	Thr
	2390					2395					2400			
Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Ile	Gly	Val	Phe	Lys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe
	2405					2410					2415			
Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr	Asp	Ala	Asn	Asn	Ile	Glu	Gly
	2420					2425					2430			
Gln	Ala	Ile	Leu	Tyr	Gln	Asn	Lys	Phe	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Lys
	2435					2440					2445			
Lys	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Asp	Ser	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Leu	Arg
	2450					2455					2460			
Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asn	Thr	Ala	Val
	2465					2470					2475			
Ala	Val	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Phe
	2480					2485					2490			
Asn	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	Ala	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Ile	Ile	Ser
	2495					2500					2505			
Gly	Lys	His	Phe	Tyr	Phe	Asn	Thr	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Ile	Gly
	2510					2515					2520			
Val	Phe	Lys	Gly	Pro	Asp	Gly	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn
	2525					2530					2535			
Thr	Asp	Ala	Asn	Asn	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Arg	Tyr	Gln	Asn
	2540					2545					2550			
Arg	Phe	Leu	Tyr	Leu	His	Asp	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Asn	Asn
	2555					2560					2565			
Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	Gly	Trp	Val	Thr	Ile	Asp	Gly	Asn	Arg	Tyr
	2570					2575					2580			
Tyr	Phe	Glu	Pro	Asn	Thr	Ala	Met	Gly	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Thr
	2585					2590					2595			
Ile	Asp	Asn	Lys	Asn	Phe	Tyr	Phe	Arg	Asn	Gly	Leu	Pro	Gln	Ile
	2600					2605					2610			
Gly	Val	Phe	Lys	Gly	Ser	Asn	Gly	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala
	2615					2620					2625			
Asn	Thr	Asp	Ala	Asn	Asn	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Arg	Tyr	Gln
	2630					2635					2640			
Asn	Arg	Phe	Leu	His	Leu	Leu	Gly	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Asn
	2645					2650					2655			
Asn	Ser	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Val
	2660					2665					2670			

925
226

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu
2675 2680 2685

Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val
2690 2695 2700

Lys Ala Pro Gly Ile Tyr Gly
2705 2710

<210> 172
<211> 2366
<212> PRT
<213> Clostridia

<400> 172

Met Ser Leu Val Asn Arg Lys Gln Leu Glu Lys Met Ala Asn Val Arg
1 5 10 15

Phe Arg Thr Gln Glu Asp Glu Tyr Val Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu
20 25 30

Glu Tyr His Asn Met Ser Glu Asn Thr Val Val Glu Lys Tyr Leu Lys
35 40 45

Leu Lys Asp Ile Asn Ser Leu Thr Asp Ile Tyr Ile Asp Thr Tyr Lys
50 55 60

Lys Ser Gly Arg Asn Lys Ala Leu Lys Lys Phe Lys Glu Tyr Leu Val
65 70 75 80

Thr Glu Val Leu Glu Leu Lys Asn Asn Asn Leu Thr Pro Val Glu Lys
85 90 95

Asn Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Gln Ile Asn Asp Thr Ala Ile
100 105 110

Asn Tyr Ile Asn Gln Trp Lys Asp Val Asn Ser Asp Tyr Asn Val Asn
115 120 125

Val Phe Tyr Asp Ser Asn Ala Phe Leu Ile Asn Thr Leu Lys Lys Thr
130 135 140

Val Val Glu Ser Ala Ile Asn Asp Thr Leu Glu Ser Phe Arg Glu Asn
145 150 155 160

Leu Asn Asp Pro Arg Phe Asp Tyr Asn Lys Phe Phe Arg Lys Arg Met
165 170 175

Glu Ile Ile Tyr Asp Lys Gln Lys Asn Phe Ile Asn Tyr Tyr Lys Ala
180 185 190

Gln Arg Glu Glu Asn Pro Glu Leu Ile Ile Asp Asp Ile Val Lys Thr
195 200 205

Tyr Leu Ser Asn Glu Tyr Ser Lys Glu Ile Asp Glu Leu Asn Thr Tyr
210 215 220

226
227

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Ile Glu Glu Ser Leu Asn Lys Ile Thr Gln Asn Ser Gly Asn Asp Val
225 230 235 240

