

ANTICUERPOS PARA LA TOXINA SIMILAR A LA ENTERITIS NECRÓTICA B

La presente invención se refiere en general al campo de las proteínas de unión que se unen a NetB (toxina similar a la enteritis necrótica B), en particular anticuerpos, y en particular proteínas de unión y anticuerpos que se unen a NetB producida por *Clostridium perfringens*. Dichas proteínas de unión y anticuerpos anti-NetB tienen usos terapéuticos y protectores, como en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por o asociadas con la toxina NetB de *Clostridium perfringens*, en particular enteritis Necrótica (NE), por ejemplo, reduciendo su incidencia y gravedad. También se proporcionan composiciones, métodos y kits basados en proteínas de unión y anticuerpos.

La enteritis necrótica (NE) es una enfermedad gastrointestinal potencialmente mortal que afecta a animales y aves de corral, como pollos en particular. La enfermedad es causada por la bacteria *Clostridium perfringens*, una bacteria patógena grampositiva, anaeróbica y formadora de esporas. Es ubicua en el medio ambiente, por ejemplo, se encuentra comúnmente en el suelo, la basura, el polvo y en niveles bajos en el intestino de muchos humanos y animales, por ejemplo aves sanas (Hatheway, C.L., Clin. Microbiol. Rev. 1990, 3, 66-98).

La NE aviar es una enfermedad entérica que se caracteriza por lesiones necróticas en la mucosa del intestino delgado (Kaldhusdal y Hofshagen, 1992, Poult. Sci., 71, 1145-1153). En las aves de corral, la NE es un problema global y se ha estimado que la enfermedad le cuesta a la industria avícola internacional más de 6 mil millones de dólares estadounidenses por año en pérdidas de producción y medidas de control (Cooper y Songer, 2009, Anaerobe, 15, 55-60; Wade et al., 2015, Veterinary Microbiology, 180, 299-303).

La enteritis necrótica ocurre cuando una gran cantidad de *Clostridium perfringens* crece en los intestinos y secreta toxinas. Estas toxinas causan necrosis y lesiones en los intestinos, hemorragias, perforación del intestino y, finalmente, muerte por choque séptico. La NE es una enfermedad compleja y se requieren factores predisponentes que comprometan la integridad intestinal para facilitar la proliferación de *C. perfringens* y la producción de toxinas.

Existen varios tipos diferentes de *C. perfringens*, que producen varias toxinas: alfa, beta, épsilon, iota, CPE y NetB (Rood et al., 2018, Anaerobe, 53: 5–10). Todas las cepas de *C. perfringens* producen α -toxina, una toxina extracelular (Awad et al., 1995, Mol. Microbiol., 15, 191-202), pero se ha descubierto que esta toxina no es necesariamente necesaria para la enfermedad NE (Keyburn et al., 2006, Infect. Immun., 74, 6496-6500). Sin embargo, se cree que la toxina NetB (que se identificó originalmente en cepas aviarias de *C. perfringens* tipo A, Keyburn et al., 2008, PLoS Pathog., 4, e6) es un factor de virulencia clave, y probablemente esencial, en cepas de *C. perfringens* que causan NE aviar. *C. perfringens* es el principal agente causal de NE aviar, que generalmente es causada por cepas de tipo A y tipo C de *C. perfringens* (Songer 1996, Clin. Microbiol. Rev., 9, 216-234). Muy recientemente, se ha propuesto un nuevo esquema de tipo de toxina de *C. perfringens* en el que las cepas productoras de NE que expresan NetB actualmente se clasifican como tipo G (Rood et al., 2018, Anaerobe, 53: 5-10).

La mejor opción terapéutica actual para la enteritis necrótica aviar son los antibióticos. También se han llevado a cabo trabajos para intentar desarrollar vacunas basadas en las moléculas de la toxina. Este trabajo se ha centrado principalmente en la toxina alfa, pero también se han realizado algunos trabajos sobre vacunas basadas en NetB. Sin embargo, hasta la fecha, las vacunas solo han demostrado ser parcialmente efectivas y, además, la vacuna comercial disponible utiliza un vector de *Salmonella* modificado genéticamente, lo que constituye un posible problema de seguridad para los seres humanos. Los antibióticos tienen el inconveniente de ejercer presión selectiva y causar resistencia a los antimicrobianos (en animales y seres humanos).

Por lo tanto, existe una clara necesidad de opciones de tratamiento y prevención alternativas y, preferiblemente, mejoradas para la enteritis necrótica o las infecciones causadas por *Clostridium perfringens* o asociadas con él, en particular las infecciones causadas por o asociadas con la toxina NetB de *Clostridium perfringens*.

La presente invención proporciona una opción terapéutica o preventiva alternativa en forma de proteínas de unión y anticuerpos (por ejemplo,

proteínas de unión basadas en anticuerpos) dirigidos a NetB, que pueden actuar para reducir o prevenir la enteritis necrótica (NE), o infecciones causadas por o asociadas con *Clostridium perfringens* o la toxina NetB, en particular infecciones causadas por o asociadas con la toxina NetB de *Clostridium perfringens*, como la

5 NE. Un enfoque de anticuerpos antitoxina evita ventajosamente el uso de antibióticos y no ejerce presión de selección en virtud del hecho de que no se dirige a la bacteria en sí, sino a la toxina que es producida por la bacteria.

La administración oral de tales terapias biológicas sería una opción preferida porque se dirige al sitio de la infección. Sin embargo, tales modos de

10 administración generalmente se evitan debido a la degradación de tales entidades en el entorno ácido y rico en enzimas del tracto gastrointestinal y el estómago (o más específicamente el buche, proventrículo y molleja en especies aviares como los pollos).

Los anticuerpos (anticuerpos monoclonales) de la invención han

15 demostrado ser capaces de unirse a NetB con alta afinidad y también muestran una buena capacidad para inhibir la toxicidad inducida por NetB. Ventajosamente, dichos anticuerpos también muestran estas capacidades en condiciones como las que se encuentran en el tracto gastrointestinal y el intestino delgado. Por lo tanto, dichas capacidades también se muestran a pH 6.0, así como a pH 7.4. Los

20 anticuerpos también son estables a un pH incluso más bajo, como a pH 2,5 o 1,8. Además, los anticuerpos muestran resistencia a ciertas proteasas como las que se encuentran en el tracto gastrointestinal y el intestino delgado, en particular quimotripsina, pepsina y pancreatina. Dichas propiedades hacen que estos anticuerpos sean particularmente adecuados y ventajosos para los usos

25 terapéuticos descritos.

Los presentes inventores han proporcionado así anticuerpos anti-NetB que son capaces de unirse a e inhibir la actividad o función de NetB, en particular la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*. Dichos anticuerpos (o por ejemplo otras proteínas de unión que comprenden un dominio de unión al

30 antígeno NetB como se describe en el presente documento) pueden, por ejemplo, inhibir la capacidad tóxica o citotóxica de NetB, por ejemplo, inhibir la capacidad

de NetB para lisar o matar células que son susceptibles a la toxina NetB, incluida la actividad hemolítica de NetB, por ejemplo, en glóbulos rojos. Dichos anticuerpos (o por ejemplo otras proteínas de unión que comprenden un dominio de unión al antígeno NetB como se describe en el presente documento) se pueden utilizar de forma conveniente y ventajosa para tratar o prevenir la NE en especies aviares, en particular la NE causada por o asociada con la infección por *Clostridium perfringens*.

En una modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, que se une a NetB, por ejemplo NetB de *Clostridium perfringens*, para su uso en el tratamiento o la prevención de NE, o infecciones causadas por o asociadas con *Clostridium perfringens*, en particular infecciones causadas por o asociadas con la toxina NetB de *Clostridium perfringens*, como NE, en un sujeto (o grupo de sujetos). Los temas preferidos son especies aviares como las aves de corral.

Por lo tanto, en particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a NetB para su uso en el tratamiento o prevención de NE u otras infecciones causadas por o asociadas con la toxina NetB de *Clostridium perfringens* en aves de corral. Sin embargo, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento o prevención de cualquier patología en cualquier sujeto en el que se demuestre que NetB desempeña un papel, en cuyo caso la unión e inhibición de esta proteína tóxica sería una herramienta terapéutica útil.

Como se discute en otra parte del presente documento, los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención y adecuados para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento tienen una alta afinidad por NetB, p. ej. cuando se mide por Biacore (la capacidad de unirse a NetB se observa a pH 6.0, así como a pH 7.4), la capacidad de reducir la actividad tóxica de NetB (esta capacidad se observa a pH 6.0, así como a pH 7.4, y preferiblemente a una temperatura de 42 °C y 37 °C), resistencia a varias proteasas, por ejemplo, resistencia a la digestión con pepsina (p. ej. a una concentración de pepsina de 30 U/ml a una temperatura de 37 °C), resistencia a la

digestión con quimotripsina (p. ej. a una concentración de quimotripsina de 1 µg/ml a una temperatura de 37 °C) y, opcionalmente, resistencia a la digestión con pancreatina (p. ej. a una concentración de pancreatina de 0,5 mg/ml a una temperatura de 37 °C). Los anticuerpos preferidos (o proteínas de unión) también

5 muestran estabilidad en agua. Hasta donde saben los inventores, no se han descrito otros anticuerpos anti-NetB que tengan esta combinación ventajosa de propiedades y se prefieren los anticuerpos (o proteínas de unión) con una o más, preferiblemente todas, de estas propiedades.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona una

10 proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad

15 (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de GSIRSISFMN (SEQ ID NO: 2), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, opcionalmente en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones

20 de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de INQIGNT (SEQ ID NO: 3), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, opcionalmente en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 aminoácidos sustituciones en

25 comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 de pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de IVRGTVSPFQF (SEQ ID NO:4), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, opcionalmente en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones

30 de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona una

proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de GLTFSGYSLG (SEQ ID NO: 10), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, opcionalmente en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de ISSSGMIT (SEQ ID NO: 11), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, opcionalmente en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 aminoácidos sustituciones de ácido en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de RFPRPRSWLSTDSYNY (SEQ ID NO: 12), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, opcionalmente en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de GSIRSISFMN (SEQ ID NO:2),

(ii) una CDR2 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia

de aminoácidos de INQIGNT (SEQ ID NO:3), y

(iii) una CDR3 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de IVRGTVSPFQF (SEQ ID NO:4).

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una
 5 proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, que comprende al menos un dominio de unión a antígeno que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad
 10 (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de GLTFSGYSLG (SEQ ID NO:10),

(ii) una CDR2 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de ISSSGMIT (SEQ ID NO:11), y

15 (iii) una CDR3 de variable pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de RFPRPRSWLSTDSYNY (SEQ ID NO:12).

Ciertas modalidades preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo (o proteína de unión) que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium*
 20 *perfringens*, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 9, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. En algunas modalidades, dichos anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDR de cadena ligera, y preferiblemente tres CDR de cadena ligera.

25 En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 9, o una secuencia que tiene al menos un 60%,
 30 65%, 70% o 75% de identidad de secuencia con la misma, preferiblemente al menos un 80% de identidad de secuencia con la misma (por ejemplo, al menos un

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad). En algunas modalidades, dichos anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDRs de cadena ligera, y preferiblemente tres CDRs de cadena ligera.

5 En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión), que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 9. En algunas modalidades, dichos anticuerpos (o
10 proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDRs de cadena ligera, y preferiblemente tres CDRs de cadena ligera.

En algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) son anticuerpos VHH con tres CDRs, o comprenden un dominio VH con tres CDRs, pero donde no hay regiones o dominios VL presentes. Por lo tanto, en tales
15 modalidades, el dominio de unión al antígeno puede comprender (o consistir en) 3 regiones CDR y opcionalmente 4 regiones FR. En tales modalidades, opcionalmente no hay regiones constantes de inmunoglobulina o anticuerpo presentes, por ejemplo, la CDR y opcionalmente las regiones FR pueden ser las únicas secuencias derivadas de anticuerpos que están presentes. Por lo tanto, en
20 algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión), o dominios de unión al antígeno de los mismos, comprenden (comprenden solo) una única región variable de cadena pesada.

Otras modalidades preferidas son formas de inmunoglobulina (Ig), por ejemplo, formas IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, incluida la forma IgY de pollo, o
25 formas que contienen toda o parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, la totalidad o parte de una IgG, u otra, región constante, de los diversos anticuerpos (o proteínas de unión) definidos en este documento, por ejemplo, formas Ig o IgG, IgA o IgY de longitud completa. En algunas modalidades, no se utilizan formas IgY. Por supuesto, se entiende que los
30 anticuerpos IgG (y otros) completos comprenderán típicamente dos cadenas pesadas idénticas o sustancialmente idénticas (con regiones variables y

constantes apropiadas) y dos cadenas ligeras idénticas o sustancialmente idénticas (con regiones variables y constantes apropiadas). Además, también se pueden utilizar anticuerpos de cadena pesada de longitud completa únicamente, que típicamente comprenderán dos cadenas pesadas idénticas o sustancialmente idénticas (con regiones variables y constantes apropiadas), como en los anticuerpos de camélidos (que típicamente tienen dos cadenas pesadas idénticas o sustancialmente idénticas que comprenden una región variable junto con dominios constantes CH₂ y CH₃, en particular dominios constantes IgG tales como dominios constantes IgG2 o IgG3). Las formas preferidas que contienen parte de una región constante de inmunoglobulina son formas que contienen una región o dominio Fc, por ejemplo, fusiones Fc. Tales regiones o dominios Fc son conocidos en la técnica y generalmente comprenden dominios CH₂ y CH₃ de cadenas pesadas de anticuerpos (dominios CH₂, CH₃ y CH₄ en el caso de IgY e IgE), que se asocian para formar un homodímero. Por lo tanto, pueden preferirse los formatos que contienen dominios CH₂ y CH₃ (o dominios CH₂, CH₃ y CH₄), en particular regiones Fc de IgG, IgA o IgY, y, en algunas modalidades, no están presentes otras regiones constantes de anticuerpos.

Estas regiones pueden derivarse de cualquier fuente o especie apropiada, por ejemplo, una fuente o especie que sea la misma o diferente de la especie huésped utilizada para generar los anticuerpos, por ejemplo, por inmunización, o una fuente o especie que sea la misma o diferente de la fuente o especie de la que se derivan o corresponden los anticuerpos. En algunas modalidades, estas regiones pueden corresponder o derivar de regiones o dominios Fc de las especies a las que se pretende administrar los anticuerpos, por ejemplo, para terapia. Las especies apropiadas se definen en otra parte del presente documento, por ejemplo, las especies aviares.

Como dichas regiones Fc son homodímeras (o forman homodímeros), se pueden utilizar convenientemente para dimerizar dos cadenas polipeptídicas. Por lo tanto, mediante la unión o fusión de uno o más anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos VHH) de la invención a cada cadena de una región Fc, cuando las dos cadenas de la región Fc se dimerizan, se

pueden utilizar para proporcionar múltiples copias de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos VHH) de la invención en una única construcción o molécula. Si más de un anticuerpo de dominio único (por ejemplo, anticuerpo VHH) de la invención está unido o fusionado a cada cadena de una región Fc en
5 secuencia, entonces estos anticuerpos pueden ser el mismo anticuerpo (por ejemplo, se pueden proporcionar dos o más copias del mismo VHH en cada cadena) o anticuerpos diferentes. Por lo tanto, por ejemplo, la fusión Fc se puede utilizar para proporcionar constructos que comprenden más de una copia de anticuerpos de dominio único idénticos de la invención o más de una copia de
10 diferentes anticuerpos de dominio único de la invención. Como dichos constructos generalmente contienen más de una copia del mismo anticuerpo (por ejemplo, más de una copia de un anticuerpo de dominio único o anticuerpo VHH o más de una copia de múltiples anticuerpos de dominio único o anticuerpos VHH diferentes) de la invención, dichos constructos pueden mostrar una unión
15 mejorada de NetB, por ejemplo debido a un efecto de avidéz.

Las proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos, basados en las secuencias de anticuerpos Net 83 o Net 14 que se exponen en las Tablas A o B, respectivamente, son las preferidas. La invención se ejemplifica mediante anticuerpos monoclonales que son anticuerpos VHH (anticuerpos de dominio
20 único), cuyas secuencias se muestran en las Tablas A o B de este documento. Los dominios CDR de VH y los dominios VH de cada uno de estos anticuerpos VHH se muestran en las Tablas A o B de este documento. Los anticuerpos (o proteínas de unión) que comprenden estos conjuntos de dominios CDR de VH, o dominios VH, o estos conjuntos de dominios FR, o formatos que contienen IgG/Fc
25 que comprenden dichos dominios (o secuencias sustancialmente homólogas a los mismos) son modalidades preferidas de la invención.

Ciertos ejemplos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que tienen al menos un 60% o un 65% de identidad con las secuencias de aminoácidos descritas. En ciertas modalidades, los anticuerpos (o
30 proteínas de unión) de la invención, o sus dominios de unión a antígeno, comprenden una o al menos una región variable de cadena pesada que incluye

una región de secuencia de aminoácidos con al menos un 60 %, 65 %, 70 % o 75 %, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 % u 89 %, más preferiblemente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % y lo más preferiblemente al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 9.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de las secuencias de aminoácidos descritas.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen 1, 2, 3 ó 4, preferiblemente 1, 2 ó 3, preferiblemente 1 ó 2 (más preferiblemente 1), aminoácidos alterados en una o más de las regiones CDR o una o más de las regiones FR descritas. Dichas alteraciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadas o no conservadas, o una mezcla de las mismas.

Otros ejemplos preferidos de secuencias "sustancialmente homólogas" son secuencias que tienen al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una o más de las regiones CDR o una o más de las regiones FR descritas en las Tablas A o B. Por lo tanto, en algunas modalidades, una secuencia CDR "sustancialmente homóloga" puede ser una secuencia que tiene al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de secuencia con una secuencia CDR dada descrita en el presente documento.

En algunas modalidades, en anticuerpos que tienen una secuencia "sustancialmente homóloga" en comparación con una secuencia dada, o que tienen un cierto grado de identidad de secuencia en comparación con una secuencia dada, el/los residuo(s) de aminoácidos alterados no están en una región

CDR. Por ejemplo, en algunas modalidades, en anticuerpos que tienen un dominio VH que tiene un cierto grado de identidad de secuencia con una secuencia de dominio VH dada de un anticuerpo particular de la invención (por ejemplo, Net 14 o Net 83), el/los residuo(s) alterado(s) (o variante) no están en una región CDR.

5 Por lo tanto, en algunas modalidades, en anticuerpos que tienen una secuencia "sustancialmente homóloga" en comparación con una secuencia dada, o que tienen un cierto grado de identidad de secuencia en comparación con una secuencia dada, el/los residuo(s) de aminoácidos alterados están en una o más regiones marco.

10 Como se desprende claramente de otras partes del presente documento, en otras modalidades, en anticuerpos que tienen una secuencia "sustancialmente homóloga" en comparación con una secuencia dada, o que tienen un cierto grado de identidad de secuencia en comparación con una secuencia dada, los residuos de aminoácidos alterados pueden estar en una
15 región CDR.

En algunas modalidades, en un anticuerpo que tiene una secuencia "sustancialmente homóloga" en comparación con una secuencia dada, o que tiene un cierto grado de identidad de secuencia en comparación con una secuencia dada, las tres secuencias de aminoácidos de CDR de VH (es decir, las tres
20 secuencias de CDR de VH tomadas juntas) se consideran juntas como el complemento de CDR completo (o entero) del anticuerpo, y la secuencia de aminoácidos de dicho complemento de CDR completo de dicho anticuerpo es al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 % idéntica al complemento de CDR completo (o entero) correspondiente de un
25 anticuerpo de partida (o de referencia) dado. El anticuerpo de partida (o de referencia) puede tener las secuencias CDR de los anticuerpos Net 14 o Net 83 de la presente invención.

Los residuos alterados pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadas o no conservadas, o una mezcla de las mismas.

30 En dichas modalidades, las alteraciones preferidas son sustituciones de aminoácidos conservativas.

En todas las modalidades, las proteínas de unión, p. ej. Los anticuerpos que contienen secuencias sustancialmente homólogas conservan la capacidad de unirse a NetB, por ejemplo, la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*, o la NetB de SEQ ID NO: 17. Preferiblemente, las proteínas de unión, por ejemplo, los anticuerpos, que contienen secuencias sustancialmente homólogas conservan una o más (preferiblemente todas) de las otras propiedades descritas en este documento en relación con los anticuerpos Net 83 o Net 14 como se describe en este documento.

Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos sustancialmente homólogas de acuerdo con la presente invención se describen en otra parte del presente documento.

Las CDRs de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención están separadas preferiblemente por regiones de marco apropiadas, como las que se encuentran en anticuerpos naturales y/o anticuerpos diseñados de manera efectiva. Por lo tanto, las secuencias VH (por ejemplo, VHH), VL y CDR individuales de la invención se proporcionan preferiblemente dentro o se incorporan en un marco o estructura apropiado para permitir la unión del antígeno (aquí NetB). Dichas secuencias o regiones de marco pueden corresponder a regiones de marco de origen natural, FR1, FR2, FR3 y/o FR4, según corresponda para formar una estructura apropiada, o pueden corresponder a regiones de marco de consenso, por ejemplo identificadas mediante la comparación de varias regiones de marco de origen natural. Alternativamente, se pueden utilizar estructuras o marcos que no sean de anticuerpos, por ejemplo, marcos de receptores de células T.

Las secuencias apropiadas que se pueden utilizar para las regiones de marco son bien conocidas y están documentadas en la técnica y se puede utilizar cualquiera de ellas. Las secuencias preferidas para las regiones de marco son una o más de las regiones de marco que forman los anticuerpos VHH de la invención, preferiblemente una o más de las regiones de marco de los anticuerpos VHH Net 83 o Net 14, como se describe en las Tablas A o B, o regiones de marco sustancialmente homólogas a las mismas, y en particular regiones de marco que

permiten el mantenimiento de la especificidad del antígeno, por ejemplo regiones de marco que dan como resultado sustancialmente la misma o la misma estructura 3D del anticuerpo.

En ciertas modalidades preferidas, todas las cuatro regiones marco (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8), según corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención.

En otras modalidades preferidas, todas las cuatro regiones marco (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16), según corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención.

Las secuencias de CDR de ciertos anticuerpos de la invención se exponen en el presente documento en las Tablas A y B. En algunas otras modalidades, las secuencias de CDR de los anticuerpos de la invención pueden ser secuencias de CDR en los dominios VH y los dominios VL de los anticuerpos de la invención como se identifica utilizando cualquier método (o herramienta) adecuado, por ejemplo, como se identifica de acuerdo con los métodos bien conocidos de Kabat (p. ej., Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991) o Chothia (p. ej., Chothia C, et al. (1989) Nature, 342:877–883, o Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948), o como se identifica utilizando el esquema de numeración IMGT (p. ej., Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); www.imgt.org)). Se ha utilizado el esquema de numeración IMGT para identificar las secuencias CDR en las Tablas A y B.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona proteínas de unión, por ejemplo anticuerpos, o proteínas de unión que comprenden el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, que se unen a (o reconocen específicamente o se unen específicamente a) NetB, por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*. Las proteínas de unión preferidas de la invención son anticuerpos, y en particular anticuerpos VHH. Sin embargo, las modalidades como se describe en este documento que se relacionan

con anticuerpos, por ejemplo anticuerpos VHH, se aplican igualmente, *mutatis mutandis*, a otros tipos de proteínas de unión, o viceversa. Por lo tanto, otras proteínas de unión pueden comprender los anticuerpos de la invención o pueden comprender los dominios de unión al antígeno de los anticuerpos de la invención, por ejemplo las tres regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3), o las tres regiones CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) y las cuatro regiones FR (FR1, FR2, FR3 y FR4). También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos que incorporan los anticuerpos de la invención, por ejemplo anticuerpos biespecíficos o triespecíficos.

Las proteínas de unión preferidas son cualquier cadena polipeptídica simple que pueda unirse (por ejemplo, unirse específicamente) a NetB, por ejemplo, la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*. Los tipos apropiados de proteína de unión que podrían usarse en la invención son conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades se usan polipéptidos basados en inmunoglobulina, que generalmente comprenden regiones CDR (y opcionalmente regiones FR o un marco basado en inmunoglobulina), de modo que las regiones CDR (y opcionalmente regiones FR) de los anticuerpos de la invención se pueden injertar en un marco o estructura apropiado, por ejemplo, una estructura de inmunoglobulina.

Sin embargo, en otras modalidades, se pueden usar estructuras que no estén basadas en inmunoglobulina, por ejemplo, estructuras de unión de cadena simple, sobre las cuales se pueden injertar CDR apropiados que median la unión al antígeno objetivo. Por ejemplo, las regiones CDR (y opcionalmente las regiones FR) de los anticuerpos de la invención se pueden injertar en una estructura que no esté basada en inmunoglobulina apropiada y se pueden seleccionar por la capacidad de unirse específicamente a NetB, por ejemplo la toxina NetB producida por *Clostridium perfringens*. Dichas moléculas también se denominan imitadores de anticuerpos (o miméticos de anticuerpos). Se conocen y describen en la técnica ejemplos de proteínas de unión de cadena sencilla que no están basadas en inmunoglobulina apropiadas e incluyen fibronectinas (o moléculas basadas en fibronectina), por ejemplo basadas en el décimo módulo del dominio de tipo III de fibronectina, como Adnectinas (p. ej. de Compound

Therapeutics, Inc., Waltham, MA); afímeros (p. ej. de Avacta); proteínas de repetición de anquirina o DARPin (p. ej. de Molecular Partners AG, Zurich, Suiza); lipocalinas, p. ej. anticalinas (p. ej. de Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania); dominios A humanos (p. ej., Avimers); proteína A estafilocócica (p. ej., de Affibody AG, Suecia); tioredoxinas; y moléculas basadas en gamma-B-cristalina o ubiquitina, p. ej., afillinas (p. ej., de Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

Las proteínas que no se unen a anticuerpos preferidas (o fracciones de unión) de la invención tienen la capacidad de unirse al mismo epítipo que un anticuerpo anti-NetB de la invención y dichas proteínas de unión (o fracciones de unión) pueden seleccionarse, por ejemplo, mediante ensayos de competencia como los descritos en otra parte del presente documento, utilizando, por ejemplo, un anticuerpo de la invención como anticuerpo de referencia.

La NetB es una toxina conocida que puede producir *Clostridium perfringens*. Se ha identificado como una proteína formadora de poros de tipo I de 130 kDa de aproximadamente 322 aminoácidos de longitud que tiene un péptido señal de aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. Estas toxinas forman poros que alteran la bicapa de fosfolípidos de la membrana de las células humanas y animales, lo que provoca una afluencia de iones que puede provocar la lisis celular. La NetB tiene una alta actividad hemolítica hacia los glóbulos rojos de las aves.

De particular relevancia para la presente invención, la NetB puede ser producida por *Clostridium perfringens*, y se cree que desempeña un papel vital en la capacidad de este patógeno para causar enfermedades en animales, en particular especies aviares. En este sentido, se cree que NetB, y en particular NetB producido por *C. perfringens*, es un agente causal clave en la enfermedad enteritis necrótica (NE) en animales, en particular especies aviares como pollos, pavos, etc. Por lo tanto, la capacidad de las proteínas de unión o anticuerpos de la presente invención para unirse a NetB y también para inhibir, reducir o neutralizar de otro modo las actividades tóxicas de NetB son importantes y preferidas.

Las proteínas de unión o anticuerpos de la presente invención se

unen o son capaces de unirse (o unirse específicamente) a NetB. En modalidades preferidas de la invención, las proteínas de unión o anticuerpos de la invención se unen o son capaces de unirse (o unirse específicamente) a NetB producido por *Clostridium perfringens*. En modalidades preferidas de la invención, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención pueden inhibir, reducir o neutralizar de otro modo las actividades tóxicas de NetB.

La NetB al que se unen o son capaces de unirse (o reconocer o unirse específicamente) los anticuerpos de la presente invención puede ser de (o puede corresponder a) cualquier cepa o subtipo de *Clostridium perfringens*, en particular cepas de tipo A de *C. perfringens* (también denominadas cepas de tipo G).

Las proteínas de unión y los anticuerpos de la invención pueden unirse a cualquier forma apropiada de NetB, en particular formas tóxicas de NetB. Tales formas pueden incluir, por tanto, NetB de longitud completa, o formas de longitud no completa de NetB, por ejemplo, formas truncadas o fragmentos (fragmentos funcionales) de NetB, u otras formas variantes de NetB que, por ejemplo, conservan su capacidad tóxica. Las formas preferidas y convenientes de NetB a las que se pueden unir las proteínas de unión y los anticuerpos de la invención incluyen NetB recombinante, por ejemplo una forma recombinante de NetB de *Clostridium perfringens*, o una forma nativa o natural de NetB, por ejemplo una forma secretada o soluble de NetB (p. ej. como la producida por *C. perfringens*) o una forma de NetB cuando está presente en la superficie celular (NetB de superficie celular), por ejemplo en células donde NetB ha formado un poro multimérico.

Los tipos de células apropiados en los que NetB puede formar un poro serán bien conocidos por una persona experta en la materia e incluyen células intestinales.

Las formas ejemplares de NetB, p. ej. NetB recombinante, como se pueden usar en este documento para evaluar la capacidad de unión de las proteínas de unión y los anticuerpos son NetB de longitud completa (con o sin el péptido señal, convenientemente sin el péptido señal), preferiblemente NetB de

longitud completa que corresponde a la proteína NetB (tóxica) producida por *Clostridium perfringens*, o formas mutantes inactivas de NetB tales como una forma mutante de toxoide, por ejemplo la forma mutante W262A que es bien conocida y descrita en la técnica.

5 Las secuencias de NetB son bien conocidas y están descritas en la técnica y pueden obtenerse, por ejemplo, de varias bases de datos de secuencias, por ejemplo, Uniprot. Para facilitar la referencia, la NetB de *Clostridium perfringens* tiene el número Uniprot A8ULG6 o D5K6C0 o EU143239.

10 Una molécula preferida y ejemplar de NetB tiene o comprende (o consiste en) la secuencia EU143239 o SEQ ID NO:17 (péptido señal eliminado). Por lo tanto, las proteínas de unión preferidas o los anticuerpos de la invención se unen a o son capaces de unirse (o unirse específicamente) a SEQ ID NO:17, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, con al menos un 80% de identidad con la misma), o un fragmento, por ejemplo, un fragmento
15 biológicamente activo, de la misma. Los fragmentos biológicamente activos preferidos de NetB tienen o mantienen su actividad tóxica. Sin embargo, algunas formas no tóxicas o inactivas, por ejemplo, formas mutantes o variantes, de NetB son conocidas en la técnica, por ejemplo, formas mutantes toxoides de NetB, y en algunas modalidades las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención
20 también pueden unirse a estas formas de NetB. Un ejemplo particular de una forma inactiva de NetB es la forma mutante W262A (numeración sin péptido señal, SEQ ID NO: 18) que se puede utilizar para inmunizar animales, por ejemplo, en protocolos de vacunación.

25 Los métodos para evaluar la unión a (o la capacidad de unirse a) formas apropiadas de NetB serían bien conocidos por una persona experta en la materia y se puede utilizar cualquier método apropiado.

Un método conveniente y apropiado para evaluar la unión incluiría ensayos de unión in vitro, tales como ensayos ELISA para evaluar la unión de anticuerpos a antígeno inmovilizado, tales como formas inmovilizadas de NetB
30 como se describió anteriormente, por ejemplo, NetB monomérico, por ejemplo, que comprende SEQ ID NO: 17 o una forma mutante del mismo, por ejemplo, la

forma mutante W262A. La persona experta estará familiarizada con los ensayos ELISA y podrá establecer fácilmente las condiciones adecuadas para evaluar la capacidad de una proteína de unión o anticuerpo para unirse a NetB en dicho ensayo. En la sección de Ejemplos se describe un ensayo ELISA particularmente preferido (ELISA de unión).

En ciertas modalidades, las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención se unen a NetB (p. ej., NetB recombinante o Net B correspondiente a NetB de *Clostridium perfringens*, p. ej., con SEQ ID NO: 17) en (como se determina en) un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) (p. ej., un ensayo BIAcore). En la técnica se conocen ensayos SPR adecuados. En ciertos ensayos SPR preferidos, una forma apropiada de NetB, p. ej., NetB, p. ej., NetB monomérico, con SEQ ID NO: 17, o una forma mutante de la misma, p. ej., la forma mutante W262A se captura (o inmoviliza) en un soporte sólido (p. ej., un chip sensor), por ejemplo, mediante acoplamiento de amina (p. ej., se inmovilizan aproximadamente 350 unidades de respuesta (RU) NetB) y, a continuación, se inyectan varias concentraciones (p. ej., una serie de diluciones, p. ej., una serie de diluciones de duplicación o triplicación) de la proteína de unión o anticuerpo que se va a probar. Las concentraciones de anticuerpo se seleccionan generalmente en un intervalo tal que el chip no se sature y que permita un ajuste robusto por parte del software SPR/Biacore. Las concentraciones y velocidades de flujo preferidos para la inyección se describen en la sección de Ejemplos.

Estos métodos de ensayo SPR también se pueden utilizar de forma conveniente para medir la cinética de unión de la interacción anticuerpo-antígeno, p. ej., para determinar la velocidad de asociación (k_a), la velocidad de disociación (k_d) y la afinidad (KD). En ciertas modalidades, las mediciones se pueden realizar a 25 °C en un tampón adecuado, p. ej., un tamponador HEPES-EDTA estándar como HBS-EP (vendido por GE Healthcare Life Sciences, 0,01 M HEPES pH 7.4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,0005 % surfactante P20), a pH 7.4. Los parámetros cinéticos se pueden determinar o calcular mediante cualquier modelo o software adecuado, por ejemplo, ajustando los datos experimentales del sensograma suponiendo una interacción 1:1, por ejemplo, utilizando el método de evaluación

predefinido Single Cycle Kinetics del software Biacore Insight Evaluation. En la sección de Ejemplos de este documento se describe un ensayo SPR particularmente preferido.

Por lo tanto, en una modalidad particularmente preferida, las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención se unen a NetB (p. ej., NetB recombinante o Net B correspondiente a NetB de *Clostridium perfringens*, p. ej., con SEQ ID NO: 17) en (como se determina en, cuando se evalúa en) un ensayo de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) (p. ej., un ensayo BIACore). Los ensayos de SPR preferidos y las condiciones para dichas mediciones se describen en otra parte del presente documento. Las afinidades de unión ejemplares también se describen en otra parte del presente documento.

En ciertas modalidades preferidas, los anticuerpos de la presente invención, cuando están en formato VHH, tienen una alta afinidad de unión por NetB (p. ej., NetB recombinante o Net B correspondiente a NetB de *Clostridium perfringens*, p. ej., con SEQ ID NO: 17), tienen una K_D (constante de disociación de equilibrio) en el rango de 1 nM o 500 pM o inferior (mejor), por ejemplo, cuando se determina en un ensayo de SPR.

Por lo tanto, preferiblemente, los anticuerpos de la invención, cuando están en formato VHH, tienen una afinidad de unión por NetB (por ejemplo, NetB recombinante o Net B correspondiente a NetB de *Clostridium perfringens*, por ejemplo con SEQ ID NO: 17) que corresponde a una K_D de menos de 10 nM, menos de 1 nM (o menos de 1000 pM), menos de 900 pM, menos de 800 pM, menos de 700 pM, menos de 600 pM, menos de 500 pM, menos de 450 pM, menos de 400 pM, menos de 350 pM, menos de 300 pM, menos de 250 pM, menos de 225 pM, menos de 200 pM, menos de 180 pM, menos de 160 pM, menos de 150 pM, menos de 140 pM, menos de 130 pM, menos de 120 pM, menos de 110 pM, menos de 100 pM, menos de 90 pM, menos de 80 pM, menos de 70 pM o menos de 60 pM, por ejemplo, cuando se determina en un ensayo SPR. En los Ejemplos se describen afinidades de unión ejemplares particulares. Por ejemplo, el anticuerpo Net 83 ejemplificado de la invención muestra una afinidad de unión de 213 pM y el anticuerpo Net 14 de la invención muestra una

afinidad de unión de 95 pM a un pH de 7.4. Por lo tanto, las proteínas de unión o anticuerpos preferidos de la invención comprenden un dominio de unión a antígeno, o al menos un dominio de unión a antígeno, que se une a NetB con una K_D de 250 pM o menos (o menos de 250 pM) a pH 7.4. Otras K_D s ejemplares se proporcionan anteriormente. Dicho de otra manera, las proteínas de unión, p. ej. Los anticuerpos de la invención pueden unirse a NetB con una K_D de 250 pM o menos a pH 7.4.

Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un (o al menos un) dominio de unión a antígeno que se une a la toxina similar a la enteritis necrótica B (NetB), comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno una (o al menos una) región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente en donde dicha proteína de unión (o dominio de unión a antígeno) se une a NetB con una K_D de 250 pM o menos a pH 7.4.

Las formas ejemplares de NetB que se pueden utilizar para evaluar dicha afinidad de unión son NetB recombinante, por ejemplo, con una secuencia de SEQ ID NO: 17 Las formas ejemplares apropiadas se describen en la sección de Ejemplos. Por lo tanto, las afinidades de unión anteriores se pueden observar cuando o si los anticuerpos de la invención se ensayan utilizando estas secuencias, por ejemplo, en un ensayo SPR. Los ensayos SPR preferidos y las condiciones para dichas mediciones, por ejemplo, concentraciones de NetB inmovilizado, tamponador y concentraciones de anticuerpo, se describen en otras partes del presente documento, incluida la sección de Ejemplos. Un pH ejemplar que se utilizaría sería pH 7.4.

Los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención son capaces de unirse a NetB, por ejemplo, como se describió anteriormente, a un pH neutro o un nivel de pH como el que se encuentra en fluidos biológicos neutros, como suero o sangre. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a NetB, por ejemplo, como se describió anteriormente, a un pH de o aproximadamente 7.4.

Ventajosamente, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención también son capaces de unirse a NetB, por ejemplo, como se describió anteriormente, a pH bajos o más bajos, por ejemplo, un nivel de pH como el que se encuentra en el tracto gastrointestinal o el intestino delgado. Por ejemplo, se cree que los niveles de pH en el tracto gastrointestinal o el intestino delgado varían de aproximadamente 5.7 a 6.5. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a NetB, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, con las afinidades de unión descritas anteriormente, a un pH de 6.0 o cercano a él. Esta propiedad es ventajosa, ya que significa que los anticuerpos de la invención pueden seguir uniéndose al antígeno objetivo NetB en las condiciones que se dan en el tracto gastrointestinal o el intestino delgado, que es un sitio de acción clave de la toxina NetB, por ejemplo, cuando esta toxina es producida por *C. perfringens*. Esta propiedad también es ventajosa para la administración oral u otras vías de administración en las que el anticuerpo se administra al tracto gastrointestinal o al intestino delgado.

En modalidades preferidas de la invención, los anticuerpos (o proteínas de unión) muestran niveles similares o mejorados de unión de pH 6.0 a pH 7.4.

Además de ser capaces de unirse a NetB, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención son capaces de inhibir (o reducir o neutralizar o bloquear) el efecto o la actividad tóxica (o citotóxica) de la toxina NetB, por ejemplo, la toxina NetB producida por *C. perfringens*. Por ejemplo, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención son capaces de inhibir (o reducir o neutralizar o bloquear) la capacidad de NetB para causar lisis o hemólisis de células, por ejemplo, células objetivo apropiadas, tales como glóbulos rojos.

Preferiblemente, la inhibición o reducción es una inhibición o reducción medible, más preferiblemente una inhibición o reducción significativa, por ejemplo, una inhibición o reducción estadísticamente significativa, tal como con un valor de probabilidad de $\leq 0,05$ o $< 0,05$. En ciertas modalidades, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención pueden inhibir o reducir (o neutralizar) la capacidad de NetB, por ejemplo, NetB producido por *C. perfringens*,

para provocar hemólisis de células en al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %. Los anticuerpos preferidos de la invención tienen la capacidad de inhibir casi por completo la toxicidad de NetB, por ejemplo, la hemólisis inducida por NetB; por ejemplo, se puede observar una inhibición de al menos un 90 %. Normalmente, dicho porcentaje de inhibición (y otros niveles de porcentaje de inhibición como se describe en el presente documento) se compara con (o es relativo a) un ensayo de control o nivel de control apropiado, por ejemplo, un ensayo de control o nivel de control en ausencia de una proteína de unión o anticuerpo (anticuerpo anti-NetB), por ejemplo, un control negativo o un nivel de fondo o ensayo. Por lo tanto, un nivel de inhibición (control) del 0 % (o, por el contrario, un nivel de lisis del 100 % o máximo) es típicamente el nivel en ausencia de una proteína de unión o anticuerpo (anticuerpo anti-NetB).

Dicha capacidad para inhibir (o reducir o neutralizar) el efecto tóxico o la actividad de la toxina NetB, o para inhibir, etc., la toxicidad inducida por NetB, por ejemplo, la toxina NetB producida por *C. perfringens*, se puede determinar o probar en cualquier ensayo apropiado, cuyos ejemplos se derivarían fácilmente por una persona experta en la materia. Los ensayos apropiados podrían ser, por ejemplo, ensayos *in vitro* y, por ejemplo, implicar el uso de células objetivo apropiadas para la toxina NetB, y medir el efecto de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención para inhibir (o reducir o neutralizar) el efecto tóxico o la actividad de la toxina NetB sobre dichas células.

Los ensayos particularmente útiles pueden implicar la medición de la capacidad de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención para inhibir (o reducir o neutralizar) el efecto hemolítico de la toxina NetB sobre células objetivo, tales como glóbulos rojos, en particular glóbulos rojos de pollo. Dichos ensayos también pueden denominarse ensayos de inhibición de NetB o ensayos de lisis de glóbulos rojos, por ejemplo, ensayos de lisis de glóbulos rojos de pollo. En dichos ensayos, las células apropiadas (por ejemplo, glóbulos rojos, tales como glóbulos rojos de pollo) pueden ponerse en contacto con NetB a un nivel que causará

hemólisis, por ejemplo, hemólisis completa/máxima, o submáxima (por ejemplo, lisis del 80% o una dosis o concentración EC_{80} de NetB) de las células. La capacidad de las proteínas de unión o anticuerpos de la invención para inhibir o reducir dicha hemólisis puede entonces analizarse fácilmente, por ejemplo, en

5 comparación con (o en relación con) un nivel de hemólisis del 100% establecido por el ensayo de control. Esta capacidad se puede evaluar fácilmente calculando un valor de CI_{50} . Para evitar dudas, el término valor de CI_{50} tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la concentración de una proteína de unión o anticuerpo necesaria para inhibir el 50 % de la actividad tóxica/citotóxica del NetB

10 presente. En la sección de Ejemplos se describe un ensayo de hemólisis apropiado y ejemplar que utiliza glóbulos rojos de pollo.