Arg Asn Phe Glu Glu Phe Lys Asn Gly Glu Ser Phe Asn Leu Tyr Glu
245 250 255

Gln Glu Leu Val Glu Arg Trp Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Leu
260 265 270

Arg Ile Ser Ala Leu Lys Glu Ile Gly Gly Met Tyr Leu Asp Val Asp
275 280 285

Met Leu Pro Gly Ile Gln Pro Asp Leu Phe Glu Ser Ile Glu Lys Pro
290 295 300

Ser Ser Val Thr Val Asp Phe Trp Glu Met Thr Lys Leu Glu Ala Ile
305 310 315 320

Met Lys Tyr Lys Glu Tyr Ile Pro Glu Tyr Thr Ser Glu His Phe Asp
325 330 335

Met Leu Asp Glu Glu Val Gln Ser Ser Phe Glu Ser Val Leu Ala Ser
340 345 350

Lys Ser Asp Lys Ser Glu Ile Phe Ser Ser Leu Gly Asp Met Glu Ala
355 360 365

Ser Pro Leu Glu Val Lys Ile Ala Phe Asn Ser Lys Gly Ile Ile Asn
370 375 380

Gln Gly Leu Ile Ser Val Lys Asp Ser Tyr Cys Ser Asn Leu Ile Val
385 390 395 400

Lys Gln Ile Glu Asn Arg Tyr Lys Ile Leu Asn Asn Ser Leu Asn Pro
405 410 415

Ala Ile Ser Glu Asp Asn Asp Phe Asn Thr Thr Thr Asn Thr Phe Ile
420 425 430

Asp Ser Ile Met Ala Glu Ala Asn Ala Asp Asn Gly Arg Phe Met Met
435 440 445

Glu Leu Gly Lys Tyr Leu Arg Val Gly Phe Phe Pro Asp Val Lys Thr
450 455 460

Thr Ile Asn Leu Ser Gly Pro Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Tyr Gln Asp
465 470 475 480

Leu Leu Met Phe Lys Glu Gly Ser Met Asn Ile His Leu Ile Glu Ala
485 490 495

Asp Leu Arg Asn Phe Glu Ile Ser Lys Thr Asn Ile Ser Gln Ser Thr
500 505 510

Glu Gln Glu Met Ala Ser Leu Trp Ser Phe Asp Asp Ala Arg Ala Lys
515 520 525

228
227

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Ala Gln Phe Glu Glu Tyr Lys Arg Asn Tyr Phe Glu Gly Ser Leu Gly
530 535 540

Glu Asp Asp Asn Leu Asp Phe Ser Gln Asn Ile Val Val Asp Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Leu Leu Glu Lys Ile Ser Ser Leu Ala Arg Ser Ser Glu Arg Gly
565 570 575

Tyr Ile His Tyr Ile Val Gln Leu Gln Gly Asp Lys Ile Ser Tyr Glu
580 585 590

Ala Ala Cys Asn Leu Phe Ala Lys Thr Pro Tyr Asp Ser Val Leu Phe
595 600 605

Gln Lys Asn Ile Glu Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Tyr Tyr Asn Pro Gly
610 615 620

Asp Gly Glu Ile Gln Glu Ile Asp Lys Tyr Lys Ile Pro Ser Ile Ile
625 630 635 640

Ser Asp Arg Pro Lys Ile Lys Leu Thr Phe Ile Gly His Gly Lys Asp
645 650 655

Glu Phe Asn Thr Asp Ile Phe Ala Gly Phe Asp Val Asp Ser Leu Ser
660 665 670

Thr Glu Ile Glu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Lys Glu Asp Ile Ser Pro
675 680 685

Lys Ser Ile Glu Ile Asn Leu Leu Gly Cys Asn Met Phe Ser Tyr Ser
690 695 700

Ile Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Leu Lys Val Lys
705 710 715 720

Asp Lys Ile Ser Glu Leu Met Pro Ser Ile Ser Gln Asp Ser Ile Ile
725 730 735

Val Ser Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly Arg Arg
740 745 750

Glu Leu Leu Asp His Ser Gly Glu Trp Ile Asn Lys Glu Glu Ser Ile
755 760 765

Ile Lys Asp Ile Ser Ser Lys Glu Tyr Ile Ser Phe Asn Pro Lys Glu
770 775 780

Asn Lys Ile Thr Val Lys Ser Lys Asn Leu Pro Glu Leu Ser Thr Leu
785 790 795 800

Leu Gln Glu Ile Arg Asn Asn Ser Asn Ser Ser Asp Ile Glu Leu Glu
805 810 815

Glu Lys Val Met Leu Thr Glu Cys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile

228
229

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
825 830

820

Asp Thr Gln Ile Val Glu Glu Arg Ile Glu Glu Ala Lys Asn Leu Thr
835 840 845

Ser Asp Ser Ile Asn Tyr Ile Lys Asp Glu Phe Lys Leu Ile Glu Ser
850 855 860

Ile Ser Asp Ala Leu Cys Asp Leu Lys Gln Gln Asn Glu Leu Glu Asp
865 870 875 880

Ser His Phe Ile Ser Phe Glu Asp Ile Ser Glu Thr Asp Glu Gly Phe
885 890 895

Ser Ile Arg Phe Ile Asn Lys Glu Thr Gly Glu Ser Ile Phe Val Glu
900 905 910

Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ser Glu Tyr Ala Asn His Ile Thr Glu Glu
915 920 925

Ile Ser Lys Ile Lys Gly Thr Ile Phe Asp Thr Val Asn Gly Lys Leu
930 935 940

Val Lys Lys Val Asn Leu Asp Thr Thr His Glu Val Asn Thr Leu Asn
945 950 955 960

Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Glu Tyr Asn Ser Ser Lys Glu
965 970 975

Ser Leu Ser Asn Leu Ser Val Ala Met Lys Val Gln Val Tyr Ala Gln
980 985 990

Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Thr Asp Ala Ala Lys Val Val
995 1000 1005

Glu Leu Val Ser Thr Ala Leu Asp Glu Thr Ile Asp Leu Leu Pro
1010 1015 1020

Thr Leu Ser Glu Gly Leu Pro Ile Ile Ala Thr Ile Ile Asp Gly
1025 1030 1035

Val Ser Leu Gly Ala Ala Ile Lys Glu Leu Ser Glu Thr Ser Asp
1040 1045 1050

Pro Leu Leu Arg Gln Glu Ile Glu Ala Lys Ile Gly Ile Met Ala
1055 1060 1065

Val Asn Leu Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ile Ile Thr Ser Ser Leu
1070 1075 1080

Gly Ile Ala Ser Gly Phe Ser Ile Leu Leu Val Pro Leu Ala Gly
1085 1090 1095

Ile Ser Ala Gly Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu Val Leu
1100 1105 1110

228
229

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Lys	Val	Val	Asp	Tyr	Phe	Lys	His	Val	Ser
1115						1120					1125			
Leu	Val	Glu	Thr	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Leu	Leu	Asp	Asp	Lys	Ile
1130						1135					1140			
Met	Met	Pro	Gln	Asp	Asp	Leu	Val	Ile	Ser	Glu	Ile	Asp	Phe	Asn
1145						1150					1155			
Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Leu	Gly	Lys	Cys	Glu	Ile	Trp	Arg	Met	Glu
1160						1165					1170			
Gly	Gly	Ser	Gly	His	Thr	Val	Thr	Asp	Asp	Ile	Asp	His	Phe	Phe
1175						1180					1185			
Ser	Ala	Pro	Ser	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Ile	Tyr
1190						1195					1200			
Asp	Val	Leu	Glu	Val	Gln	Lys	Glu	Glu	Leu	Asp	Leu	Ser	Lys	Asp
1205						1210					1215			
Leu	Met	Val	Leu	Pro	Asn	Ala	Pro	Asn	Arg	Val	Phe	Ala	Trp	Glu
1220						1225					1230			
Thr	Gly	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Glu	Asn	Asp	Gly	Thr
1235						1240					1245			
Lys	Leu	Leu	Asp	Arg	Ile	Arg	Asp	Asn	Tyr	Glu	Gly	Glu	Phe	Tyr
1250						1255					1260			
Trp	Arg	Tyr	Phe	Ala	Phe	Ile	Ala	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu
1265						1270					1275			
Lys	Pro	Arg	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Ile	Arg	Ile	Asn	Leu	Asp	Ser
1280						1285					1290			
Asn	Thr	Arg	Ser	Phe	Ile	Val	Pro	Ile	Ile	Thr	Thr	Glu	Tyr	Ile
1295						1300					1305			
Arg	Glu	Lys	Leu	Ser	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr
1310						1315					1320			
Ala	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	Tyr	Asn	Met	Gly	Ile	Asn	Ile	Glu	Leu
1325						1330					1335			
Ser	Glu	Ser	Asp	Val	Trp	Ile	Ile	Asp	Val	Asp	Asn	Val	Val	Arg
1340						1345					1350			
Asp	Val	Thr	Ile	Glu	Ser	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Leu	Ile
1355						1360					1365			
Glu	Gly	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Ser	Ile	Glu	Glu	Asn	Lys	Ile	Ile
1370						1375					1380			
Leu	Asn	Ser	His	Glu	Ile	Asn	Phe	Ser	Gly	Glu	Val	Asn	Gly	Ser
1385						1390					1395			