Se pueden utilizar concentraciones adecuadas de proteína de unión o anticuerpo para inhibir o reducir el efecto tóxico o hemolítico. Los anticuerpos ejemplares de la invención tienen la capacidad de provocar inhibición, por ejemplo,

15 los niveles de inhibición que se describen en el presente documento, con anticuerpo, en particular VHH, cuando se utilizan en concentraciones de al menos 0 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ó 5.0 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo en concentraciones de hasta 1.0, 1.5, 1.8, 2.0, 3.0, 4.0, ó 5.0 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre 0.3, 0.4 ó 0.5 y 1.0, 1.5, 1.8 ó

20 2.0 $\mu\text{g/ml}$, o entre 0.3, 0.4 or 0.5 y 3.0, 4.0 ó 5.0 $\mu\text{g/ml}$.

Se puede observar que la proteína de unión o el anticuerpo de la invención se dirigen a la toxina NetB en sí, en contraposición a la entidad productora de NetB, por ejemplo, la entidad infecciosa como *C. perfringens*. Esto proporciona una ventaja importante de poder inhibir o reducir la enfermedad o los

25 síntomas causados por la infección con cualquier entidad que produzca NetB (por ejemplo, NetB como se describe en otra parte del presente documento), o cualquier forma de NetB (u otra proteína) a la que se puedan unir los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención. De esta manera, los anticuerpos, etc., de la invención pueden proporcionar un medio para tratar enfermedades causadas por

30 muchas cepas de *C. perfringens* y otros agentes infecciosos que producen NetB o toxinas similares, siempre que dichos agentes infecciosos utilicen dichas toxinas

para causar enfermedades (en otras palabras, tengan NetB o toxinas similares como agente causante de la enfermedad). Por lo tanto, los anticuerpos, etc., de la presente invención tienen una amplia utilidad y pueden usarse, por ejemplo, para tratar o prevenir cualquier enfermedad en la que NetB (o una toxina similar a la que los anticuerpos de la invención pueden unirse) sea un agente causante. También pueden usarse para tratar enfermedades en etapa temprana, ya que se dirigen al agente tóxico producido por *C. perfringens* en lugar de a la entidad *C. perfringens* en sí. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención brindan ventajas importantes y flexibilidad con respecto a varios métodos anteriores, como la vacunación.

En ciertas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la presente invención tienen una CI_{50} (por ejemplo, para la inhibición, reducción o neutralización de NetB, por ejemplo, inhibición de la hemólisis de NetB de células objetivo, por ejemplo, glóbulos rojos, preferiblemente glóbulos rojos de pollo) de 300 nM o menos, 280 nM o menos, 260 nM o menos, 250 nM o menos, 240 nM o menos, 220 nM o menos, 210 nM o menos, 200 nM o menos, 190 nM o menos, 180 nM o menos, 170 nM o menos, 160 nM o menos, 150 nM o menos, 140 nM o menos, 130 nM o menos, 120 nM o menos, 110 nM o menos, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 35 nM o menos, 30 nM o menos, 25 nM o menos, o 20 nM o menos. En algunas modalidades, la CI_{50} es de 20 o 30 a 300, 250 o 200 nM; o de 20 o 30 a 150 nM; o de 20 o 30 a 140 nM; o de 20 o 30 a 130 nM o de 20 o 30 a 120 nM; o de 20 o 30 a 110 nM; o de 20 o 30 a 100 nM; o 20 o 30 a 90 nM; o 20 o 30 a 80 nM; o 20 o 30 a 70 nM. También se muestran valores de CI_{50} ejemplares particulares en los Ejemplos. Por ejemplo, Net 14 ha mostrado una CI_{50} de tan solo 23 nM y Net 83 ha mostrado una CI_{50} de tan solo 61 nM.

En ciertas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la presente invención tienen una CI_{50} (por ejemplo, para la inhibición o reducción o neutralización de NetB, por ejemplo, inhibición de la hemólisis de NetB de células objetivo, por ejemplo, glóbulos rojos, preferiblemente glóbulos rojos de pollo), que, cuando se expresa como una relación molar con la toxina NetB utilizada en el

ensayo, es una relación de aproximadamente 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 o 1:1 (anticuerpo:NetB). Por lo tanto, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención son extremadamente potentes. Por ejemplo, Net 14 ha mostrado una relación molar de aproximadamente 1:1 y Net 83 ha mostrado una relación molar de aproximadamente 2:1 o 3:1.

Los valores de CI_{50} preferidos, como se describió anteriormente, son preferiblemente determinados en un ensayo de toxicidad apropiado realizado en condiciones apropiadas para permitir que se midan o determinen los valores de CI_{50} , por ejemplo, un ensayo de hemólisis apropiado, por ejemplo, como se describió anteriormente o en la sección de Ejemplos. Estos ensayos se pueden realizar con cualquier formato de anticuerpo (o proteína de unión) apropiado. Por lo tanto, los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando se evalúa un formato de dominio único VHH o alternativo de los anticuerpos.

Los ensayos de inhibición de NetB como se describe en este documento se pueden realizar a cualquier pH apropiado, por ejemplo, a los pH descritos en otras partes de este documento, típicamente a un pH fisiológico neutro, por ejemplo, pH 7.4, o a un pH típico del tracto gastrointestinal o intestino delgado, por ejemplo, a un pH de 5.7 a 6.5, por ejemplo, pH 6.0. También se pueden utilizar cantidades apropiadas (dosis) de NetB y estas pueden ser determinadas fácilmente por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, se pueden elegir cantidades (dosis) de NetB que pueden causar una cierta cantidad de lisis (p. ej., según se determina en una titulación de lisis de NetB separada, p. ej., una titulación de lisis de glóbulos rojos de NetB), p. ej., una lisis/toxicidad máxima (100 %) o un % de lisis/toxicidad submáximo diferente, por ejemplo, una lisis/toxicidad del 80 % (es decir, un valor o dosis de CE_{80}).

Los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando NetB se utiliza a una concentración o dosis de CE_{80} , por ejemplo, a una concentración de 20 nM. Por lo tanto, los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando NetB se utiliza a una concentración de 20 nM y/o

cuando el ensayo se lleva a cabo a un pH de 7.4 o 6.0. Por lo tanto, los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando NetB se utiliza a una concentración o dosis de CE_{80} (por ejemplo, una concentración de 20 nM) y/o cuando el ensayo se lleva a cabo a un pH de 7.4 o 6.0. Por lo tanto, por ejemplo, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención son capaces de reducir la actividad tóxica de NetB a un pH de 6.0. Por ejemplo, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención son capaces de reducir la actividad tóxica de una concentración de CE_{80} de NetB o NetB de 20 nM contra glóbulos rojos de pollo con un valor de CI_{50} inferior a 150 nM (o 150 nM o menos) a un pH de 6.0. En el presente documento se proporcionan otros valores de CI_{50} ejemplares.

Los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención muestran una actividad equivalente, pero más preferiblemente, mejor, por ejemplo, un valor de IC_{50} menor o reducido, cuando se analiza a pH 6.0 en comparación con un pH de 7.4. Dichos anticuerpos deberían estar particularmente bien adaptados para ser eficaces contra NetB en las condiciones que se encuentran en el tracto gastrointestinal o el intestino delgado, lo que es ventajoso cuando se trata del tratamiento de enfermedades causadas por o asociadas con NetB en esta ubicación del cuerpo, por ejemplo, para enfermedades causadas por infección por *C. perfringens*, y en particular enfermedades causadas por la producción de NetB por *C. perfringens*, como NE. Por ejemplo, Net 83 y Net 14 muestran ambos esta actividad mejorada/valor de IC_{50} menor.

En modalidades alternativas de la invención, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para reducir el riesgo de o prevenir enfermedades causadas por o asociadas con NetB en esta ubicación del cuerpo, por ejemplo, para enfermedades causadas por infección por *C. perfringens*, y en particular enfermedades causadas por la producción de NetB por *C. perfringens*, como NE.

Los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención presentan ventajosamente y preferiblemente la propiedad adicional de ser resistentes a las proteasas, en particular a diversas proteasas que se encuentran en el entorno

gastrointestinal y del intestino delgado. No todos los anticuerpos que presentan la capacidad de unirse a NetB muestran estas propiedades y, por lo tanto, dichos anticuerpos están particularmente bien adaptados para ser eficaces contra NetB en las condiciones que se encuentran en el tracto gastrointestinal o el intestino delgado.

Por ejemplo, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención son resistentes a la quimotripsina o resistentes a la digestión con quimotripsina. El término "resistente a la quimotripsina" o "resistente a la digestión con quimotripsina" como se usa en el presente documento incluye que los anticuerpos (o proteínas de unión) no pierden, o mantienen, una capacidad significativa o medible para unirse a NetB y/o para inhibir (o reducir o neutralizar) la actividad tóxica de NetB como se describe en otra parte del presente documento, después de la exposición o el contacto con la quimotripsina. Por ejemplo, los anticuerpos con esta propiedad son capaces de inhibir (o reducir o neutralizar) la capacidad de NetB para causar hemólisis de células, por ejemplo, células objetivo apropiadas, como glóbulos rojos, después del contacto con (o exposición a) quimotripsina. Dichos anticuerpos también son capaces de unirse a NetB, por ejemplo NetB producido por *C. perfringens*, después del contacto con (o exposición a) quimotripsina. Visto de manera alternativa, dichos anticuerpos conservan la actividad para inhibir (o reducir o neutralizar) NetB después de entrar en contacto con (o exposición a) quimotripsina. Estas capacidades de los anticuerpos después de la exposición a quimotripsina (o en presencia de quimotripsina) pueden compararse convenientemente con el nivel observado en ausencia de quimotripsina, o sin exposición a quimotripsina.

Se puede utilizar cualquier nivel o concentración apropiados de quimotripsina. Los niveles preferidos y ejemplares reflejarían los que se encuentran en el intestino delgado o el tracto gastrointestinal. Un nivel ejemplar descrito en el presente documento es una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de quimotripsina. Otras condiciones de exposición ejemplares serían una temperatura de 37° C durante un período de tiempo apropiado, por ejemplo, durante o al menos 30 minutos y, por ejemplo, hasta 2 horas o hasta una hora. Un pH ejemplar

sería un pH de 7.4. Por lo tanto, los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención son resistentes a la digestión con quimotripsina a una concentración de quimotripsina de 1 µg/ml, por ejemplo, a 37° C. Los anticuerpos preferidos de la invención son resistentes a la digestión con quimotripsina a una
5 concentración de quimotripsina de 1 µg/ml, cuando se exponen a dicha quimotripsina durante o al menos 30 minutos, por ejemplo, una hora, por ejemplo, a 37° C. Cada uno de los anticuerpos ejemplificados, Net 14 y Net 83, muestra esta propiedad.

En ciertas modalidades, después de la exposición a quimotripsina,
10 las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención aún pueden inhibir o reducir (o neutralizar) la capacidad de NetB, por ejemplo NetB producido por *C. perfringens*, para causar hemólisis de células en al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos
15 un 92%, al menos un 95% o al menos un 98%. Los anticuerpos preferidos de la invención tienen la capacidad de inhibir casi por completo la toxicidad de NetB, por ejemplo, la hemólisis inducida por NetB, después de la exposición a quimotripsina, por ejemplo, se puede observar una inhibición de al menos un 85% o un 90%. Alternativamente, se puede observar una inhibición de al menos un 50%, un 60%,
20 un 70%, un 75% o un 80%.

Por lo general, dicho porcentaje de inhibición (y otros niveles de porcentaje de inhibición como se describe en el presente documento) se compara con (o es relativo a) un ensayo de control o nivel de control apropiado, por ejemplo, un ensayo de control o nivel de control en ausencia de una proteína de
25 unión o anticuerpo (anticuerpo anti-NetB), por ejemplo, un control negativo o un nivel de fondo o ensayo. Por lo tanto, un nivel de inhibición del 0 % (control) (o, por el contrario, un nivel de hemólisis del 100 % o máximo) es típicamente el nivel en ausencia de una proteína de unión o anticuerpo (anticuerpo anti-NetB).

Además, dicho porcentaje de inhibición después de la exposición a la
30 quimotripsina (en presencia de quimotripsina), también se puede comparar convenientemente con un porcentaje de inhibición equivalente en ausencia de

quimotripsina para evaluar o determinar la resistencia o la resistencia relativa del anticuerpo (o proteína de unión) a la quimotripsina. Los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención mantienen una capacidad significativa o medible para unirse a NetB y/o para inhibir (o reducir o neutralizar) la actividad tóxica de NetB como se describe en otra parte de este documento, después de la exposición a la quimotripsina, por ejemplo, la exposición a la quimotripsina como se describe en este documento. Por ejemplo, la capacidad de dichos anticuerpos (o proteínas de unión) para unirse a NetB y/o para inhibir (o reducir o neutralizar) la actividad tóxica de NetB no se reduce significativamente por la exposición a la quimotripsina.

En ciertas modalidades, tras la exposición a quimotripsina, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la presente invención tienen una CI_{50} (p. ej., para la inhibición, reducción o neutralización de NetB, por ejemplo, inhibición de la hemólisis de NetB de células objetivo, p. ej., glóbulos rojos, preferiblemente glóbulos rojos de pollo) de 300 nM o menos, 280 nM o menos, 260 nM o menos, 250 nM o menos, 240 nM o menos, 220 nM o menos, 210 nM o menos, 200 nM o menos, 190 nM o menos, 180 nM o menos, 170 nM o menos, 160 nM o menos, 150 nM o menos, 140 nM o menos, 130 nM o menos, 120 nM o menos, 110 nM o menos, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 35 nM o menos, 30 nM o menos, 25 nM o menos, o 20 nM o menos. En algunas modalidades, la CI_{50} es de 20 o 30 a 300, 250 o 200 nM; o de 20 o 30 a 160 nM; o de 20 o 30 a 150 nM; o de 20 o 30 a 120 nM; o de 20 o 30 a 110 nM. Preferentemente, tras la exposición a quimotripsina, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención tienen una CI_{50} de 300 nM o menos, 260 nM o menos, 240 nM o menos, 220 nM o menos, 210 nM o menos, 200 nM o menos, 190 nM o menos, 180 nM o menos, 170 nM o menos, 160 nM o menos, 150 nM o menos, 140 nM o menos, 130 nM o menos, 120 nM o menos. Valores de CI_{50} ejemplares particulares y condiciones de ensayo se describen en otras partes del presente documento o se muestran en los Ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo ejemplificado Net 14 aún muestra una CI_{50} de 114 nM y Net 83 aún muestra una CI_{50} de 195 nM después de la exposición a 1

µg/ml de quimotripsina durante 30 minutos o 1 hora a 37° C. Por lo tanto, en algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención tienen una CI₅₀ de 220 nM o menos después de la exposición a 1 µg/ml de quimotripsina durante 30 minutos o 1 hora a 37° C. En dichas modalidades, un pH ejemplar es 7.4. En dichas modalidades, una concentración ejemplar de NetB es una concentración o dosis de CE₈₀, o una concentración de 20 nM. Otros valores ejemplares de CI₅₀ se describen en otra parte del presente documento.

Los ensayos adecuados para evaluar la capacidad de unirse a NetB y/o neutralizar (o inhibir o reducir) la actividad tóxica de NetB son bien conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquiera de ellos. Los ensayos preferidos y ejemplares se describen en otra parte de este documento, por ejemplo, ensayos hemolíticos o ensayos de unión ELISA o SPR.

Por lo tanto, los valores de CI₅₀ preferidos como se describieron anteriormente son preferiblemente los determinados en un ensayo de toxicidad adecuado (ensayo de inhibición de NetB) realizado en condiciones adecuadas para permitir que los valores de CI₅₀ se midan o determinen como se describe en otra parte de este documento. Por lo tanto, los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando los anticuerpos, preferiblemente anticuerpos VHH (o proteínas de unión) de la invención se exponen a 1 µg/ml de quimotripsina durante 30 minutos o 1 hora a 37° C, antes de evaluarse en un ensayo de toxicidad (ensayo de inhibición de NetB) utilizando una concentración apropiada (concentración tóxica) de NetB (por ejemplo, una concentración o dosis de CE₈₀), preferiblemente un ensayo hemolítico, más preferiblemente un ensayo hemolítico en el que se evalúa la lisis de glóbulos rojos de pollo, por ejemplo, utilizando una concentración de NetB de 20 nM. Un pH ejemplar sería un pH de 7.4. Por lo tanto, los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando se utiliza NetB a una concentración de CE₈₀ (por ejemplo, una concentración de 20 nM) y/o cuando el ensayo se lleva a cabo a un pH de 7.4.

Los anticuerpos preferidos (o proteínas de unión) de la invención conservan al menos el 50%, por ejemplo al menos el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

80% u 85% de la capacidad para inhibir o neutralizar NetB, cuando se exponen a quimotripsina (o en presencia de quimotripsina), en comparación con el mismo anticuerpo (o proteína de unión) que no ha sido expuesto a quimotripsina (o en ausencia de quimotripsina). Nuevamente, dichos valores pueden ser valores
5 determinados cuando los anticuerpos, preferiblemente anticuerpos VHH (o proteínas de unión) de la invención se exponen a 1 µg/ml de quimotripsina durante 1 hora a 37 °C, antes de evaluarse en un ensayo de toxicidad (ensayo de inhibición de NetB) utilizando una concentración apropiada (concentración tóxica) de NetB, preferiblemente un ensayo hemolítico, más preferiblemente un ensayo
10 hemolítico donde se evalúa la lisis de glóbulos rojos de pollo, por ejemplo, utilizando una concentración de NetB de 20 nM. En los Ejemplos también se muestran valores de % de retención y condiciones de ensayo ejemplares particulares. Por ejemplo, el anticuerpo ejemplificado Net 14 retiene el 66 % de actividad y Net 83 retiene el 80 % de actividad después de la exposición a
15 quimotripsina. Por lo tanto, en algunas modalidades, se prefieren los anticuerpos (proteínas de unión) con estos, o al menos estos, valores de % de retención, en estas condiciones.

En algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención son resistentes a la pepsina o resistentes a la digestión con pepsina. El
20 término “resistente a la pepsina” o “resistente a la digestión con pepsina” como se utiliza en el presente documento incluye que los anticuerpos (o proteínas de unión) no pierden, o mantienen, una capacidad significativa o medible para unirse a NetB y/o para inhibir (o reducir o neutralizar) la actividad tóxica de NetB como se describe en otra parte del presente documento, después de la exposición o
25 contacto con la pepsina. Por ejemplo, los anticuerpos con esta propiedad son capaces de inhibir (o reducir o neutralizar) la capacidad de NetB para causar hemólisis de células, por ejemplo, células objetivo apropiadas como glóbulos rojos, después del contacto con (o exposición a) la pepsina. Dichos anticuerpos también son capaces de unirse a NetB, por ejemplo NetB como se produce por *C.*
30 *perfringens*, después del contacto con (o exposición a) la pepsina. Visto de manera alternativa, dichos anticuerpos conservan la actividad para inhibir (o

reducir o neutralizar) NetB después de entrar en contacto con (o exposición a) la pepsina. Estas capacidades de los anticuerpos después de la exposición a la pepsina (o en presencia de pepsina) se pueden comparar convenientemente con el nivel observado en ausencia de pepsina, o sin exposición a la pepsina.

5 Se puede utilizar cualquier nivel o concentración de pepsina apropiados. Los niveles preferidos y ejemplares reflejarían los que se encuentran en el intestino delgado o el tracto gastrointestinal. Un nivel ejemplar divulgado en el presente documento es una concentración de 30 U/ml (que corresponde a aproximadamente 30 µg/ml) de pepsina. Sin embargo, también se han utilizado
10 niveles superiores de al menos 100 U/ml (que corresponden a aproximadamente 100 µg/ml), en particular una concentración de 107 U/ml (que corresponde a aproximadamente 107 µg/ml). Otras condiciones de exposición ejemplares serían una temperatura de 37 °C durante un período de tiempo apropiado, p. ej. durante al menos 5, 15, 30 o 45 minutos y, por ejemplo, hasta 2 horas, hasta 1,5 horas o
15 hasta una hora. Como la pepsina solo es activa a pH ácido (por ejemplo, es inactiva a pH fisiológicos neutros, como pH 7.4), otra condición de exposición ejemplar es la de pH ácido, en particular un pH de 1.8 o 2.5, o un pH intermedio, o un pH inferior a 3.0 o inferior a 2.0.

 Por lo tanto, los anticuerpos preferidos de la invención son
20 resistentes a la digestión con pepsina a una concentración de pepsina de 30 U/ml o 107 U/ml, por ejemplo a 37° C. Los anticuerpos preferidos de la invención son resistentes a la digestión con pepsina a una concentración de pepsina de 30 U/ml, cuando se exponen a dicha pepsina durante al menos 15, 30, 45, 60 o 90 minutos a 37° C. Cada uno de los anticuerpos ejemplificados, Net 14 y Net 83, muestra
25 esta propiedad. Por ejemplo, tanto Net 14 como Net 83 muestran resistencia a la pepsina cuando se exponen a 30 U/ml de pepsina durante 1 hora, y Net 83 muestra resistencia a la pepsina cuando se expone durante 1,5 horas (90 minutos). Ambos anticuerpos también muestran resistencia a la pepsina cuando se exponen a 107 U/ml de pepsina durante 15 o 30 minutos. Como se explicó
30 anteriormente, dicha resistencia se observa a un pH ácido, por ejemplo a un pH inferior a 3.0 o 2.0, por ejemplo a un pH de 1.8 o 2.5.