230
231

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Asn	Gly	Phe	Val	Ser	Leu	Thr	Phe	Ser	Ile	Leu	Glu	Gly	Ile	Asn
1400						1405					1410			
Ala	Ile	Ile	Glu	Val	Asp	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Lys	Leu	Leu
1415						1420					1425			
Ile	Ser	Gly	Glu	Leu	Lys	Ile	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	His	Ile
1430						1435					1440			
Gln	Gln	Lys	Ile	Asp	Tyr	Ile	Gly	Phe	Asn	Ser	Glu	Leu	Gln	Lys
1445						1450					1455			
Asn	Ile	Pro	Tyr	Ser	Phe	Val	Asp	Ser	Glu	Gly	Lys	Glu	Asn	Gly
1460						1465					1470			
Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Thr	Lys	Glu	Gly	Leu	Phe	Val	Ser	Glu	Leu
1475						1480					1485			
Pro	Asp	Val	Val	Leu	Ile	Ser	Lys	Val	Tyr	Met	Asp	Asp	Ser	Lys
1490						1495					1500			
Pro	Ser	Phe	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Asn	Leu	Lys	Asp	Val	Lys	Val
1505						1510					1515			
Ile	Thr	Lys	Asp	Asn	Val	Asn	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Lys
1520						1525					1530			
Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Asp	Glu	Lys
1535						1540					1545			
Thr	Ile	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	His	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Val	Ala
1550						1555					1560			
Glu	Ile	Leu	Lys	Phe	Met	Asn	Arg	Lys	Gly	Asn	Thr	Asn	Thr	Ser
1565						1570					1575			
Asp	Ser	Leu	Met	Ser	Phe	Leu	Glu	Ser	Met	Asn	Ile	Lys	Ser	Ile
1580						1585					1590			
Phe	Val	Asn	Phe	Leu	Gln	Ser	Asn	Ile	Lys	Phe	Ile	Leu	Asp	Ala
1595						1600					1605			
Asn	Phe	Ile	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Ile	Gly	Gln	Phe	Glu	Phe
1610						1615					1620			
Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Asp	Asn	Ile	Gln	Pro	Tyr	Phe	Ile	Lys	Phe
1625						1630					1635			
Asn	Thr	Leu	Glu	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Val	Gly	Asn	Arg	Gln
1640						1645					1650			
Asn	Met	Ile	Val	Glu	Pro	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Asp
1655						1660					1665			
Ile	Ser	Ser	Thr	Val	Ile	Asn	Phe	Ser	Gln	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Gly
1670						1675					1680			