Por lo tanto, dichos anticuerpos conservan la capacidad de reducir la actividad tóxica (citotóxica) de NetB después de la exposición a la pepsina en estas condiciones u otras condiciones como se describe en este documento.

- 5 Alternativamente, o adicionalmente, dichos anticuerpos conservan la capacidad de unirse a NetB después de la exposición a la pepsina en estas condiciones u otras condiciones como se describe en este documento.

Por lo tanto, también se prefieren los anticuerpos (o proteínas de unión) que tienen actividad detectable o medible, por ejemplo, unión a NetB o
 10 inhibición de NetB, después de la exposición a la pepsina, por ejemplo, exposiciones a la pepsina como se describe en este documento, por ejemplo, exposición a 30 U/ml o al menos 100 U/ml de pepsina, por ejemplo, 107 U/ml de pepsina, durante 15, 30, 45, 60 o 90 minutos, por ejemplo a 37 °C. Más preferiblemente, los anticuerpos (o proteínas de unión) tienen una actividad de
 15 unión o inhibición de NetB significativa después de dicha exposición, por ejemplo, una actividad o unión que no se reduce significativamente en comparación con la actividad observada cuando no se produce exposición a pepsina.

En ciertas modalidades, después de la exposición a pepsina, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención aún pueden inhibir o reducir
 20 (o neutralizar) la capacidad de NetB, por ejemplo, NetB producido por *C. perfringens*, para causar hemólisis de células en al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %. Los anticuerpos
 25 preferidos de la invención tienen la capacidad de inhibir casi por completo la toxicidad de NetB, por ejemplo, la hemólisis inducida por NetB, después de la exposición a la pepsina, por ejemplo, se puede observar una inhibición de al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. Alternativamente, se puede observar una inhibición de al menos el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %
 30 o 65 %.

Por lo general, dicho % de inhibición (y otros niveles de porcentaje de

inhibición como se describe en este documento) se compara con (o es relativo a) un ensayo de control o nivel de control apropiado, por ejemplo, un ensayo de control o nivel de control en ausencia de una proteína de unión o anticuerpo (anticuerpo anti-NetB, por ejemplo, un control negativo o nivel de fondo o ensayo.

- 5 Por lo tanto, un nivel de inhibición del 0 % (control) (o por el contrario, un nivel de hemólisis del 100 % o máximo) es típicamente el nivel en ausencia de una proteína de unión o anticuerpo (anticuerpo anti-NetB).

Además, dicho % de inhibición después de la exposición a la pepsina (en presencia de pepsina), también se puede comparar convenientemente con un
 10 % de inhibición equivalente en ausencia de pepsina para evaluar o determinar la resistencia o la resistencia relativa del anticuerpo (o proteína de unión) a la pepsina. Los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención mantienen una capacidad significativa o medible para unirse a NetB y/o para inhibir (o reducir o neutralizar) la actividad tóxica de NetB como se describe en
 15 otra parte del presente documento, después de la exposición a pepsina. Por ejemplo, la capacidad de dichos anticuerpos (o proteínas de unión) de unirse a NetB y/o inhibir (o reducir o neutralizar) la actividad tóxica de NetB no se reduce significativamente por la exposición a la pepsina.

En ciertas modalidades, tras la exposición a la pepsina, los
 20 anticuerpos (o proteínas de unión) de la presente invención tienen una CI_{50} (p. ej., para la inhibición, reducción o neutralización de NetB, por ejemplo, inhibición de la hemólisis de NetB de células objetivo, p. ej., glóbulos rojos, preferiblemente glóbulos rojos de pollo) de 400 nM o menos, 350 nM o menos, 300 nM o menos, 280 nM o menos, 260 nM o menos, 250 nM o menos, 240 nM o menos, 220 nM o
 25 menos, 210 nM o menos, 200 nM o menos, 190 nM o menos, 180 nM o menos, 170 nM o menos, 160 nM o menos, 150 nM o menos, 140 nM o menos, 130 nM o menos, 120 nM o menos, 110 nM o menos, 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 35 nM o menos, 30 nM o menos, 25 nM o menos, o 20 nM o menos. En algunas
 30 modalidades, la CI_{50} es de 20 o 30 a 300, 250 o 200 nM; o de 20 o 30 a 160 nM; o de 20 o 30 a 150 nM; o de 20 o 30 a 120 nM; o de 20 o 30 a 110 nM.

Preferentemente, tras la exposición a la pepsina, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención tienen una CI_{50} de 400 nM o menos, 350 nM o menos, 300 nM o menos, 260 nM o menos, 240 nM o menos, 220 nM o menos, 210 nM o menos, 200 nM o menos, 190 nM o menos, 180 nM o menos, 170 nM o menos, 160 nM o menos, 150 nM o menos, 140 nM o menos, 130 nM o menos, 120 nM o menos. Valores de CI_{50} ejemplares particulares y condiciones de ensayo se describen en otras partes del presente documento o se muestran en los Ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo ejemplificado Net 14 aún muestra una CI_{50} de 113 nM y Net 83 aún muestra una CI_{50} de 208 nM después de la exposición a 30 U/ml de pepsina durante 30 minutos a 37 °C. Por lo tanto, en algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención tienen una CI_{50} de 220 nM o menos después de la exposición a 30 U/ml de pepsina durante 30 minutos a 37 °C. En dichas modalidades, un pH ejemplar es 1.8 o 2.5. En dichas modalidades, una concentración ejemplar de NetB es una concentración o dosis de CE_{80} , o una concentración de 20 nM. Otros valores de CI_{50} ejemplares se describen en otra parte del presente documento.

Los ensayos apropiados para evaluar la capacidad de unirse a NetB y/o neutralizar (o inhibir o reducir) la actividad tóxica de NetB son bien conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquiera de estos. En otras partes del presente documento se describen ensayos preferidos y ejemplares, por ejemplo, ensayos hemolíticos o ensayos ELISA o de unión a SPR.

Por lo tanto, los valores de CI_{50} preferidos como se describieron anteriormente son preferiblemente los determinados en un ensayo de toxicidad apropiado (ensayo de inhibición de NetB) realizado en condiciones apropiadas para permitir que los valores de CI_{50} se midan o determinen como se describe en otras partes del presente documento. Por lo tanto, los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando los anticuerpos, preferiblemente anticuerpos VHH (o proteínas de unión) de la invención se exponen a 30 U/ml o 107 U/ml de pepsina durante al menos 15, 30, 45, 60 o 90 minutos a 37 °C, antes de evaluarse en un ensayo de toxicidad (ensayo de inhibición de NetB) utilizando una concentración apropiada

(concentración tóxica) de NetB (por ejemplo, una concentración o dosis de CE_{80}), preferiblemente un ensayo hemolítico, más preferiblemente un ensayo hemolítico en el que se evalúa la lisis de glóbulos rojos de pollo, por ejemplo, utilizando una concentración de NetB de 20 nM. Los pH ejemplares son pH 1.8 o pH 2.5. Por lo tanto, los valores ejemplares proporcionados anteriormente pueden ser, por ejemplo, valores determinados cuando se utiliza NetB a una concentración CE_{80} (por ejemplo, una concentración de 20 nM) y/o cuando el ensayo se lleva a cabo a un pH de 1.8 o 2.5.

Los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención conservan al menos el 50 %, por ejemplo, al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de la capacidad para inhibir o neutralizar NetB, cuando se exponen a pepsina (o en presencia de pepsina), en comparación con el mismo anticuerpo (o proteína de unión) que no ha sido expuesto a pepsina (o en ausencia de pepsina). Nuevamente, dichos valores pueden ser valores determinados cuando los anticuerpos, preferiblemente anticuerpos VHH (o proteínas de unión) de la invención se exponen a 30 U/ml o 107 U/ml de pepsina durante al menos 15, 30, 45, 60 o 90 minutos a 37° C, antes de evaluarse en un ensayo de toxicidad (ensayo de inhibición de NetB) utilizando una concentración apropiada (concentración tóxica) de NetB, preferiblemente un ensayo hemolítico, más preferiblemente un ensayo hemolítico en el que se evalúa la lisis de glóbulos rojos de pollo, por ejemplo, utilizando una concentración de NetB de 20 nM. Los pH ejemplares son pH 1.8 o pH 2.5. Los valores de retención porcentual ejemplares particulares y las condiciones del ensayo también se muestran en los Ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo ejemplificado Net 14 conserva el 84 % de actividad después de 30 minutos de exposición a 30 U/ml de pepsina a pH 1,8, y el 45 % después de 45 o 60 minutos de exposición, mientras que Net 83 conserva el 72 % de actividad después de 30 minutos de exposición a 30 U/ml de pepsina, y el 35 % después de 45, 60 o 90 minutos de exposición. Por lo tanto, en algunas modalidades, se prefieren los anticuerpos (o proteínas de unión) con estos, o al menos estos, valores de retención porcentual, en estas condiciones.

En algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la

invención son resistentes a la pancreatina o resistentes a la digestión con pancreatina. El término “resistente a la pancreatina” o “resistente a la digestión con pancreatina” como se usa en el presente documento incluye que los anticuerpos (o proteínas de unión) no pierden, o mantienen, una capacidad significativa o medible para unirse a NetB y/o para inhibir (o reducir o neutralizar) la actividad tóxica de NetB como se describe en otra parte del presente documento, después de la exposición o contacto con pancreatina. Por ejemplo, los anticuerpos con esta propiedad son capaces de inhibir (o reducir o neutralizar) la capacidad de NetB para causar hemólisis de células, por ejemplo, células objetivo apropiadas como glóbulos rojos, después del contacto con (o exposición a) pancreatina. Dichos anticuerpos también son capaces de unirse a NetB, por ejemplo NetB como se produce por *C. perfringens*, después del contacto con (o exposición a) pancreatina. Visto de manera alternativa, dichos anticuerpos conservan la actividad para inhibir (o reducir o neutralizar) NetB después de entrar en contacto con (o exposición a) pancreatina. Estas capacidades de los anticuerpos después de la exposición a la pancreatina (o en presencia de pancreatina) se pueden comparar convenientemente con el nivel observado en ausencia de pancreatina o sin exposición a la pancreatina.

Se puede utilizar cualquier nivel o concentración de pancreatina adecuados. Los niveles preferidos y ejemplares reflejarían los que se encuentran en el intestino delgado o el tracto gastrointestinal. Un nivel ejemplar divulgado en el presente documento es una concentración de 0,5 mg/ml, ya que se correlaciona con una actividad de proteasa de >100 U/ml y es un valor utilizado comúnmente para simular el fluido intestinal/digestión intestinal. También se puede utilizar una concentración de 1 mg/ml o 0,1 mg/ml. Otras condiciones de exposición ejemplares serían una temperatura de 37 °C durante un período de tiempo adecuado, p. ej. durante o al menos 15, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos y, por ejemplo, hasta 2,5 horas, hasta 2 horas, hasta 1,5 horas o hasta una hora. Un pH ejemplar sería un pH de aproximadamente 6.8.

Por lo tanto, los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención son resistentes a la digestión con pancreatina a una concentración de

pancreatina de 0,5 mg/ml, p. ej. a una temperatura de 37° C. Los anticuerpos preferidos (o proteínas de unión) de la invención son resistentes a la digestión con pancreatina a una concentración de pancreatina de 0,5 mg/ml o 1 mg/ml, cuando se exponen a dicha pancreatina durante al menos 15, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos a 37° C. Por ejemplo, Net 83 muestra resistencia a la pancreatina cuando se expone a 0,5 mg/ml de pancreatina durante 15, 30, 45, 60 o 90 minutos, y todavía se muestra cierta resistencia incluso a los 120 minutos. Net 83 también muestra resistencia a la pancreatina cuando se expone a 1 mg/ml de pancreatina durante 30 minutos. Dicha resistencia se puede observar convenientemente a un pH de o de aproximadamente de 6.8.

Dichos anticuerpos conservan preferiblemente la capacidad de reducir la actividad tóxica (citotóxica) de NetB después de la exposición a pancreatina en estas condiciones u otras condiciones como las descritas en el presente documento. Como alternativa o adicionalmente, dichos anticuerpos conservan la capacidad de unirse a NetB después de la exposición a pancreatina en estas condiciones u otras condiciones como se describe en este documento.

Los ensayos adecuados para evaluar la capacidad de unirse a NetB y/o neutralizar (o inhibir o reducir) la actividad tóxica de NetB son bien conocidos en la técnica y cualquiera de ellos puede utilizarse. Los ensayos preferidos y ejemplares se describen en otras partes de este documento, por ejemplo, ensayos hemolíticos o ensayos de unión ELISA o SPR.

Aunque los ensayos de inhibición de NetB basados en hemólisis se pueden utilizar convenientemente para evaluar la actividad de los anticuerpos de la invención después de la exposición a proteasas, la resistencia a las proteasas también se puede evaluar convenientemente en un gel, por ejemplo, un gel SDS-PAGE, y llevar a cabo una evaluación de si la proteína del anticuerpo se ha digerido significativamente o completamente, o si la proteína del anticuerpo no digerida todavía está presente. Dicha evaluación se puede llevar a cabo convenientemente detectando bandas en un gel en los pesos moleculares apropiados.

En algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la

invención exhiben ventajosamente la propiedad adicional de mostrar estabilidad a pH bajos, por ejemplo, a un pH inferior a 3,0 o inferior a 2,0, por ejemplo, a un pH de 1.8 o 2.5.

Por lo tanto, los anticuerpos preferidos de la invención también son
5 estables, por ejemplo, no se degradan ni se destruyen, o conservan su actividad funcional, por ejemplo, una o más de las propiedades funcionales descritas en el presente documento, como la capacidad de unirse a NetB, o la capacidad de reducir la actividad tóxica (citotóxica) de NetB, u otras propiedades funcionales, después de haber sido expuestos a (o haber estado en contacto con o incubados
10 a) un pH ácido, por ejemplo, un pH inferior a 3.0 o inferior a 2.0, p. ej., un pH de 1.8 o 2.5.

Por lo tanto, dichos anticuerpos conservan la capacidad de reducir la actividad tóxica (citotóxica) de NetB después de la exposición a dichos pH bajos. Alternativamente, o adicionalmente, dichos anticuerpos conservan la capacidad de
15 unirse a NetB después de la exposición a dichos pH bajos.

En otra parte del presente documento se describen ensayos adecuados para evaluar la retención de estas actividades funcionales después de que los anticuerpos (o proteínas de unión) hayan sido expuestos a un pH bajo. Los tiempos de exposición, contacto o incubación ejemplares a los pH bajos como se
20 ha descrito anteriormente podrían ser una exposición, etc., durante 15, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos, o al menos 15, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos, o hasta 15, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos. Una temperatura ejemplar podría ser 37 °C.

En algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención exhiben ventajosamente la propiedad adicional de mostrar estabilidad
25 en agua, en particular agua del grifo. Tal propiedad es particularmente ventajosa en algunos campos de la salud animal, por ejemplo, cuando se desea tratar un número relativamente grande de animales, ya que abre la posibilidad de administrar o suministrar el agente activo en el agua potable o como un componente del alimento proporcionado a los animales. Por lo tanto, dicha
30 propiedad es altamente deseable para el uso de los anticuerpos de la invención para tratar animales aviares para enfermedades asociadas con NetB, tales como

NE.

En algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención tienen una estabilidad en agua, en particular agua del grifo, de al menos 4 o 7 días, por ejemplo al menos o hasta 14, 21 o 28 días, o al menos o hasta 2 meses o 3 meses. Estos puntos de tiempo pueden referirse a una estabilidad a temperatura ambiente.

Preferiblemente, las capacidades y propiedades descritas anteriormente se observan a un nivel medible o significativo y más preferiblemente a un nivel estadísticamente significativo, cuando se comparan con niveles de control apropiados. Los niveles de significancia apropiados se discuten en otra parte del presente documento. Más preferiblemente, una o más de las capacidades y propiedades descritas anteriormente se observan a un nivel que es mediblemente mejor, o más preferiblemente significativamente mejor (preferiblemente estadísticamente significativamente mejor), cuando se compara con las capacidades observadas para los anticuerpos de la técnica anterior.

En cualquier análisis estadístico al que se hace referencia en el presente documento, preferiblemente la diferencia estadísticamente significativa con respecto a un control relevante u otra entidad o medición comparativa tiene un valor de probabilidad de $\leq 0,1$ o $< 0,1$, preferiblemente $\leq 0,05$ o $< 0,05$. Los métodos adecuados para determinar la significación estadística son bien conocidos y están documentados en la técnica y se puede utilizar cualquiera de ellos.

En algunas modalidades, las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención tienen una o más, preferiblemente dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, más preferiblemente todas, las propiedades funcionales, en particular las propiedades funcionales preferidas, descritas en este documento. Ejemplos de propiedades funcionales preferidas y detalles adicionales con respecto a dichas propiedades se describen en otras partes del presente documento, e incluyen i) una alta afinidad por NetB, p. ej. cuando se mide mediante Biacore (la capacidad de unirse a NetB se observa a pH 6.0, así como a pH 7.4), ii) la capacidad de reducir la actividad tóxica de NetB (esta capacidad se

observa a pH 6.0, así como a pH 7.4, y preferiblemente a una temperatura de 42 °C y 37 °C), resistencia a varias proteasas, por ejemplo, iii) resistencia a la digestión con pepsina (p. ej., a una concentración de pepsina de 30 U/ml y una temperatura de 37 °C), iv) resistencia a la digestión con quimotripsina (p. ej., a una
 5 concentración de quimotripsina de 1 µg/ml y una temperatura de 37 °C), y opcionalmente v) resistencia a la digestión con pancreatina (p. ej., a una concentración de pancreatina de 0,5 mg/ml y una temperatura de 37 °C). Los anticuerpos preferidos (o proteínas de unión) también muestran estabilidad en agua.

10 Tal como se utilizan en toda la solicitud, los términos "un" y "una" se utilizan en el sentido de que significan "al menos uno", "al menos un primero", "uno o más" o "una pluralidad" de los componentes o etapas a los que se hace referencia, excepto en los casos en los que se indique específicamente un límite superior a continuación. Por lo tanto, un "anticuerpo", tal como se utiliza en el
 15 presente documento, significa "al menos un primer anticuerpo".

Además, cuando se utilizan en el presente documento los términos "comprende", "comprende", "tiene" o "que tiene", u otros términos equivalentes, entonces en algunas modalidades más específicas, por ejemplo en la definición de las secuencias de CDR o FR en el presente documento, estos términos incluyen el
 20 término "consiste en" o "consiste esencialmente en", u otros términos equivalentes.

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una o más moléculas de ácido nucleico) que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención tal como se definen
 25 en el presente documento o partes o fragmentos de los mismos, o moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas a los mismos, forman otros aspectos de la invención.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas son aquellas que codifican un anticuerpo VHH o una región o dominio VH de la presente invención
 30 (por ejemplo, aquellas que codifican SEQ ID NO: 1 ó 9). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas son aquellas que codifican los conjuntos de tres secuencias

CDR como se define en cualquiera de las Tablas A o B. Dichas moléculas de ácido nucleico preferidas también codifican regiones marco apropiadas, por ejemplo. Regiones FR1, FR2, FR3 y FR4, preferiblemente los conjuntos de secuencias FR como se definen en cualquiera de las Tablas A o B.

5 El término "sustancialmente homólogo" como se usa en este documento en relación con una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos incluye secuencias que tienen al menos un 60%, 65%, 70% o 75%, preferiblemente al menos un 80%, e incluso más preferiblemente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o
10 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos divulgada.

Las secuencias sustancialmente homólogas de la invención incluyen, por lo tanto, alteraciones de una o varias bases o aminoácidos (adiciones, sustituciones, inserciones o deleciones) a las secuencias de la invención. A nivel
15 de aminoácidos, las secuencias sustancialmente homólogas preferidas contienen hasta 5, p. ej., solo 1, 2, 3, 4 ó 5, preferiblemente 1, 2, 3 ó 4, preferiblemente 1, 2 ó 3, más preferiblemente 1 ó 2, aminoácidos alterados, en una o más de las regiones marco y/o una o más de las CDRs que forman las secuencias de la invención. Además, a nivel de aminoácidos, las secuencias sustancialmente
20 homólogas preferidas contienen hasta 5, p. ej., solo 1, 2, 3, 4 ó 5, preferiblemente 1, 2, 3 ó 4, preferiblemente 1, 2 ó 3, más preferiblemente 1 ó 2, aminoácidos alterados, en las regiones marco combinadas (p. ej., las cuatro regiones marco) y/o las CDRs combinadas (p. ej., las tres regiones CDR) que forman las secuencias de la invención. Además, a nivel de aminoácidos, las secuencias
25 sustancialmente homólogas preferidas contienen hasta 5, por ejemplo, solo 1, 2, 3, 4 ó 5, preferiblemente 1, 2, 3 ó 4, preferiblemente 1, 2 ó 3, más preferiblemente 1 ó 2, aminoácidos alterados, en uno o más de los dominios VHH de la invención. Dichas alteraciones pueden ser con aminoácidos conservativos o no conservativos, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, dichas alteraciones
30 son sustituciones, preferiblemente sustituciones conservativas de aminoácidos.

En ciertas modalidades, si una secuencia de inicio dada es

relativamente corta (p. ej., cinco aminoácidos de longitud), entonces pueden estar presentes menos sustituciones de aminoácidos en secuencias sustancialmente homólogas a la misma en comparación con el número de sustituciones de aminoácidos que podrían realizarse opcionalmente en una secuencia sustancialmente homóloga a una secuencia de inicio más larga. Por ejemplo, en ciertas modalidades, una secuencia sustancialmente homóloga a una secuencia de CDR1 de VH de inicio de acuerdo con la presente invención, p. ej., una secuencia de CDR1 de VH de inicio que en algunas modalidades puede tener una longitud de cinco residuos de aminoácidos, tiene preferiblemente 1 ó 2 (más preferiblemente 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia de inicio. En consecuencia, en algunas modalidades, el número de aminoácidos alterados en secuencias sustancialmente homólogas (p. ej., en secuencias de CDR sustancialmente homólogas) se puede adaptar a la longitud de una secuencia de CDR de inicio dada. Por ejemplo, pueden estar presentes diferentes cantidades de aminoácidos alterados dependiendo de la longitud de una secuencia CDR inicial dada, de modo de lograr un % particular de identidad de secuencia en las CDRs, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

Se pueden utilizar métodos rutinarios en la técnica, como la mutagénesis por escaneo de alanina y/o el escaneo mutacional profundo (que tiene como objetivo realizar todas las posibles monosustituciones en todos los residuos seleccionados dentro de una secuencia de proteína dada) y/o el análisis de la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para determinar qué residuos de aminoácidos de las CDRs no contribuyen o no contribuyen significativamente a la unión al antígeno y, por lo tanto, son buenos candidatos para la alteración o sustitución en las modalidades de la invención que involucran secuencias sustancialmente homólogas.

Una vez identificados, la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo parental para formar un nuevo anticuerpo, en donde dicho anticuerpo parental es

uno de los anticuerpos de la invención como se define en otra parte del presente documento, y la prueba del nuevo anticuerpo resultante para identificar anticuerpos que se unen a NetB de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo utilizando técnicas que son rutinarias en la técnica. Dichos métodos se pueden utilizar para formar múltiples anticuerpos nuevos que se pueden probar todos para determinar su capacidad para unirse a NetB. Preferentemente, dicha adición, deleción, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos tiene lugar en uno o más de los dominios CDR.

Por ejemplo, dichas manipulaciones podrían llevarse a cabo convenientemente mediante ingeniería genética a nivel de ácido nucleico, en donde las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de unión apropiadas y dominios de las mismas se modifican de modo que la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada resultante se modifica a su vez de la manera apropiada. La prueba de la capacidad de uno o más de los anticuerpos/proteínas de unión modificados para unirse a NetB se puede llevar a cabo mediante cualquier método apropiado, que es bien conocido y se describe en la técnica. También se describen métodos adecuados en otras partes del presente documento y en la sección de Ejemplos.

Los nuevos anticuerpos producidos, obtenidos u obtenibles mediante estos métodos forman un aspecto adicional de la invención.

El término "sustancialmente homólogo" también incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la presente invención que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas o moléculas de ácido nucleico de la invención de sustancialmente la misma manera. Por ejemplo, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debe conservar la capacidad de unirse a NetB como se describió anteriormente. Preferiblemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debe conservar una o más (o todas) las capacidades funcionales del anticuerpo inicial.

Las secuencias sustancialmente homólogas de proteínas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones conservadoras de aminoácidos, o

por ejemplo alteraciones que no afectan los dominios VH, VL o CDR de los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos donde se añaden secuencias de etiqueta, toxinas u otros componentes que no contribuyen a la unión del antígeno, o alteraciones para convertir un tipo o formato de proteína de unión, molécula de anticuerpo o fragmento a otro tipo o formato de proteína de unión, molécula de anticuerpo o fragmento (por ejemplo, conversión de VHH a Fab o scFv o anticuerpo completo, por ejemplo, un anticuerpo de cadena pesada de longitud completa solamente, o viceversa), o la conversión de una molécula de anticuerpo a una clase o subclase particular de molécula de anticuerpo (por ejemplo, la conversión de una molécula de anticuerpo a IgG o una subclase de la misma, por ejemplo, IgG₂ o IgG₃, por ejemplo a un anticuerpo de camélido, o a una clase de anticuerpo IgA o IgY), o la preparación de una fusión Fc, por ejemplo, una fusión VHH-Fc.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora", como se utiliza en el presente documento, es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluidas cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., glicina, cisteína, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En otros ejemplos, las familias de residuos de aminoácidos se pueden agrupar en función de grupos laterales hidrófobos o grupos laterales hidrófilos.

La homología o identidad de secuencia se puede evaluar mediante cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de homología o identidad entre secuencias, son útiles los programas informáticos que realizan alineaciones múltiples de secuencias, por ejemplo Clustal W (Thompson, Higgins, Gibson, Nucleic Acids Res., 22:4673-4680, 1994). Si se desea, se puede

utilizar el algoritmo Clustal W junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915–10919, 1992) y una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,1, de modo que se obtenga la coincidencia de orden más alto entre

5 dos secuencias en las que al menos el 50% de la longitud total de una de las secuencias está involucrada en la alineación. Otros métodos que pueden utilizarse para alinear secuencias son el método de alineamiento de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970) revisado por Smith y Waterman (Smith y Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981) de modo que se

10 obtenga la coincidencia de orden más alto entre las dos secuencias y se determine el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos son generalmente reconocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos por Carillo y Lipton (Carillo y Lipton, SIAM J. Applied Math., 48:1073,

15 1988) y los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, Nueva York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects.

Generalmente, se emplearán programas informáticos para dichos cálculos. Los programas que comparan y alinean pares de secuencias, como

20 ALIGN (Myers y Miller, CABIOS, 4:11-17, 1988), FASTA (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988; Pearson, Methods in Enzymology, 183:63-98, 1990) y BLAST con espacios (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997), BLASTP, BLASTN o GCG (Devereux, Haeberli, Smithies, Nucleic Acids Res., 12:387, 1984) también son útiles para este propósito. Además,

25 el servidor Dali del Instituto Europeo de Bioinformática ofrece alineaciones de secuencias de proteínas basadas en la estructura (Holm, Trends in Biochemical Sciences, 20:478-480, 1995; Holm, J. Mol. Biol., 233:123-38, 1993; Holm, Nucleic Acid Res., 26:316-9, 1998).

A modo de proporcionar un punto de referencia, las secuencias

30 según la presente invención que tienen al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o

99% de homología, identidad de secuencia, etc., pueden determinarse utilizando el programa ALIGN con parámetros predeterminados (por ejemplo, disponible en Internet en el servidor de red GENESTREAM, IGH, Montpellier, Francia).

Preferiblemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo
5 debe conservar la capacidad de unirse específicamente al mismo epítopo de NetB reconocido por el anticuerpo de partida en cuestión, por ejemplo, el mismo epítopo reconocido por los dominios CDR de uno o más de los anticuerpos de la invención o los dominios VH (VHH) de la invención como se describe en este documento, por ejemplo, unirse al mismo epítopo que uno o más de los diversos anticuerpos
10 de la invención (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos VHH Net 83 o Net 14, como se muestra en las Tablas A y B, respectivamente). Por lo tanto, preferiblemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debe conservar la capacidad de competir, en un ensayo adecuado, con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos VHH Net
15 83 o Net 14, como se muestra en las Tablas A y B, respectivamente) para unirse a NetB.

La unión al mismo epítopo se puede probar fácilmente mediante métodos bien conocidos y descritos en la técnica, por ejemplo utilizando ensayos de unión, por ejemplo, un ensayo de competición, o mediante el análisis de la
20 estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, los anticuerpos que se unen al mismo epítopo que uno o más de los diversos anticuerpos de la invención, por ejemplo, según se evalúa o determina mediante un ensayo de competición, análisis de la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo, o mediante estudios mutacionales de residuos individuales (por ejemplo, utilizando
25 un barrido de alanina y/o un barrido mutacional profundo), forman otros aspectos de la invención. La retención de otras propiedades funcionales también se puede probar fácilmente mediante métodos bien conocidos y descritos en la técnica o en el presente documento.

Por lo tanto, una persona experta en la técnica apreciará que se
30 pueden utilizar ensayos de unión para probar si algún anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos "sustancialmente homólogos", tiene las mismas especificidades de

unión, por ejemplo, se une al mismo epítopo, o con la misma afinidad o una afinidad equivalente, que los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, por ejemplo, ensayos de unión tales como ensayos de competición o ensayos ELISA como se describe en otra parte del presente documento. Los
5 ensayos SPR, como los ensayos BIAcore descritos en otra parte de este documento, también se podrían utilizar fácilmente para establecer si los anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos "sustancialmente homólogos", pueden unirse a NetB y, opcionalmente, la afinidad, por ejemplo, KD, de dicha unión. El experto en la materia conocerá otros métodos y variaciones adecuados.

10 Como se describe a continuación, se puede utilizar un ensayo de unión competitiva para probar si los anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos "sustancialmente homólogos" conservan la capacidad de unirse específicamente al mismo o sustancialmente al mismo epítopo de NetB reconocido por uno o más de los anticuerpos de la invención como se muestra en las diversas Tablas de
15 secuencias de este documento, o tienen la capacidad de competir con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención como se muestra en las diversas Tablas de secuencias de este documento. El método descrito a continuación es solo un ejemplo de un ensayo de competencia adecuado. El experto en la materia conocerá otros métodos y variaciones adecuados.

20 Un ensayo de competencia ejemplar implica evaluar la unión de varias concentraciones efectivas de un anticuerpo de la invención a NetB en presencia de concentraciones variables de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, un anticuerpo sustancialmente homólogo). A continuación, se puede evaluar la cantidad de inhibición de la unión inducida por el anticuerpo de prueba. Un
25 anticuerpo de prueba que muestra una mayor competencia con un anticuerpo de la invención a concentraciones crecientes (es decir, concentraciones crecientes del anticuerpo de prueba dan como resultado una reducción correspondiente en la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a NetB) es evidencia de unión al mismo o sustancialmente al mismo epítopo. Preferiblemente, el anticuerpo de
30 prueba reduce significativamente la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a NetB. Preferiblemente, el anticuerpo de prueba reduce la cantidad de

anticuerpo de la invención que se une a NetB en al menos aproximadamente el 95%. Se pueden utilizar ensayos ELISA o de citometría de flujo para evaluar la inhibición de la unión en un ensayo de competencia de este tipo, pero una persona experta en la materia conocería bien otras técnicas adecuadas.

5 Tales anticuerpos (anticuerpos monoclonales) que tienen la capacidad de unirse específicamente a sustancialmente el mismo (o el mismo) epítipo de NetB o a un epítipo superpuesto de NetB reconocido por los anticuerpos de la invención (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos VHH Net 83 o Net 14, como se muestra en las Tablas A y B, respectivamente) o que tienen
10 la capacidad de competir con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos VHH Net 83 o Net 14, como se muestra en las Tablas A y B, respectivamente) son otras modalidades de la presente invención.

 El término "anticuerpos competitivos", como se usa en el presente
15 documento, se refiere a anticuerpos que se unen a aproximadamente, sustancialmente o esencialmente el mismo, o incluso el mismo, epítipo que un "anticuerpo de referencia". Los "anticuerpos competitivos" incluyen anticuerpos con especificidades de epítipo superpuestas. Los anticuerpos competitivos pueden, por tanto, competir eficazmente con un anticuerpo de referencia por la
20 unión a NetB. Preferiblemente, el anticuerpo competitivo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. Alternativamente, el anticuerpo competidor tiene preferiblemente la misma especificidad de epítipo que el anticuerpo de referencia.

 "Anticuerpos de referencia" como se usa en este documento son
25 anticuerpos que pueden unirse a NetB de acuerdo con la invención que preferiblemente tienen un dominio VH como se define en este documento, más preferiblemente tienen un dominio VH o son un anticuerpo VHH que comprende SEQ ID NO: 1 ó 9 (o las tres secuencias CDR relevantes de dichas secuencias) como se describe en las Tablas A o B.

30 La identificación de uno o más anticuerpos competidores o anticuerpos que se unen al mismo epítipo es una cuestión técnica sencilla ahora

que se han proporcionado anticuerpos de referencia tales como los descritos en las Tablas de secuencias de este documento. Como la identificación de anticuerpos competidores o anticuerpos que se unen al mismo epítopo se puede determinar en comparación con un anticuerpo de referencia, se entenderá que

5 determinar realmente el epítopo al que se unen uno o ambos anticuerpos no es de ninguna manera necesario para identificar un anticuerpo competidor o un anticuerpo que se une al mismo epítopo. Sin embargo, el mapeo de epítopos se puede realizar utilizando técnicas estándar, si se desea, algunas de las cuales se describen en otra parte de este documento.

10 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina", como se utilizan en el presente documento, se refieren en sentido amplio a cualquier agente de unión inmunológica que comprende un dominio de unión a antígeno, incluidos los anticuerpos policlonales y monoclonales. Sin embargo, se prefieren los anticuerpos monoclonales. En otras palabras, en algunas modalidades, los

15 anticuerpos de la invención no son anticuerpos policlonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos completos se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y los anticuerpos de la invención pueden estar en cualquiera de estas clases, o pueden ser anticuerpos IgY de pollo. En algunas modalidades, no se utilizan anticuerpos

20 IgY. Varios de estos se dividen además en subclases o isotipos, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares, por ejemplo, los anticuerpos de camélidos son anticuerpos IgG que a menudo tienen dominios constantes IgG2 o IgG3. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de

25 subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Generalmente, cuando se utilizan anticuerpos completos en lugar de regiones de unión a antígenos en la invención, se prefieren las IgG porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque se producen más

30 fácilmente en un entorno de laboratorio.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos de mamíferos se asignan a

uno de dos tipos claramente distintos: kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes y algunos aminoácidos en las regiones marco de sus dominios variables.

El término "región determinante de complementariedad de cadena pesada" ("CDR de cadena pesada") como se utiliza en el presente documento se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena pesada (dominio VH) de una molécula de anticuerpo o dentro de una molécula de anticuerpo VHH. La región variable de la cadena pesada tiene tres CDRs denominadas CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada y CDR3 de cadena pesada desde el extremo amino hasta el extremo carboxi. La región variable de la cadena pesada también tiene cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4 desde el extremo amino hasta el extremo carboxi). Estas regiones marco separan las CDRs.

El término "región variable de la cadena pesada" (dominio VH) como se utiliza en el presente documento se refiere a la región variable de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo.

El término "región determinante de complementariedad de la cadena ligera" ("CDR de la cadena ligera") como se utiliza en el presente documento se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de la cadena ligera (dominio VL) de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de la cadena ligera tienen tres CDRs denominadas CDR1 de la cadena ligera, CDR2 de la cadena ligera y CDR3 de la cadena ligera desde el extremo amino hasta el extremo carboxi. La región variable de la cadena ligera también tiene cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4 desde el extremo amino hasta el extremo carboxi). Estas regiones de estructura separan las CDRs.

El término "región variable de cadena ligera" (dominio VL) como se utiliza en el presente documento se refiere a la región variable de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

Como comprenderán los expertos en la materia, los agentes de unión inmunológica abarcados por el término "anticuerpo" incluyen o se extienden a todos los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluidos

anticuerpos completos, anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; anticuerpos recombinantes y diseñados, y fragmentos de los mismos.

El término "anticuerpo" se utiliza para referirse a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión a antígeno como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (DAB), dímero TandAbs, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, bicuerpo, tricuerpo (fusiones scFv-Fab, biespecíficas o triespecíficas, respectivamente); sc-diacuerpo; cuerpos kappa(lamda) (fusiones scFv-CL); BiTE (Bispecific T-cell Engager, tándems scFv-scFv para atraer células T); DVD-Ig (anticuerpo de dominio variable dual, formato biespecífico); SIP (inmunoproteína pequeña, una especie de minicuerpo); SMIP (dímero scFv-Fc de inmunofármaco modular pequeño); DART (diacuerpo estabilizado con ds "Dual Affinity ReTargeting"); miméticos de anticuerpos pequeños que comprenden una o más CDRs y similares.

Las técnicas para preparar y utilizar diversos constructos y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en la técnica.

Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ se pueden generar tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también se pueden sintetizar mediante técnicas recombinantes o se pueden sintetizar químicamente. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpos son bien conocidas y se describen en la técnica.

En todas las modalidades de la invención, se prefieren los anticuerpos de dominio único (también denominados anticuerpos VHH, sdAbs,

DABs, dAbs, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos, anticuerpos vNAR (tiburón), anticuerpos VH o anticuerpos VL), en particular anticuerpos VHH, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos y anticuerpos vNAR (tiburón). Dichos anticuerpos comprenden un dominio de anticuerpo variable monomérico único, normalmente un dominio VH, que puede unirse al antígeno (aunque se han descrito y se pueden utilizar dominios VL únicos que tienen la capacidad de unirse al antígeno). Por lo tanto, en algunas de dichas modalidades preferidas, los anticuerpos (o dominios de unión al antígeno) de la invención comprenden (o consisten en) una (o una única, o solo una única) región variable de cadena pesada (VH o VHH), aunque en algunas modalidades varias de estas regiones variables de cadena pesada individuales con secuencias iguales o diferentes pueden estar presentes juntas en el mismo constructo o molécula. Por lo tanto, en algunas de estas modalidades, los anticuerpos (o dominios de unión a antígeno) de la invención tienen solo tres CDRs (normalmente junto con cuatro regiones FR en el orden estándar o habitual). A veces, estos anticuerpos pueden denominarse anticuerpos de solo cadena pesada.

Estos anticuerpos pueden obtenerse o prepararse utilizando técnicas estándar que son bien conocidas y se describen en la técnica. Por ejemplo, estos anticuerpos pueden obtenerse inmunizando animales apropiados, por ejemplo, camélidos como llamas o tiburones, con el antígeno deseado y luego clonando los dominios VH de los anticuerpos generados en vectores de expresión apropiados y seleccionando los aglutinantes. También están disponibles bibliotecas de dominios VH (por ejemplo, bibliotecas de presentación de fagos de dominios VH humanos) o pueden generarse y luego analizarse.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende la totalidad o una parte de una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM, IgD o IgY. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG, IgA o IgY o una parte de la misma. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la totalidad o una parte de una región constante de cadena ligera kappa o una

región constante de cadena ligera lambda, o una parte de las mismas. La totalidad o parte de dichas regiones constantes se pueden producir de forma natural o pueden ser total o parcialmente sintéticas. Las secuencias apropiadas para dichas regiones constantes son bien conocidas y están documentadas en la técnica.

- 5 Cuando se incluye un complemento completo de regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras en los anticuerpos de la invención, dichos anticuerpos se denominan típicamente en el presente documento anticuerpos de "longitud completa" o anticuerpos "completos".

- 10 En otras modalidades, se prefiere que no haya regiones constantes, por ejemplo, regiones constantes de cadena pesada o de cadena ligera, por ejemplo, un dominio variable o un dominio variable de cadena pesada (VH) es la única parte de un anticuerpo que está presente.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden producir de forma natural o se pueden producir total o parcialmente de forma sintética.

- 15 Muchos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende tres dominios CDR y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende tres dominios CDR. Dichos VL y VH generalmente forman el sitio de unión al antígeno.

- 20 Sin embargo, está bien documentado en la técnica que la presencia de tres CDRs del dominio variable de la cadena ligera y tres CDRs del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo no siempre es necesaria para la unión al antígeno. Por lo tanto, se sabe que los constructos más pequeños que el fragmento de anticuerpo clásico anterior son eficaces.

- 25 Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos tienen un amplio repertorio de unión al antígeno pero carecen de cadenas ligeras. Además, los resultados con anticuerpos de dominio único que comprenden solo dominios VH o solo dominios VL muestran que estos dominios pueden unirse al antígeno con afinidades aceptablemente altas y tienen otras ventajas, como su pequeño tamaño y facilidad de producción. Por lo tanto, tres CDRs pueden unirse eficazmente al antígeno y dichos anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos VHH,
- 30

sdAbs, DABs, dAbs, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos, anticuerpos vNAR (tiburón), anticuerpos VH o anticuerpos VL, en particular anticuerpos VHH, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos y anticuerpos vNAR (tiburón)) se ejemplifican en el presente documento y se prefiere este tipo de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo VHH).

El anticuerpo, la proteína de unión y las moléculas de ácido nucleico de la invención son generalmente moléculas "aisladas" o "purificadas" en la medida en que se distinguen de cualquiera de dichos componentes que pueden estar presentes *in situ* dentro de un cuerpo humano o animal (por ejemplo, un camélido) o una muestra de tejido derivada de un cuerpo humano o animal (por ejemplo, un camélido). Sin embargo, las secuencias pueden corresponder a o ser sustancialmente homólogas a secuencias que se encuentran en un cuerpo humano o animal (por ejemplo, un camélido). Por lo tanto, el término "aislado" o "purificado" como se utiliza en el presente documento en referencia a moléculas o secuencias de ácidos nucleicos y proteínas o polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, se refiere a dichas moléculas cuando están aisladas, purificadas o sustancialmente libres de su entorno natural, por ejemplo, aisladas o purificadas del cuerpo humano o animal (si es que se producen de forma natural), o se refiere a dichas moléculas cuando se producen mediante un proceso técnico, es decir, incluye moléculas recombinantes y producidas sintéticamente.