231
232

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Ile	Asp	Ser	Cys	Val	Asn	Lys	Val	Val	Ile	Ser	Pro	Asn	Ile	Tyr
	1685					1690					1695			
Thr	Asp	Glu	Ile	Asn	Ile	Thr	Pro	Val	Tyr	Glu	Thr	Asn	Asn	Thr
	1700					1705					1710			
Tyr	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Leu	Asp	Ala	Asn	Tyr	Ile	Asn	Glu	Lys
	1715					1720					1725			
Ile	Asn	Val	Asn	Ile	Asn	Asp	Leu	Ser	Ile	Arg	Tyr	Val	Trp	Ser
	1730					1735					1740			
Asn	Asp	Gly	Asn	Asp	Phe	Ile	Leu	Met	Ser	Thr	Ser	Glu	Glu	Asn
	1745					1750					1755			
Lys	Val	Ser	Gln	Val	Lys	Ile	Arg	Phe	Val	Asn	Val	Phe	Lys	Asp
	1760					1765					1770			
Lys	Thr	Leu	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Phe	Asn	Phe	Ser	Asp	Lys	Gln
	1775					1780					1785			
Asp	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Leu	Ser	Phe	Thr	Pro	Ser	Tyr
	1790					1795					1800			
Tyr	Glu	Asp	Gly	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Leu	Gly	Leu	Val	Ser	Leu
	1805					1810					1815			
Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Tyr	Ile	Asn	Asn	Phe	Gly	Met	Met	Val	Ser
	1820					1825					1830			
Gly	Leu	Ile	Tyr	Ile	Asn	Asp	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Lys	Pro	Pro
	1835					1840					1845			
Val	Asn	Asn	Leu	Ile	Thr	Gly	Phe	Val	Thr	Val	Gly	Asp	Asp	Lys
	1850					1855					1860			
Tyr	Tyr	Phe	Asn	Pro	Ile	Asn	Gly	Gly	Ala	Ala	Ser	Ile	Gly	Glu
	1865					1870					1875			
Thr	Ile	Ile	Asp	Asp	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Gln	Ser	Gly	Val
	1880					1885					1890			
Leu	Gln	Thr	Gly	Val	Phe	Ser	Thr	Glu	Asp	Gly	Phe	Lys	Tyr	Phe
	1895					1900					1905			
Ala	Pro	Ala	Asn	Thr	Leu	Asp	Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Glu	Ala	Ile
	1910					1915					1920			
Asp	Phe	Thr	Gly	Lys	Leu	Ile	Ile	Asp	Glu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Phe
	1925					1930					1935			
Asp	Asp	Asn	Tyr	Arg	Gly	Ala	Val	Glu	Trp	Lys	Glu	Leu	Asp	Gly
	1940					1945					1950			
Glu	Met	His	Tyr	Phe	Ser	Pro	Glu	Thr	Gly	Lys	Ala	Phe	Lys	Gly

232
~~253~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
1960 1965

1955

1965

Leu Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly
1970 1975 1980

Val Met Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr
1985 1990 1995

Phe Asp Asp Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp
2000 2005 2010

Gly Lys His Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly
2015 2020 2025

Val Phe Asn Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn
2030 2035 2040

Glu Asp Leu Gly Asn Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly
2045 2050 2055

Ile Leu Asn Phe Asn Asn Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe
2060 2065 2070

Thr Ala Val Val Gly Trp Lys Asp Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr
2075 2080 2085

Tyr Phe Asp Glu Asp Thr Ala Glu Ala Tyr Ile Gly Leu Ser Leu
2090 2095 2100

Ile Asn Asp Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn Asp Asp Gly Ile Met Gln
2105 2110 2115

Val Gly Phe Val Thr Ile Asn Asp Lys Val Phe Tyr Phe Ser Asp
2120 2125 2130

Ser Gly Ile Ile Glu Ser Gly Val Gln Asn Ile Asp Asp Asn Tyr
2135 2140 2145

Phe Tyr Ile Asp Asp Asn Gly Ile Val Gln Ile Gly Val Phe Asp
2150 2155 2160

Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn
2165 2170 2175

Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val Glu Tyr Ser Gly Leu Val Arg
2180 2185 2190

Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly Glu Thr Tyr Thr Ile Glu
2195 2200 2205

Thr Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu Ser Asp Lys Tyr Tyr
2210 2215 2220

Phe Asn Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly Ile Asn Leu Ile
2225 2230 2235

233
~~234~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Asp Asp Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr
2240 2245 2250

Gly Leu Ile Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn
2255 2260 2265

Gly Glu Met Gln Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe
2270 2275 2280

Tyr Phe Gly Glu Asp Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr
2285 2290 2295

Pro Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu
2300 2305 2310

Asn Phe Glu Gly Glu Ser Ile Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu
2315 2320 2325

Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr
2330 2335 2340

Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp
2345 2350 2355

Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu
2360 2365

<210> 173
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment from C. difficile toxin TcdB

<400> 173

Ser Pro Val Glu Lys Asn Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Glu Val
1 5 10 15

Ser Asp

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment from C. difficile toxin TcdB

<400> 174

Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Val Arg Leu
1 5 10

<210> 175
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

234
~~255~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<400> 175

Cys Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met Leu Pro Gly Ile His
1 5 10 15