Se puede observar que en las modalidades, los anticuerpos, etc., de la invención no se producen en la naturaleza y son, en ese sentido, constructos artificiales en el sentido de que no corresponden a moléculas que se producen de forma natural. Por ejemplo, los anticuerpos preferidos son anticuerpos de dominio único que pueden diseñarse o producirse de forma recombinante, e incluso en especies que producen dichos anticuerpos de forma natural, por ejemplo, camélidos, dichas especies han sido inducidas experimentalmente a hacerlo, por ejemplo, mediante inmunización. En otras palabras, en las modalidades, los anticuerpos, etc., de la invención no son nativos.

El término "fragmento" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a fragmentos de relevancia biológica, por ejemplo, fragmentos que

contribuyen a la unión del antígeno, por ejemplo, forman parte o la totalidad del sitio de unión del antígeno, y/o contribuyen a las propiedades funcionales del anticuerpo NetB. Ciertos fragmentos preferidos comprenden o consisten en una región variable de cadena pesada (dominio VH/dominio VHH o las tres CDRs de VH) de los anticuerpos de la invención.

Un experto en la materia apreciará que las proteínas y polipéptidos de la invención, tales como las CDRs de cadena pesada y ligera, las regiones variables de cadena pesada y ligera, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos, se pueden preparar de cualquiera de las diversas formas bien conocidas y descritas en la técnica, pero se preparan más preferiblemente utilizando métodos recombinantes.

Los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos de la invención, según corresponda, se pueden derivar o producir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante clonación o síntesis.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos de la invención, estos fragmentos pueden ser manipulados adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los fragmentos de región variable en moléculas de anticuerpo de longitud completa con dominios de región constante apropiados, o en formatos particulares de fragmento de anticuerpo discutidos en otra parte de este documento, por ejemplo, anticuerpos de dominio único tales como VHH, fragmentos Fab, fragmentos scFv, etc. Típicamente, o como parte de este procedimiento de manipulación adicional, los fragmentos de ácido nucleico que codifican las moléculas de anticuerpo de la invención generalmente se incorporan en uno o más vectores de expresión apropiados para facilitar la producción de los anticuerpos de la invención o por ejemplo para facilitar la selección o cribado, por ejemplo, incorporándolos en vectores de presentación de fagos.

Los posibles vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados (por ejemplo, retrovirus defectuosos en la

replicación, adenovirus y virus adenoasociados), siempre que el vector sea compatible con la célula huésped utilizada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula huésped", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas en función de las células huésped que se van a utilizar para la expresión, que están operativamente unidas a la molécula de ácido nucleico. Operativamente unidas pretende significar que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

Por lo tanto, la invención contempla un vector de expresión, por ejemplo, un vector de expresión recombinante, que contiene o comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

Los vectores de expresión se pueden introducir en células huésped para producir una célula huésped transformada. Los términos "transformado con", "transfectado con", "transformación" y "transfección" pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante una de las muchas técnicas posibles conocidas en la técnica. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar y transfectar células huésped en Sambrook et al., 1989 (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros libros de texto de laboratorio.

Las células huésped adecuadas incluyen una amplia variedad de células huésped eucariotas y células procariotas, o se pueden utilizar sistemas de expresión basados en células vegetales o fúngicas (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), como sabrá bien un experto en la materia. Por ejemplo, las proteínas de la invención se pueden expresar en células de levadura, como *Pichia* o *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, o células de mamífero. Además, las proteínas de la invención se pueden expresar en células procariotas,

como *Escherichia coli* (*E. coli*). En algunas modalidades, se prefiere la expresión en *Pichia* o *E. coli*.

Las proteínas de la invención también pueden prepararse mediante síntesis química utilizando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tales como la síntesis en fase sólida.

Un aspecto adicional proporciona un constructo de expresión o vector de expresión o sistema de expresión (por ejemplo, un constructo, vector o sistema de expresión viral o bacteriano u otro), por ejemplo, uno o más constructos de expresión o vectores de expresión, que comprenden uno o más de los fragmentos o segmentos o moléculas de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente, los constructos de expresión o vectores o sistemas son recombinantes. Preferiblemente, dichos constructos o vectores o sistemas comprenden además las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención. Los constructos preferidos, etc., son aquellos que permiten la expresión prolongada o sostenida de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención dentro de la especie huésped objetivo, por ejemplo, dentro de especies aviares. Dicha expresión puede ser transitoria, por ejemplo, episomal, o más permanente, por ejemplo, a través de integración genómica, siempre que se logren niveles y duración de expresión suficientes para que se observe un efecto terapéutico o biológico.

Un aspecto adicional proporciona una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de mamífero o bacteriana o de levadura) o un virus, por ejemplo, una o más células huésped o virus, que comprenden uno o más constructos de expresión o vectores de expresión de la invención. También se proporcionan células huésped (por ejemplo, una célula huésped de mamífero, bacteriana o de levadura) o virus, por ejemplo, una o más células huésped o virus, que comprenden una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de mamífero, una célula huésped de bacteriana o una célula huésped de levadura) o un virus que expresa un anticuerpo (o proteína de unión) de la invención forma otro aspecto adicional.

Dichos constructos de expresión, vectores o sistemas, o células huésped o virus, u otros productos o fragmentos de ácido nucleico que codifican los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención se pueden administrar como agentes terapéuticos a un sujeto para permitir la producción de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención *in situ* dentro del sujeto y, de ese modo, ejercer sus efectos terapéuticos. Dichas células huésped también se pueden denominar vectores de administración vivos.

Por lo tanto, como se describe en otra parte del presente documento, las células huésped preferidas son células o cepas bacterianas, por ejemplo, células o cepas bacterianas probióticas, que pueden producirse de forma natural o sobrevivir en el tracto gastrointestinal o el intestino delgado, y son adecuadas para la administración a un animal, por ejemplo, para la administración terapéutica. Se conocen en la técnica ejemplos de bacterias apropiadas e incluyen *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, como *Lactobacillus reuteri*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria*, en particular cepas probióticas como *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, como *Lactobacillus reuteri*. También se pueden utilizar células de levadura, como *Pichia* (*Pichia pastoris*) o *Saccharomyces* (*S cerevisiae*). Dichas células huésped se modifican utilizando métodos apropiados para expresar los anticuerpos de la invención.

Otro aspecto adicional de la invención proporciona un método para producir (o fabricar) un anticuerpo (o proteína de unión) de la presente invención que comprende una etapa de cultivo de las células huésped de la invención. Los métodos preferidos comprenden las etapas de (i) cultivar una célula huésped que comprende uno o más de los vectores de expresión o una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o proteína de unión codificados; y opcionalmente (ii) aislar u obtener el anticuerpo o proteína de unión de la célula huésped o del medio de crecimiento/sobrenadante. Dichos métodos de producción (o fabricación) también pueden comprender una etapa de purificación del anticuerpo o producto proteico y/o formular el anticuerpo o producto en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que incluye al menos un componente adicional,

como un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En modalidades en las que el anticuerpo o proteína de la invención está formado por más de una cadena polipeptídica (por ejemplo, ciertos fragmentos como fragmentos Fab o anticuerpos completos), entonces todos los polipéptidos se expresan preferiblemente en la célula huésped, ya sea a partir del mismo vector de expresión o de uno diferente, de modo que las proteínas completas, por ejemplo, proteínas de anticuerpo de la invención, se puedan ensamblar en la célula huésped y aislarse o purificarse a partir de la misma.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para unir NetB, que comprende poner en contacto una composición que comprende NetB con un anticuerpo o proteína de unión de la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para detectar NetB, que comprende poner en contacto una composición sospechosa de contener NetB con un anticuerpo de la invención, en condiciones eficaces para permitir la formación de complejos NetB/anticuerpo y detectar los complejos así formados.

Las composiciones que comprenden al menos un primer anticuerpo (o proteína de unión) de la invención, o al menos una primera molécula de ácido nucleico o vector de expresión de la invención, o al menos una primera célula huésped de la invención, constituyen aspectos adicionales de la presente invención. Las formulaciones (composiciones) que comprenden uno o más anticuerpos, etc., de la invención, opcionalmente en una mezcla con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado constituyen una modalidad preferida de la presente invención. Dichas formulaciones pueden ser para uso farmacéutico, por ejemplo, para uso en aplicaciones de salud animal o uso veterinario, por ejemplo, en agricultura, y por lo tanto, las composiciones de la invención son preferiblemente farmacéuticamente aceptables o aceptables para administración a animales humanos o no humanos, en particular especies aviares o pájaros, por ejemplo, aves de corral. Los diluyentes, excipientes y vehículos adecuados son conocidos por el experto en la materia. En algunas modalidades, dichas composiciones pueden incluir bicarbonato de sodio (o hidrogenocarbonato de

sodio, NaHCO_3), por ejemplo a una concentración de o aproximadamente de 0.5 g/l.

Las composiciones de conformidad con la invención pueden presentarse, por ejemplo, en una forma adecuada para administración oral, nasal, parenteral, intravenosa, tópica o rectal, o para administración por vía mucosa, y puede utilizarse cualquiera de estos modos de administración, o incluso cualquier otro modo de administración adecuado. Un modo de administración preferido es la administración oral y, por lo tanto, también se prefieren las formas adecuadas para dicha administración oral.

Los compuestos activos (por ejemplo, los anticuerpos de la invención) tal como se definen en el presente documento pueden presentarse en las formas farmacológicas convencionales de administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, esprays nasales, soluciones, emulsiones, liposomas, polvos, cápsulas o formas de liberación sostenida. Para la preparación de estas formas pueden emplearse excipientes farmacéuticos convencionales, así como los métodos de producción habituales.

Las soluciones inyectables pueden producirse, por ejemplo, de la manera convencional, tal como mediante la adición de agentes conservantes, tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizadores, tales como EDTA. Las soluciones pueden introducirse entonces en viales o ampollas de inyección.

La administración oral es extremadamente cómoda. Sin embargo, como se describe en otra parte de este documento, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la presente invención son ventajosamente muy estables, incluso a pH bajo, por ejemplo a un pH inferior a 3.0 o inferior a 2.0, por ejemplo a pH 1.8, y resistentes a diversas enzimas y proteasas, lo que significa que la administración oral es prácticamente factible. Es importante destacar que la administración oral directa, por ejemplo sin recubrimiento u otros medios de protección, también es prácticamente factible. Por lo tanto, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención pueden administrarse, por ejemplo, a través del agua de bebida, o añadiendo los anticuerpos (o proteínas de unión) a un alimento animal adecuado, por ejemplo, incorporándolos en pellets de alimento o similar, o utilizándolos como

aderezo/espolvoreado sobre el alimento, todo lo cual permite convenientemente una administración regular, por ejemplo, diariamente o con mayor frecuencia si se desea. Dichos anticuerpos también pueden administrarse rociando a los sujetos que se van a tratar, o mediante administración in ovo, o a través del sistema respiratorio, por ejemplo, mediante inhalación.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona productos alimenticios o aditivos alimenticios o suplementos alimenticios, por ejemplo, un producto o aditivo o suplemento alimenticio para animales, que comprende un anticuerpo (o proteína de unión) de la invención o una célula huésped de la invención. Dichos productos alimenticios pueden adoptar la forma de una premezcla de alimentación o un producto en polvo para aderezo (por ejemplo, para espolvorear sobre el alimento). También se proporcionan productos alimenticios para animales en donde un anticuerpo (o proteína de unión) de la invención se mezcla con o se incorpora en el alimento animal.

En la técnica se describen medios alternativos de administración oral. Un método preferido puede implicar el uso de sistemas de administración vivos y vectores tales como vectores microbianos. Los vectores microbianos incluyen bacterias tales como Bacillus, por ejemplo, Bacillus subtilis, Lactobacillus, tales como Lactobacillus reuteri, Lactococcus, Salmonella, Escherichia coli y Listeria. También se pueden utilizar células de levadura, tales como Pichia o Saccharomyces. Estos vectores microbianos o vectores vivos están diseñados para expresar, y preferiblemente secretar, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención y administrarlos, preferiblemente directamente, al sitio de acción, por ejemplo, mediante administración oral o administración mucosa. Por lo tanto, tales vectores microbianos a veces se denominan microbianos de alimentación directa (DFM). Por lo tanto, tales vectores, por ejemplo, vectores recombinantes, permiten la administración *in situ* de los bioterapéuticos ya que los anticuerpos (o proteínas de unión) pueden secretarse o producirse de otro modo por los vectores microbianos dentro del animal. La administración mediante dichos vectores protege ventajosamente los anticuerpos del duro entorno gastrointestinal hasta que se secretan, pero también puede maximizar la eficacia y minimizar los efectos

no deseados. Dichos vectores también permiten la producción sostenida y continua de los anticuerpos (o proteínas de unión) dentro del tracto gastrointestinal, y preferiblemente muestran persistencia en el tracto gastrointestinal a través de la colonización, como en las cepas parentales (no modificadas).

Dichos vectores también se pueden producir con relativa facilidad (y de manera rentable) a gran escala y, en general, se pueden administrar dosis altas sin efectos adversos; por ejemplo, es posible la administración de una dosis de al menos 10⁸ UFCs, y esto se puede hacer una o dos veces al día si es necesario.

Por lo tanto, los vectores microbianos preferidos son cepas bacterianas diseñadas o recombinantes, por ejemplo, cepas probióticas como *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, y *Lactobacillus*, como *Lactobacillus reuteri*, ambas de las cuales se han descrito como útiles para la administración oral de biomoléculas, incluidos anticuerpos/anticuerpos VHH, por ejemplo, por secreción (véase, por ejemplo, Del Rio, B., et al., 2019, *Frontiers in Microbiology*, 9, 3179). En algunas modalidades, un vector preferido es *Bacillus subtilis*.

Las unidades de dosificación adecuadas pueden ser determinadas por un experto en la materia.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente otros principios activos/agentes activos (por ejemplo, como se describe en otra parte del presente documento) en el contexto de regímenes de coadministración o regímenes combinados.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) definidos en el presente documento, o las moléculas de ácido nucleico, vectores de expresión o células huésped o composiciones como se definen en el presente documento, para su uso en terapia, en particular para su uso en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o afección asociada con (o caracterizada por) NetB o donde NetB tiene un papel, por ejemplo, un papel causal (por ejemplo, un papel total o parcialmente causal) o un papel esencial. Por ejemplo, los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión), etc., de la invención se pueden utilizar en el tratamiento o

prevención de cualquier infección causada por una bacteria u otro patógeno, en donde dicha infección está asociada con NetB, o donde NetB tiene un papel, por ejemplo un papel causal (por ejemplo, un papel causal total o parcialmente), o un papel esencial. Dicho de otra manera, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión), etc., pueden dirigirse e inhibir o reducir la función de NetB (por ejemplo, la función tóxica de NetB), en particular NetB producido por *C. perfringens*, u otras bacterias o patógenos. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión), etc., definidos en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o afección en la que la inhibición de NetB o el bloqueo o reducción de la función de NetB sea útil.

En otras modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos (o proteínas de unión) que tienen la capacidad de reducir o inhibir la función de NetB y, por lo tanto, pueden usarse para tratar o prevenir la NE, por ejemplo, la NE causada por o asociada con *C. perfringens*.

Las modalidades preferidas proporcionan los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) de la invención, o las moléculas de ácido nucleico, vectores de expresión o células huésped o composiciones de la invención, para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas en especies aviares tales como aves de corral, por ejemplo infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal, preferiblemente infección por *C. perfringens*. Se prefiere particularmente el tratamiento o prevención de la enteritis necrótica (NE), por ejemplo NE causada por o asociada con la producción de NetB, en particular la producción de NetB por *C. perfringens*.

La administración de las proteínas de unión o anticuerpos o las moléculas de ácido nucleico, vectores de expresión o células huésped, o composiciones, en los métodos y usos terapéuticos de la invención se lleva a cabo en cantidades farmacéuticamente, terapéuticamente o fisiológicamente efectivas, a sujetos (animales, por ejemplo, mamíferos o especies aviares, por ejemplo, aves de corral) que necesitan tratamiento. Por lo tanto, dichos métodos y usos pueden implicar el paso adicional de identificar un sujeto (o sujetos/grupo de sujetos) que

necesitan tratamiento. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las concentraciones/dosis adecuadas y eficaces que se deben administrar.

El tratamiento de enfermedades o afecciones de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad preexistente) incluye la curación de dicha enfermedad o afección, o cualquier reducción o alivio de la enfermedad, por ejemplo, la reducción de la gravedad de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad. Los parámetros ejemplares a evaluar pueden incluir la reducción de la mortalidad o de la puntuación de la lesión intestinal (lesión necrótica), o pesos finales mejorados (o aumentados) o una tasa de conversión alimenticia reducida (o disminuida o baja). Dichos aumentos o reducciones pueden ser en comparación con cualquier control adecuado, cuyos ejemplos se describen en el presente documento, por ejemplo, en comparación con aves no tratadas (por ejemplo, aves no tratadas con las moléculas de la invención).

Los métodos y usos terapéuticos de la invención preventiva son adecuados para la prevención de enfermedades, así como para el tratamiento activo de enfermedades (por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad preexistente). Por lo tanto, el tratamiento profiláctico y metafiláctico (tratamiento ante un brote de enfermedad, por ejemplo, tratamiento de un grupo de sujetos después del diagnóstico de infección y/o enfermedad clínica en parte del grupo, con el objetivo de prevenir la propagación de una enfermedad infecciosa a animales en contacto cercano y/o con riesgo significativo), en particular el tratamiento profiláctico, también está abarcado por la invención. Por esta razón, en los métodos y usos de la presente invención, el tratamiento también incluye profilaxis, metafilaxis o prevención cuando sea apropiado.

Dichos aspectos preventivos (o protectores) pueden llevarse a cabo convenientemente en sujetos sanos o normales o en riesgo y pueden incluir tanto la prevención completa como la prevención significativa. De manera similar, la prevención significativa puede incluir el escenario en el que la gravedad de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad se reducen (por ejemplo, se reducen de manera medible o significativa) en comparación con la gravedad o los síntomas

que se esperarían si no se administra ningún tratamiento.

Los síntomas resultantes de una enfermedad clínica causada por o asociada con la producción de NetB, por ejemplo, enfermedades como la NE que puede ser causada por una infección con *C. perfringens*, incluyen un aumento
 5 repentino en la mortalidad de la manada, deshidratación, apatía, diarrea, cama húmeda, plumas erizadas y disminución del consumo de alimento. Los síntomas resultantes de una enfermedad subclínica incluyen un rendimiento deficiente general y un aumento en la tasa de conversión alimenticia (la tasa de conversión alimenticia es la cantidad de alimento consumido/aumento en el peso corporal)
 10 como consecuencia del daño crónico de la mucosa intestinal causado por la toxina. Además, en las formas subclínicas, el daño al intestino permite que las bacterias alcancen el torrente sanguíneo portal y colonicen el hígado causando hígados enfermos que darán como resultado un aumento de los decomisos durante el procesamiento en el matadero. Tanto las formas clínicas como las
 15 subclínicas de las enfermedades, por ejemplo, la NE, pueden tratarse.

Los sujetos adecuados para el tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, por lo tanto, cualquier tipo de animal que sea susceptible a la infección con un patógeno que pueda producir NetB o una toxina similar a (o sustancialmente homóloga a) NetB. Por lo tanto, los sujetos
 20 adecuados incluyen típicamente cualquier tipo de animal que sea susceptible a la infección con *C. perfringens*, incluidos los sujetos humanos. Los sujetos preferidos incluyen todos los tipos de especies aviares o de pájaros, por ejemplo, cualquier especie aviar o de pájaro doméstica, de granja o salvaje, siempre que sean susceptibles o capaces de infectarse y sufrir enfermedades asociadas con
 25 patógenos productores de NetB como se define en el presente documento, y en particular *C. perfringens*. Los ejemplos específicos incluyen sujetos del orden Gallanserae. Por ejemplo, los sujetos preferidos son animales de corral o especies tales como pollos, pavos, patos, gansos, palomas, pichones o codornices. Los pollos son especialmente preferidos. Los sujetos aviares pueden
 30 sufrir formas clínicas o subclínicas de la enfermedad, por ejemplo, NE. Para evitar dudas, la referencia en el presente documento a un sujeto, por ejemplo, el

tratamiento o la administración a un sujeto, incluye múltiples sujetos o un grupo de sujetos.

En algunas modalidades, por ejemplo, cuando se trata de prevención, el sujeto (o grupo de sujetos) es un sujeto en riesgo de verse afectado por la enfermedad o afección en cuestión, por ejemplo, en riesgo de estar infectado con un patógeno productor de NetB (por ejemplo, *C. perfringens*) como se describió anteriormente y desarrollar la enfermedad. Dicho sujeto puede ser un sujeto sano o un sujeto que no presente ningún síntoma de enfermedad o cualquier otro sujeto "en riesgo" apropiado. En otra modalidad, el sujeto es un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene (o desarrolla), o potencialmente tiene (o desarrolla) la enfermedad o afección en cuestión como se describió anteriormente.

Alternativamente, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con (o caracterizada por) NetB o donde NetB tiene un papel, por ejemplo un papel causal (por ejemplo, un papel causal total o parcialmente) o un papel esencial, cuyo método comprende administrar a un sujeto (o grupo de sujetos) que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NetB (o proteína de unión) de la invención, o una molécula de ácido nucleico, vector de expresión, célula huésped o composición de la invención como se define en el presente documento, incluidas las combinaciones de agentes. Las enfermedades o afecciones apropiadas, y los sujetos, se describen en otra parte del presente documento.

Se prefiere el tratamiento o la prevención de enfermedades en especies aviares, en particular aves de corral, por ejemplo pollos. Se prefieren particularmente los métodos para el tratamiento o la prevención de la infección por *C. perfringens*. Se prefieren particularmente los métodos para el tratamiento o la prevención de la enteritis necrótica (NE), por ejemplo NE causada por o asociada con la producción de NetB, en particular la producción de NetB por *C. perfringens*.

Dichos anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión), etc., de la invención se administran generalmente en cantidades farmacéuticamente, fisiológicamente o terapéuticamente eficaces a un sujeto (o grupo de sujetos) que los necesite.

Por “cantidad farmacéuticamente, fisiológicamente o terapéuticamente eficaz” se entiende una cantidad suficiente para demostrar un beneficio para la afección del sujeto (o grupo de sujetos). Un experto en la materia puede determinar fácilmente si una cantidad es suficiente para demostrar un
5 beneficio para la afección del sujeto. Una cantidad farmacéuticamente, fisiológicamente o terapéuticamente eficaz se puede determinar en función de la evaluación clínica y se puede controlar fácilmente.

Las modalidades de los usos terapéuticos de la invención descritas en el presente documento se aplican, *mutatis mutandis*, a este aspecto de la
10 invención.

En una perspectiva alternativa adicional, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-NetB (o proteína de unión) de la invención, o una molécula de ácido nucleico, vector de expresión, célula huésped o composición de la invención como se define en el presente documento, incluidas
15 combinaciones de agentes, en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia en un sujeto (o grupo de sujetos), o para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un sujeto (o grupo de sujetos). Los usos terapéuticos preferidos se describen en otras partes del presente documento, en particular para su uso en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad
20 o afección asociada con (o caracterizada por) NetB o donde NetB tiene un papel, por ejemplo un papel causal (por ejemplo, un papel total o parcialmente causal) o un papel esencial. Las enfermedades o afecciones apropiadas, y los sujetos, se describen en otras partes del presente documento.

Las modalidades preferidas proporcionan el uso de anticuerpos anti-
25 NetB (o proteínas de unión), etc., de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la infección por *C. perfringens*. También se prefiere el uso de anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión), etc., de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la enteritis necrótica (NE), por ejemplo, NE causada
30 por o asociada con la producción de NetB, en particular la producción de NetB por *C. perfringens*. Se prefiere el tratamiento o prevención de enfermedades en

especies aviares, en particular aves de corral, por ejemplo pollos.

Las modalidades de los usos terapéuticos de la invención descritas en el presente documento se aplican, *mutatis mutandis*, a este aspecto de la invención.

5 En algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención se pueden utilizar en combinación.

Por ejemplo, los anticuerpos VHH específicos, Net 83 y Net 14, como se muestra en las Tablas A y B, respectivamente, se pueden utilizar en combinación. Por lo tanto, se pueden utilizar dos (o más) anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención en combinación. Uno o más anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención también se pueden utilizar en combinación con otros agentes activos, incluidos otros agentes activos que se dirigen a, inhiben o reducen la actividad de NetB, por ejemplo otros anticuerpos anti-NetB.

10 Como alternativa, en las combinaciones anteriores, también se pueden utilizar anticuerpos con las 3 CDRs como se muestra en las Tablas A y/o B, según corresponda, o anticuerpos con secuencias de CDR sustancialmente homólogas como se define en otra parte del presente documento.

Las combinaciones preferidas son aquellas que dan como resultado una eficacia terapéutica mejorada o aumentada, preferiblemente significativamente mejorada o aumentada, en comparación con cualquiera de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención (por ejemplo, VHH) administrados como un único agente activo (monoterapia), o un único anticuerpo, o un único agente anti-NetB. Otras combinaciones preferidas son aquellas en las que los anticuerpos anti-NetB individuales de la combinación se unen a diferentes epítomos en la molécula de NetB.

25 Para dichos tratamientos de combinación que utilizan dos o más anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión), el segundo anticuerpo anti-NetB (o posterior) se puede administrar a un sujeto sustancialmente de manera simultánea con el primer anticuerpo anti-NetB, como a partir de una única composición farmacéutica (y, por lo tanto, se administra simultáneamente) o a partir de dos composiciones farmacéuticas administradas juntas (al mismo tiempo o en un

momento similar). Alternativamente, el segundo anticuerpo anti-NetB (o posterior) se puede administrar a un sujeto en un momento anterior o secuencial a la administración del primer anticuerpo anti-NetB. "En un momento anterior o secuencial a", como se usa en el presente documento, significa "escalonado", de modo que el segundo anticuerpo se administra a un sujeto en un momento distinto a la administración del primer componente de anticuerpo anti-NetB. En general, los dos (o más) componentes se pueden administrar en momentos espaciados de manera efectiva entre sí o juntos para permitir que los componentes individuales ejerzan sus respectivos efectos terapéuticos, es decir, se administran en "cantidades biológicamente efectivas" a "intervalos de tiempo biológicamente efectivos" y se administran como parte del mismo régimen terapéutico.

Las combinaciones de anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) pueden, si es apropiado, administrarse convenientemente como parte de la misma molécula o constructo, por ejemplo, pueden conjugarse o unirse entre sí, por ejemplo, con un conector artificial. Este modo de administración puede ser particularmente apropiado para anticuerpos VHH (u otros tipos de moléculas de anticuerpos que están compuestas por una sola cadena polipeptídica), anticuerpos individuales de los cuales pueden conectarse convenientemente mediante conectores peptídicos (u otros) apropiados, por ejemplo, conectores peptídicos o artificiales no nativos, en una sola cadena polipeptídica que contiene múltiples anticuerpos VHH (u otros), ya sea de la invención o en combinación con otros VHH u otros anticuerpos, por ejemplo, VHH u otros anticuerpos contra otras entidades relevantes, como la toxina alfa (CPA). En dichas modalidades, los agentes generalmente se unen entre sí utilizando técnicas apropiadas, por ejemplo, espaciamiento, de modo que cada componente pueda ejercer sus respectivos efectos, por ejemplo, la unión a NetB. Por ejemplo, en modalidades en las que los anticuerpos anti-NetB se unen a diferentes epítomos en NetB, entonces se prefieren las combinaciones de dichos anticuerpos y los constructos se diseñan apropiadamente de modo que cada anticuerpo individual pueda unirse a NetB, p. ej. a su epítomo NetB. Además, también se contemplan constructos multiespecíficos, p. ej. constructos VHH multiespecíficos, donde están presentes

especificidades (preferiblemente en forma de anticuerpos, p. ej. anticuerpos VHH) distintas de (además de) NetB, p. ej. en una sola molécula. Por lo tanto, las combinaciones de anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) de la invención se pueden combinar con otros anticuerpos que tienen especificidades para entidades distintas de NetB, p. ej. anticuerpos para CPA.

En otras modalidades de la invención, se pueden proporcionar múltiples copias de un solo anticuerpo NetB (o proteína de unión) de la invención en una sola molécula, p. ej. como un dímero (homodímero) o un multímero más grande (homomultímero), p. ej. con tres o cuatro copias del mismo anticuerpo o proteína de unión. Por lo tanto, en modalidades preferidas de este tipo, un anticuerpo NetB o proteína de unión de la invención, por ejemplo, el anticuerpo Net 83 o Net 14 como se describe en este documento, o un anticuerpo basado en las secuencias de anticuerpo Net 83 o Net 14 establecidas en las Tablas A o B como se describe en este documento, se puede proporcionar como un dímero o multímero más grande. En tales dímeros o multímeros más grandes, las múltiples copias de los anticuerpos o proteínas de unión se pueden unir de cualquier manera apropiada. Convenientemente, especialmente para los anticuerpos VHH (u otros tipos de moléculas de anticuerpos que están compuestas de una sola cadena polipeptídica), los anticuerpos individuales se pueden conectar en una sola cadena polipeptídica mediante enlaces peptídicos (u otros) apropiados como se describió anteriormente. Tales dímeros o multímeros más grandes forman un aspecto adicional de la invención.

Por lo tanto, en algunas modalidades, los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) de la invención se pueden utilizar como el único agente activo en un régimen de tratamiento (monoterapia), o se pueden utilizar más de uno de los anticuerpos anti-NetB de la invención en combinación, por ejemplo, como se describió anteriormente. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) de la invención (o combinaciones según corresponda) se pueden utilizar como el único agente(s) anti-NetB activo o los únicos anticuerpos anti-NetB activos en un régimen de tratamiento, o pueden ser el único agente(s) anti-*C. perfringens* o anti-NE activo en un régimen de tratamiento. Sin embargo, en

algunas modalidades, se pueden utilizar agentes anti-NetB adicionales o agentes anti-*C. perfringens* o anti-NE.

Por lo tanto, las proteínas de unión o anticuerpos anti-NetB de la invención (o combinación según corresponda) se pueden combinar con uno o más agentes activos adicionales (dirigidos a NetB o no dirigidos a NetB), p. ej. con al menos un segundo agente terapéutico o biológico, donde la proteína de unión anti-NetB o el anticuerpo de la invención (o combinación de dichas proteínas de unión o anticuerpos), es el primero.

Los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) de la invención (o combinación según sea apropiado) pueden, por ejemplo, combinarse con cualquier otro agente terapéutico que sea útil para tratar la enfermedad en cuestión, por ejemplo, el tratamiento de la enfermedad causada por o asociada con la infección por *C. perfringens* o por la producción de NetB, o el tratamiento de NE. Por lo tanto, los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) de la invención pueden combinarse con otros agentes (por ejemplo, otros anticuerpos) que se usan para tratar la infección por *C. perfringens*, tales como agentes (por ejemplo, anticuerpos) que inhiben otras toxinas que pueden ser producidas por *C. perfringens*, por ejemplo, la toxina alfa (CPA, toxina alfa de *C. perfringens*). Uno o más anticuerpos de toxina alfa, por ejemplo, anticuerpos VHH o anticuerpos de cadena sencilla, serían ejemplos de un agente apropiado y preferido para su uso en dichas terapias de combinación, por ejemplo, uno o más anticuerpos VHH anti-NetB de la invención pueden combinarse con uno o más anticuerpos anti-toxina alfa (CPA), por ejemplo, Anticuerpos VHH. Otro ejemplo serían las combinaciones con antibióticos, por ejemplo, antibióticos que se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades causadas por o asociadas con la infección por *C. perfringens* o por la producción de NetB o NE. Otros ejemplos serían las combinaciones con probióticos o aditivos alimentarios como enzimas, vitaminas y/o minerales. Otros ejemplos serían las combinaciones con agentes que se pueden utilizar para el tratamiento de la coccidiosis, como coccidiostáticos o anticuerpos anticoccidiosis. En todos estos tratamientos combinados, por ejemplo, una combinación de un agente anti-NetB (como un anticuerpo o proteína de unión

de la invención) y un agente anti-CPA, los efectos terapéuticos observados son preferiblemente sinérgicos.

Para estos tratamientos combinados, el segundo agente (anticuerpo no anti-NetB de la invención) se puede administrar a un sujeto de forma conjunta (simultánea o sustancialmente simultánea, por ejemplo, mezclados en una preparación combinada, o como parte de la misma molécula, por ejemplo, cuando se utilizan dos o más anticuerpos VHH o anticuerpos de cadena sencilla) o por separado, como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, en algunas modalidades preferidas, los anticuerpos anti-NetB (o proteínas de unión) de la invención se administran en combinación con anticuerpos anti-CPA (o proteínas de unión). Los diferentes anticuerpos pueden administrarse, por ejemplo, como una mezcla, o como componentes separados, o pueden proporcionarse como parte de la misma molécula, por ejemplo, uniendo los diferentes anticuerpos entre sí, por ejemplo, un VHH anti-NetB de la invención puede unirse a un VHH anti-CPA como se describe en otra parte del presente documento.

Por lo tanto, una composición preferida de la invención comprende un anticuerpo anti-NetB (o proteína de unión) de la invención en combinación con un agente que inhibe CPA, preferiblemente un anticuerpo anti-CPA (o proteína de unión), por ejemplo, un anticuerpo VHH.

La invención incluye además kits que comprenden uno o más de los anticuerpos, o composiciones de la invención, o una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, o uno o más vectores de expresión recombinantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la invención, o una o más células huésped o virus que comprenden los vectores de expresión recombinantes o secuencias de ácido nucleico de la invención. Preferentemente, dichos kits son para su uso en los métodos y usos descritos en el presente documento, por ejemplo, los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Preferentemente, dichos kits comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit. Preferentemente, dichos kits son para tratar enfermedades o afecciones como se describe en otra parte del presente

documento, y opcionalmente comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit para tratar dichas enfermedades o afecciones. También se proporcionan modalidades equivalentes con proteínas de unión de la invención.

5 Los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención como se define en el presente documento también se pueden utilizar como herramientas moleculares para aplicaciones y ensayos *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, ensayos de diagnóstico. Como los anticuerpos (y algunas proteínas de unión) tienen un sitio de unión al antígeno, estos pueden funcionar como miembros de pares de unión específicos y estas moléculas se pueden utilizar en cualquier ensayo donde
10 se requiera el miembro del par de unión particular.

Por lo tanto, otros aspectos adicionales de la invención proporcionan un reactivo que comprende un anticuerpo (o proteína de unión) de la invención como se define en el presente documento y el uso de dichos anticuerpos (o proteínas de unión) como herramientas moleculares, por ejemplo en ensayos *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo para la detección de NetB, por ejemplo en una muestra de interés.
15

En una modalidad, la invención proporciona un método para diagnosticar NE u otras enfermedades como se describe en el presente documento, en un sujeto, que comprende el paso de:

20 (a) poner en contacto una muestra de prueba tomada de dicho sujeto con uno o más de los anticuerpos o proteínas de unión de la invención.

En una modalidad adicional, la invención proporciona un método para diagnosticar NE u otras enfermedades como se describe en el presente documento, en un sujeto, que comprende los pasos de:

25 (a) poner en contacto una muestra de prueba tomada de dicho sujeto con uno o más de los anticuerpos o proteínas de unión de la invención;

(b) medir o detectar la presencia y/o cantidad y/o ubicación de complejos anticuerpo-NetB o proteína de unión-NetB en la muestra de prueba; y opcionalmente

30 (c) comparar la presencia y/o cantidad de complejos anticuerpo-NetB o proteína de unión-NetB en la muestra de prueba con un control.

En los métodos anteriores, dicha etapa de contacto se lleva a cabo en condiciones que permiten la formación (por ejemplo, formación detectable) de complejos anticuerpo-NetB o proteína de unión-NetB. Las condiciones apropiadas pueden ser determinadas fácilmente por una persona experta en la materia.

5 En los métodos anteriores se puede utilizar cualquier muestra de prueba o muestra biológica apropiada, por ejemplo, una muestra de sangre o suero, material de tejidos u órganos sospechosos de estar afectados por NE u otras enfermedades como se describe en este documento (por ejemplo, intestino delgado u otras muestras GI apropiadas), o secciones histológicas. Las muestras
10 se toman de sujetos apropiados como se define en otra parte de este documento, por ejemplo, sujetos aviares, por ejemplo, sujetos de aves de corral como pollos.

En algunos de los métodos anteriores, la presencia en la muestra de prueba de cualquier cantidad de complejos anticuerpo-NetB o proteína de unión-NetB sería indicativa de la presencia de NE u otras enfermedades como se
15 describe en este documento. Preferiblemente, para que se realice un diagnóstico positivo, la cantidad de complejos de anticuerpo-NetB o proteína de unión-NetB en la muestra de prueba es mayor que, preferiblemente medible o significativamente mayor que, la cantidad encontrada en una muestra de control apropiada (un valor o nivel de control). Más preferiblemente, los niveles significativamente mayores
20 son estadísticamente significativos, preferiblemente con un valor de probabilidad de $<0,05$. Los métodos apropiados para determinar la significación estadística son bien conocidos y están documentados en la técnica y cualquiera de ellos puede usarse.

Las muestras de control apropiadas podrían ser elegidas fácilmente
25 por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, en el caso del diagnóstico de NE, un control apropiado sería una muestra de un sujeto que no tuviera NE, por ejemplo, un sujeto sano. Los "valores" o "niveles" de control apropiados también podrían determinarse fácilmente sin ejecutar una "muestra" de control en cada prueba, por ejemplo, por referencia al rango para sujetos normales o sanos
30 conocido en la técnica. El valor o nivel de control puede corresponder así al nivel en sujetos o muestras de control apropiados, por ejemplo, puede corresponder a

un nivel de corte o rango encontrado en una población de control o de referencia.

En una modalidad, el método de diagnóstico de NE u otras enfermedades como se describe en este documento es un método *in vitro*.

En una modalidad, el método de diagnóstico de NE u otras
5 enfermedades como se describe en este documento es un método *in vivo*.

Visto de manera alternativa, la presente invención proporciona un método de detección de NE u otras enfermedades como se describe en este documento, o un método de detección de NE u otras enfermedades como se describe en este documento, en un sujeto.

10 El término "disminuir" o "reducir" (o términos equivalentes) como se describe en este documento incluye cualquier disminución o reducción medible cuando se compara con un control apropiado. Los controles apropiados serían fácilmente identificados por una persona experta en la técnica y podrían incluir sujetos no tratados o tratados con placebo o sujetos sanos, o muestras o ensayos
15 donde no está presente ningún anticuerpo (o proteína de unión) de la invención. Preferiblemente, la disminución o reducción será significativa, por ejemplo, clínica o estadísticamente significativa.

El término "aumento" (o términos equivalentes) como se describe en este documento incluye cualquier aumento o elevación medible en comparación
20 con un control apropiado. Los controles apropiados serían fácilmente identificados por una persona experta en la técnica y podrían incluir sujetos no tratados o tratados con placebo o sujetos sanos, o muestras o ensayos donde no esté presente ningún anticuerpo (o proteína de unión) de la invención. Preferiblemente, el aumento será significativo, por ejemplo, clínicamente o estadísticamente
25 significativo.

Preferiblemente, tales aumentos (y de hecho otros aumentos, mejoras o efectos positivos como se menciona en otra parte del presente documento) o tales disminuciones (y de hecho otras disminuciones, reducciones o efectos negativos como se menciona en otra parte del presente documento) son
30 aumentos, disminuciones, etc. medibles, (según corresponda), más preferiblemente son aumentos, disminuciones, etc. significativos, preferiblemente

aumentos clínicamente significativos o estadísticamente significativos, por ejemplo con un valor de probabilidad de $\leq 0,05$ o $< 0,05$, cuando se compara con un nivel o valor de control apropiado (por ejemplo, en comparación con un sujeto no tratado o tratado con placebo o en comparación con un sujeto sano o normal, o el mismo sujeto antes del tratamiento).

Los métodos para determinar la significación estadística de las diferencias entre grupos de sujetos de prueba o las diferencias en los niveles de un parámetro particular son bien conocidos y están documentados en la técnica. Por ejemplo, en este documento, una disminución o un aumento en el nivel de un parámetro particular o una diferencia entre grupos de sujetos de prueba se considera generalmente estadísticamente significativa si una comparación estadística utilizando una prueba de significación como una prueba t de Student, una prueba de suma de rangos U de Mann-Whitney, una prueba de chi-cuadrado o una prueba exacta de Fisher, pruebas ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías según corresponda, muestra un valor de probabilidad de $\leq 0,05$ o $< 0,05$.

TABLA DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DIVULGADAS EN EL PRESENTE DOCUMENTO Y SUS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA (SEQ ID NOS)

Todas las secuencias de aminoácidos se enumeran en este documento desde el extremo N al extremo C de acuerdo con la convención en este campo técnico.

Tabla A		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Net 83		
1	VHH (aa)	QVQLVESGGGLVQAGESLR LSCAASGSIRSI SFMNWYRQQPGKQR ELVAGINQIGNTNYAGSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCNVIVRGTVSPFQFWGQGTQVT VSS
2	Pesada CDR1	GSIRSI SFMN
3	Pesada CDR2	INQIGNT

Tabla A		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
4	Pesada CDR3	IVRGTVSPFQF
5	Pesada FR1	QVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAAS
6	Pesada FR2	WYRQQPGKQRELVAG
7	Pesada FR3	NYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNV
8	Pesada FR4	WGQGTQVTVSS

Tabla B		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
Net 14		
9	VHH (aa)	QVQLVESGGGLVQAGGSVRLSCVASGLTFSGYSLGWFRQAPGKER EGVSYISSSGMITDYADSVKGRVTISRDDAKSTMYLQMNSLKPEDT AVYYCAARFPRPRSWLSTDSYNYWGQGAQVTVSS
10	Pesada CDR1	GLTFSGYSLG
11	Pesada CDR2	ISSSGMIT
12	Pesada CDR3	RFRPRSWLSTDSYNY
13	Pesada FR1	QVQLVESGGGLVQAGGSVRLSCVAS
14	Pesada FR2	WFRQAPGKEREGVSY
15	Pesada FR3	DYADSVKGRVTISRDDAKSTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
16	Pesada FR4	WGQGAQVTVSS

Toxina NetB (SEQ ID NO: 17)

SELNDINKIELKNLSGEIIKENGKEAIKYTSSDTASHKGWKATLSGTFIEDPHSDKK
 TALLNLEGFIPSDKQIFGSKYYGKMKWPETYRINVKSADVNNNIKIANSIPKNTIDK
 KDVSNSIGYSIGGNISVEGKTAGAGINASYNVQNTISYEQPDFRTIQRKDDANLAS
 WDIKFVETKDGYNIDSYHAIYGNQLFMKSRLYNNGDKNFTDDRDLSTLISGGFSP
 NMALALTAPKNAKESVIIVEYQRFNDYILNWETTQWRGTNKLSTSEYNEFMFKI

NWQDHKIEYYL

Toxina NetB (SEQ ID NO: 18)

5 SELNDINKIELKNLSGEIIKENGKEAIKYTSSDTASHKGWKATLSGTFIEDPHSDKK
TALLNLEGFIPSDKQIFGSKYYGKMKWPETYRINVKSADVNNNIKIAN SIPKNTIDK
KDVSNSIGYSIGGNISVEGKTAGAGINASYNVQNTISYEQPDFRTIQRKDDANLAS
WDIKFVETKDGYNIDSYHAIYGNQLFMKSRLYNNGDKNFTDDRDLSLISGGFSP
NMALALTAPKNAKESVIIVEYQRFNDYILNWETTQARGTNKLSSTSEYNEFMFKI
10 NWQDHKIEYYL

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos:

La Figura 1A muestra una curva estándar de lisis de glóbulos rojos inducida por NetB. La Figura 1B muestra la inhibición del ensayo de lisis de
15 chRBC inducida por NetB (pH 7.4).