<210> 176
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment from C. difficile toxin TcdB

<400> 176

Cys Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met Leu Pro Gly Ile His Ser
1 5 10 15

Asp Leu Phe Lys
20

<210> 177
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 177

Cys Trp Glu Met Ile Lys Leu Glu Ala Ile Met Lys Tyr Lys
1 5 10

<210> 178
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 178

Cys Thr Asn Leu Val Ile Glu Gln Val Lys Asn Arg
1 5 10

<210> 179
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 179

Pro Glu Ala Arg Ser Thr Ile Ser Leu Ser Gly Pro
1 5 10

<210> 180
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

235
236

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

<400> 180

Cys Ser Asn Leu Ile Val Lys Gln Ile Glu Asn Arg
1 5 10

<210> 181
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 181

Thr Glu Gln Glu Ile Asn Ser Leu Trp Ser Phe Asp Gln Ala
1 5 10

<210> 182
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 182

Thr Glu Gln Glu Ile Asn Ser Leu Trp Ser Phe Asp Pro Glu Ala Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ile Ser Leu Ser Gly Pro Cys
20 25

<210> 183
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 183

Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Leu Cys
1 5 10

<210> 184
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 184

Cys Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly Arg
1 5 10

<210> 185
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 185

236
~~235~~

LIST SEC COLO-17184-841-001-4

Val Asn Thr Leu Asn Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Cys
1 5 10 15

<210> 186
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 186

Tyr Ala Gln Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Cys
1 5 10

<210> 187
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 187

Cys Ala Gly Ile Ser Ala Gly Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu
1 5 10 15

<210> 188
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 188

Asp Asp Leu Val Ile Ser Glu Ile Asp Phe Asn Asn Asn Ser Ile Cys
1 5 10 15

<210> 189
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 189

Met Glu Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr
1 5 10

<210> 190
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 190

Ala Val Asn Asp Thr Ile Asn Val Leu Pro Thr Ile Thr Glu Gly Ile
1 5 10 15

237
238

LIST SEC COLO-17184-841-001-4
Pro Ile Val Ser Thr Ile Leu Asp Gly Ile Asn Leu Gly Ala Ala Ile
20 25 30

Lys Glu Leu
35

<210> 191
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 191

Cys Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile
1 5 10 15

Glu Gly Gln Ala
20

<210> 192
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 192

Cys Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn Asp Asn Ile
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Ala
20

<210> 193
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 193

Cys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Glu Ala
1 5 10

<210> 194
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of C. difficile toxin TcdB

<400> 194

Cys Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Asp Thr Ala Glu Ala
1 5 10

239
238

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: 14/ 4/ 15/ AAAA MM DD	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14 822 86	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

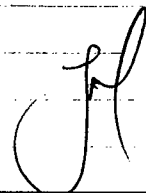
Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

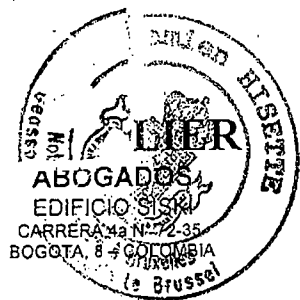
Observaciones:

EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 1 ARCHIVO:

1 EN FORMATO BLOC DE NOTAS, EL CUAL POR NO CUMPLIR CON LO ESTIPULADO EN LA CIRCULAR UNICA NO FUE PROCESADO

EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO 238





179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

UCB PHARMA S.A.

domiciliado (s) en/of

ALLEE DE LA RECHERCHE 60
BRUSSELS B-1070
BELGIUM

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARÍN tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN tpa. 64239, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as

240
240
~~244~~

modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this - 6 - 04 - 2009
en/in BRUSSELS
por/by Allen NORRIS
Proxy and legal representative
Firma Signature

241
241

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

El

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

is authentic, that the signatory currently acts in the position of

of the company

UCB PHARMA S.A

a company currently existing and organized under the laws of

that the address is

ALLEE DE LA RECHERCHE 60
BRUSSELS B-1070
BELGIUM

and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in

On

06/04/2009
Damien HISETTE
Notaire associé - Geassocieerde notaris
Rue de l'Association 30 Verenigingstraat
Bruxelles 1000 Brussel

El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. Pays: Belgique
- 2. Le présent acte public a été signé par: Hisette, Damien
- 3. Agissant en qualité de: Notaire
- 4. Est revêtu du sceau / timbre de: Notaire

Attesté Brussels

- 5. A Bruxelles
- 6. Le: 06/04/2009
- 7. Par le Service public fédéral Affaires étrangères, Commerce extérieur et Coopération au Développement
- 8. Sous le n°: 9805090406080349
- 9. Sceau/timbre:
- 10. Signature:



Verfaillie Arnaud

242
~~243~~

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.24/09a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

REPRESENTACIÓN Y PODER

Yo (nosotros), abajo firmado

UCB PHARMA S.A.

domiciliado en

ALLEE DE LA RECHERCHE 60

BRUSELAS B-1070

BÉLGICA

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA tpa. 65620 y GERMÁN MARÍN tpa. 64239 domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1° del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la

243
~~244~~

ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar,

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
TRANSCRIPTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1990
MINISTERIO DE JUSTICIA

admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Dado y firmado hoy -6 -04- 2009-08-

En Bruselas
Firma Ilegible
Por Allen NORRIS
Apoderado y Representante Legal

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

El suscrito Notario certifica: Que la firma que antecede de Allen NORRIS es auténtica, que el signatario desempeña actualmente el cargo de Apoderado y Representante Legal de la compañía UCB PHARMA S.A., sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de Bélgica, que la dirección de dicha compañía es ALLEE DE LA RECHERCHE 60, BRUSELAS B-1070, BÉLGICA y que el signatario tiene facultad para otorgar éste documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Bruselas el 06/04/2009

Firma Ilegible
Notario Público

Sello

Sello de Apostille expedido por Bélgica y certificado en Bruselas el 06/04/2009 con el no. **9805090406080349** y firmado *pode Verfaillie* Arnaud.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-156619\WPCL002H\COLO 17204-841-001-0

Dña F. Vega
FRANCISCO F. VARGAS
TRANSCRIPTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESTADAL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
HLS 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 AGO 26 A 8:22

[Signature]
SECRETARÍA DE
ESTADO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

022042

Diego Vargal
SECRETARÍA DE
ESTADO

~~245~~
246

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

246
247
248Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0039758

Bogotá D.C., Abril 11 de 2014 - 11:17:49

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	210279193	11/04/2014	14.692.200.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-082286- -00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:44:31
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 249

COLO: 17184-841-001-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 11 de 2014 - 11:17:55

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

247

248



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0039737

Bogotá D.C., Abril 11 de 2014 - 11:17:49

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	210279193	11/04/2014	14.692.200.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
31	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	961.000.00
				<u>\$961.000.00</u>

SON: **NOVECIENTOS SESENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-082286-00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:44:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249

Código: 17184-844-004-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 11 de 2014 - 11:17:54

1



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad

(31) **Prioridad**

(32) **Fecha**

(33) **País**

61/535,532

2011/09/16

US

61/638,731

2012/04/26

US

(51) Int Cl:

(71) Solicitante(s)

(72) Inventor(es)

(74) Apoderado:

C07K 016/012

UCB PHARMA S.A.

DAVID PAUL HUMPHREYS Y OTROS

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

(85) Fecha limite inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud:

No. de solicitud PCT/GB2012/052222

2014/04/16

2012/09/10

(87) Publicación internacional

Fecha:

N° publicación:

2013/03/21

WO 2013/038156 A1

(54) Título:

ANTICUERPOS CAPACES DE NEUTRALIZAR LAS PRINCIPALES EXOTOXINAS TCDA Y TCDB DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Resumen:

Esta presente invención describe la derivación y selección de anticuerpos capaces de neutralizar las principales exotoxinas TcdA y TcdB de *Clostridium difficile*. La invención describe igualmente propiedades novedosas de neutralización y unión a antígeno de Mabs individuales y mezclas de los mismos.

Figura 62A
Análisis TEER Caco-2 - TcdA

Anticuerpo (ng/ml)	CA922 (%)	CA923 (%)	CA995 (%)	CA1000 (%)
10	0	0	0	0
100	10	20	70	30
1000	35	45	75	70

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

PI02-F08 (2009-11-18)



No. 14-082286-00000-0000

Fecha: 2014-04-15 16:44:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249