La Figura 2A muestra la estabilidad después de la incubación con quimotripsina. El Gel SDS-PAGE de VHH después de la incubación con quimotripsina. La Figura 2B muestra la actividad de clones seleccionados después de la incubación con quimotripsina.

20 La Figura 3A muestra la estabilidad y la actividad después de la incubación con pepsina. La Figura 3B muestra la actividad después de la incubación con pepsina. Inhibición de la lisis de RBC inducida por NetB por VHH después de la incubación con pepsina. La Figura 3C muestra la estabilidad de clones seleccionados después de la incubación con pepsina. El Gel SDS-PAGE
25 de VHH seleccionados en varios puntos temporales durante una incubación prolongada con pepsina. La figura 3D muestra la actividad de clones seleccionados después de la incubación con pepsina.

La Figura 4A muestra la estabilidad después de la incubación con pancreatina. El Gel SDS-PAGE de VHH incubado con cantidades crecientes de
30 pancreatina. La Figura 4B muestra la estabilidad de VHH seleccionados después de la incubación con pancreatina. Gel SDS-PAGE de VHH en varios puntos

temporales durante la incubación con pancreatina.

La Figura 5A muestra un gel que evidencia la estabilidad de VHH en agua. La figura 5B muestra la estabilidad de VHH en agua y el efecto sobre la potencia.

5 La Figura 6 muestra la titulación Biacore de VHH seleccionados.

La Figura 7 muestra la concentración de Net_83 en muestras de digesta del buche de aves que recibieron agua suplementada con el anticuerpo *ad libitum* durante 24 horas T01-1=Net_83, T02-1=Net_83 en agua con NaHCO₃.

La Figura 8 muestra la probabilidad de muerte por enteritis necrótica en todas las causas desde el desafío con *Clostridium perfringens* (Cp) hasta el final del estudio (día 17-día 30). El tratamiento con anticuerpos fue durante 6 días. T01 = control no tratado infectado (IUC), T02 = no tratado y no desafiado (UUC), T03 = amoxicilina en agua potable durante 5 días, T04 = anticuerpos CPA + Net_83, T05 = NaHCO₃, T06 = anticuerpos CPA + Net_83 en agua con NaHCO₃.

15 La Figura 9 muestra la probabilidad de muerte de aves de los grupos de anticuerpos (T04 y T06) combinados (n = 260) vs T01 (IUC) y T05 (NaHCO₃) combinados (grupo sin tratamiento; n = 260). Se muestra el valor P de Log-Rank para el análisis del tiempo transcurrido hasta el evento en cada grupo. Se censuró a un ave cuando sobrevivió hasta el día 30.

20 La Figura 10 muestra la probabilidad de tener un corral de muerte para los grupos de anticuerpos (T04 y T06) combinados (n = 20) frente a T01 (IUC) y T05 (NaHCO₃) combinados (grupo sin tratamiento, n = 20). Se consideró que un corral sobrevivía si todavía albergaba al menos un ave el día 30. Un corral se clasificó como muerto cuando perdió todas las aves debido a la NE. Se proporciona el valor P de Log-Rank para los análisis de tiempo hasta el evento.

25 La Figura 11 muestra la unión de ELISA a NetB-His del sobrenadante de tres clones de *Bacillus subtilis* que expresan Net_14 y uno que expresa un clon VHH irrelevante (Anti-JTT-A).

30 La Figura 12 muestra la unión de ELISA a NetB-His del sobrenadante de tres clones de *Bacillus subtilis* que expresan Net_83 y uno que expresa un clon VHH irrelevante (Anti-JTT-B).

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Inmunización, generación de bibliotecas, detección y selección de clones

5 Materiales y métodos

Inmunizaciones

Se obtuvieron anticuerpos de dominio único de llamas inmunizadas con proteína recombinante. Se inyectó a las llamas antígeno toxoide NetB de *Clostridium perfringens* inactivo formulado en adyuvante incompleto de Freund.

10 Los animales fueron inmunizados con seis inyecciones subcutáneas (dos inyecciones con 100 µg/dosis seguidas de cuatro inyecciones con 50 µg/dosis) a intervalos semanales. Una semana después del último refuerzo, se recogieron sueros para definir los títulos de anticuerpos contra el toxoide de NetB.

15 En esta prueba ELISA, se recubrieron placas de 96 pocillos (Maxisorp; Nunc) con la proteína recombinante. Después de bloquear y añadir muestras de suero diluidas, se demostró la presencia de anticuerpos toxoides de anti-NetB utilizando IgG anti-llama de ratón (FJB, Cat. nr. FJ1203MAB01B09) seguido de un conjugado de inmunoglobulina peroxidasa anti-ratón (JIR, Cat. nr. 715-035-150).

20

Creación de la Biblioteca y Selecciones

Se extrajo el ARN de PBMC de 3 llamas inmunizadas (400 ml cada una). Se utilizaron 40 µg de ARN para la síntesis de ADNc utilizando cebadores aleatorios. El ADNc se utilizó en una amplificación primaria por PCR utilizando
25 cebadores no marcados que se hibridaban en la secuencia líder y las regiones Hinge CH1, seguida de una amplificación secundaria por PCR que introducía sitios de endonucleasas de restricción para la clonación de genes VHH en el vector fagémido pDCL1. Las bibliotecas se electroporaron en células de E. coli TG1 y el stock de glicerol bacteriano de las bibliotecas inmunes se almacenó a - 80 °C
30 (FL2471 y FL2472).

Selecciones

La producción de fagos a partir del pool de bibliotecas VHH de llama se utilizó en tres rondas consecutivas de selección por presentación de fagos utilizando proteína recombinante de toxoide NetB. Las rondas de selección de proteínas recombinantes se realizaron utilizando 10 µg/ml de toxoide NetB (tamponador PBS) con lavado del fago no específico, seguido de la elución del fago específico con tripsina (elución total).

Se realizaron diluciones seriadas de los fagos eluidos y se utilizaron para infectar TG1 en crecimiento exponencial. El TG1 infectado se incubó en placas LBCarb100Glu2% y se calcularon los valores de enriquecimiento sobre el fondo (sin antígeno para la selección).

CRIBADO PRIMARIO

Cribado de unión mediante ELISA

Los clones individuales de la primera y segunda ronda de resultados de las condiciones de selección se seleccionaron en placas maestras de 96 pocillos y se analizaron como extracto periplásmico (P.E.) para determinar su unión al toxoide NetB a pH 7.4 mediante ELISA de unión. Para la ELISA de unión del P.E., las placas ELISA de 96 pocillos MaxiSorp™ con alta capacidad de unión a proteínas se recubrieron con 1 µg/ml de toxoide NetB, diluido en PBS, durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 0,05 % (pH 7.4) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 250 µl/pocillo de Marvel/CPA al 4 % o Marvel/PBS al 4 %. Después del bloqueo, las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 0,05 % (pH 7.4) y se incubaron por pocillo con 20 µl de P.E + 80 µl en Marvel/PBS al 1 % (pH 7.4), durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 0,05 % (pH 7.4) y se incubaron con 100 µl de anticuerpo anti-c-Myc (Roche; Cat. nr. 11667203001) seguido del anticuerpo secundario DAM-HRP (JIR; Cat. nr. 715-035-150) en Marvel/PBS al 1 % (pH 7.4), durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 0,05 % (pH 7.4) y se añadió la solución de sustrato (solución de TMB) a las

placas. La reacción se detuvo con H_2SO_4 y las placas se leyeron en el lector de placas a 450 nm.

Secuenciación

- 5 Los aglutinantes positivos se enviaron para ser secuenciados. Los clones se clasificaron por familias según la secuencia de HCDR3 diferente.

Resultados y discusión

- Tras la inmunización de llamas con toxoide NetB recombinante, se seleccionaron clones de fagos mediante 2 rondas de selección de fagos. Los candidatos de fagos se confirmaron mediante la unión del extracto periplásmico al toxoide NetB recombinante mediante ELISA. Se demostró la unión de varios candidatos al toxoide NetB, como se muestra en la Tabla 1, que muestra datos de un subconjunto de clones que se ha demostrado que se unen al toxoide NetB.

- 15 Tabla 1: Resumen de datos de unión del extracto periplásmico de ELISA

20

25

30

Clon ID	PE ELISA pH 7.4 OD450
Net_07	4.54
Net_11	4.53
Net_13	4.60
Net_14	4.67
Net_15	4.60
Net_17	4.22
Net_30	4.57
Net_31	4.35
Net_32	4.36
Net_38	4.58
Net_42	4.27
Net_74	4.42
Net_80	4.51
Net_83	4.49

Los clones fueron examinados y seleccionados posteriormente por su tasa de disociación al unirse al toxoide NetB recombinante por Biacore. La proteína del toxoide NetB se inmovilizó en el chip sensor CM5 en 10 mM de acetato de sodio pH 5.0 a aproximadamente 1100 RU mediante acoplamiento de amina. El P.E. de los clones seleccionados se diluyó 1:5 en tamponador HBS-EP pH 7.4 y se inyectó sobre el toxoide NetB inmovilizado a 30 μ l/min durante 2 min. Después de esta inyección de unión, las muestras se dejaron disociarse durante 5 min. El chip se regeneró entre ejecuciones con una inyección de 1 M NaCl/1 mM glicina pH 1.5. Los controles incluyeron un anticuerpo antihistidina (BioLegend, Cat. nr. 652502) a 5 μ g/ml en tamponador HBS-EP pH 7.4, que no mostró una disminución significativa en la unión al principio y al final de las ejecuciones. Un ensayo de P.E. VHH irrelevante (FJ1409MP03C04) realizado de la misma manera no mostró unión al toxoide NetB. Varios candidatos demostraron una buena unión con velocidades de disociación del toxoide NetB, como se muestra en la Tabla 2.

Por lo tanto, la inmunización de llamas con proteína de toxoide NetB recombinante resultó en el aislamiento exitoso de candidatos a anticuerpos de fagos capaces de unirse a NetB con buenas velocidades de disociación.

Tabla 2: Datos de unión de la velocidad de disociación del extracto periplásmico

ID de Clon	Antígeno NetB-His RUmax (RU)	Antígeno NetB-His kd (1/s)
Net_07	222.6	6.77E-04
Net_11	89.8	3.53E-04
Net_13	181.0	8.93E-04
Net_14	335.4	1.43E-04
Net_15	343.8	1.03E-03
Net_17	192.4	6.67E-05
Net_30	326.8	6.45E-04
Net_31	226.0	1.40E-02

Net_32	290.8	2.00E-03
Net_38	328.5	1.28E-03
Net_42	194.3	2.67E-03
Net_74	312.9	1.17E-03
Net_80	260.8	8.58E-04
Net_83	328.6	4.27E-04

Ejemplo 2: Confirmación de la unión de VHH purificado contra la

toxina NetB a pH 7.4. Evaluación de la unión a pH 6.0.

Material y métodos:

Expresión y purificación de anticuerpos candidatos VHH

Los genes sintéticos que codifican los dominios variables VHH con etiquetas Avi y His se compraron y clonaron en el vector de expresión bacteriano pET15b con una secuencia líder de secreción periplásmica. La cepa de *E. coli* BL21 DE3 se transformó y cultivó en medio de autoinducción ZYP-5052 durante 68 horas a 18 °C. Los anticuerpos VHH producidos se capturaron de sobrenadantes clarificados utilizando perlas Ni-NTA (Qiagen) en columnas alimentadas por gravedad. Los anticuerpos eluidos se cambiaron de tamponador a 1x PBS pH 7.4 y se concentraron utilizando concentradores de centrifugación de recorte de 10k (Amicon, Cat. nr. UFC801096D). La proteína VHH purificada se analizó mediante SDS-PAGE para detectar la presencia de cadenas correctas.

Cribado de unión mediante ELISA

Se analizaron clones individuales como VHH purificado para determinar su unión a la toxina NetB a pH 6.0 y pH 7.4 mediante ELISA de unión. Para la ELISA de unión de VHH, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos MaxiSorp™ con alta capacidad de unión a proteínas con 1 µg/ml de toxina NetB, diluida en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH de 7.4 o tamponador citrato-fosfato (CPB) a pH 6.0 durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween al 0,05 % (pH 7.4) y se bloquearon durante 1

hora a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de Marvel/CPB al 4 % o Marvel/PBS al 4 %. Después del bloqueo, las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 0,05 % (pH 7.4) o CPB Tween 0,05 % (pH 6.0) y se incubaron por pocillo con 100 µl de VHH a 180 nM en PBS (pH 7.4) o CPB (pH 6.0), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 0,05 % (pH 7.4) o CPB Tween 0,05 % (pH 6.0) y se incubaron con 50 µl de anticuerpo anti-Strep II (Abcam; Cat. nr. Ab252885) seguido de anticuerpo secundario IgG de cabra anti-rata - HRP (Alpha diagnostic International; cat. nr 50320-200) en PBS (pH 7.4) o CPB (pH 6.0), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween al 0,05 % (pH 7.4) o CPB Tween al 0,05 % (pH 6.0) y se añadió la solución de sustrato (solución TMB) a las placas. La reacción se detuvo con H₂SO₄ y las placas se leyeron en el lector de placas a 450 nm.

Resultados y discusión

La unión del VHH purificado a la toxina NetB se confirmó para muchos clones tanto a pH 7.4 como al pH 6.0, más relevante desde el punto de vista fisiológico, como se demuestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Resumen de datos de unión del VHH purificado mediante ELISA

ID de Clon	VHH ELISA pH 6.0 OD450	VHH ELISA pH 7.4 OD450
Net_07	1.468	0.644
Net_11	1.995	0.747
Net_13	0.912	0.283
Net_14	1.531	0.412
Net_15	1.586	0.737
Net_17	1.344	0.186
Net_30	1.524	0.672
Net_31	0.453	0.314
Net_32	1.162	0.609
Net_38	1.068	0.417
Net_42	1.033	0.511
Net_74	0.993	0.658

Net_80	1.113	0.787
Net_83	1.102	0.756

Ejemplo 3: Ensayo de inhibición de la lisis de chRBC inducida por NetB

Material y métodos:

Expresión y purificación de anticuerpos candidatos VHH

Se llevó a cabo como se describió anteriormente en el Ejemplo 2.

Curva estándar de lisis de célula de glóbulos rojos inducida por

Preparación de células de glóbulos rojos (RBC)

Se lavan 3 ml de sangre de pollo fresca bien resuspendida (TCS Biosciences; Cat # FB011AP) añadiéndola a 25 ml de PBS, se mezcla suavemente y se centrifuga a 500 xg a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante y el pellet se resuspende en 25 ml de PBS antes de otro paso de lavado. Después del segundo paso de lavado, el pellet de RBC se resuspende una vez más en 20 ml de PBS. Se mide la DO595 y se ajusta el volumen para que la DO595 sea = 0,5.

Ensayo de lisis de células de glóbulos rojos inducida por NetB

Se realiza una dilución seriada de la toxina NetB activa en PBS y se agrega 1:1 a los RBCs (como se preparó anteriormente a una DO595 = 0,5). La toxina NetB y los RBCs se incuban a 37 °C durante 30 minutos, agitando. Después de la incubación, la placa se centrifuga a 1100 xg durante 3 minutos. Se retiran 50 ul de cada una de las muestras a una placa de fondo plano adecuada, teniendo cuidado de no alterar el pellet de RBCs. La DO405 de la placa se registra con un espectrofotómetro.

Caracterización de la toxina NetB y determinación de la dosis submáxima (EC80)

La toxina NetB purificada se caracteriza con cada lote fresco de sangre de pollo y antes de realizar los ensayos de inhibición de la lisis. La

respuesta de la concentración se mide para determinar la capacidad de NetB de lisar los glóbulos rojos de pollo (datos no mostrados). La CE80 calculada (20 nM) se utiliza para los ensayos que examinan la inhibición del ensayo de lisis de RBC inducida por NetB por el VHH.

5 **Preparación de VHH para la inhibición de la lisis de células de glóbulos rojos inducida por NetB**

Los VHH se diluyen de 4 μ M a 5,49 nM en diluciones seriadas de 3 veces y se transfieren 17,5 μ L a una placa de ensayo de 96 pocillos con fondo en V. Luego se agregan 17,5 μ L de NetB (diluido en PBS a 4 veces la CE80) a los
 10 pocillos respectivos. Para el control positivo, solo se utilizó NetB. El control negativo no contenía NetB. Los clones NetB y VHH (volumen total de 35 μ L) se incuban en la placa de ensayo durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 35 μ L de RBCs lavados y preparados. La placa de ensayo se sella con un sello adhesivo y luego se incuba a 37 °C durante 30 minutos, agitando (450
 15 rpm). Después de la incubación, la placa se centrifuga a 1100 xg durante 3 minutos y se retiran 50 μ L de cada una de las muestras a una placa de fondo plano adecuada, teniendo cuidado de no alterar el pellet de RBC. La DO405 de la placa se registra con un espectrofotómetro.

Resultados y discusión

20 La figura 1A muestra la curva estándar de la lisis de glóbulos rojos inducida por NetB. La CE50 de la toxina NetB en estos ensayos es de 2 nM. La concentración submáxima de NetB utilizada en estos ensayos es equivalente a la CE80 = 20 nM.

El rango final de concentraciones de VHH utilizado en el ensayo es
 25 de 1 μ M a 1,37 nM. Esto equivale a un rango de 50:1 hasta 0,0685:1 de relación molar (VHH:NetB).

Varios VHH mostraron el potencial de inhibir la actividad de lisis de NetB como se muestra en la Tabla 4.

La Figura 1B muestra las curvas de inhibición de titulación para
 30 varios VHH examinados a pH de 7.4. Varios mostraron una potente inhibición de la lisis inducida por NetB. La CI50 y las relaciones molares se informan en la Tabla 4.

Los VHH también se examinaron a pH 6.0. La CI50 y las relaciones molares se informan en la Tabla 4.

Se puede ver que algunos de los clones VHH muestran ventajosamente una bioactividad mejorada a pH 6.0 en comparación con pH 7.4.

ID de Clon	Bioactividad pH7.4 (IC50, nM)	Bioactividad (Relación molar a NetB @ 20nM)	Bioactividad pH6.0 (IC50, nM)	Bioactividad pH6.0 (Relación molar a NetB @ 20nM)
Net_07	172.30	8.62	31.14	1.56
Net_11	104.90	5.25	38.26	1.91
Net_13	118.50	5.93	264.30	13.22
Net_14	73.96	3.70	32.25	1.61
Net_15	197.90	9.90	418.60	20.93
Net_17	43.38	2.17	55.03	2.75
Net_30	107.40	5.37	121.60	6.08
Net_31	1454.00	72.70	1105.00	55.25
Net_32	457.40	22.87	774.00	38.70
Net_38	246.60	12.33	708.90	35.45
Net_42	400.60	20.03	835.10	41.76
Net_74	259.70	12.99	412.50	20.63
Net_80	121.20	6.06	351.20	17.56
Net_83	137.60	6.88	102.60	5.13

Tabla 4: Inhibición de la lisis de células de glóbulos rojos (RBC) inducida por NetB (pH 7.4 y pH 6.0)

En experimentos posteriores, el ensayo de lisis de chRBC anterior se realizó con Net_14 y Net_83 a una temperatura de 42 °C en lugar de 37 °C para imitar más de cerca la temperatura corporal de un pollo. Los resultados mostraron que NetB muestra una potencia similar a 42 °C y 37 °C y ambos anticuerpos VHH conservan la capacidad de inhibir la actividad de NetB a esta temperatura elevada.

Ejemplo 4: Estabilidad y actividad después de la incubación con

quimotripsina (resistencia a la quimotripsina)

Se examinaron varios candidatos VHH purificados que inhibían la lisis de glóbulos rojos inducida por NetB para determinar su capacidad de resistir las proteasas que se encuentran en el tracto gastrointestinal (GI).

- 5 Los candidatos VHH se incubaron con quimotripsina (1 ug/ml) durante 1 h antes de detener la reacción y se los analizó en un gel SDS-PAGE y se evaluó su capacidad continua para inhibir la lisis de glóbulos rojos inducida por NetB.

Material y métodos

10 Incubación de VHH con quimotripsina

- Los VHH se prepararon a 15 μ M en PBS (excepto cuando los VHH estaban en concentraciones iniciales <15 uM, en cuyo caso se utilizaron a la mayor concentración disponible). Se preparó una concentración de stock de quimotripsina (Sigma Aldrich; cat. n.º 11418467001) a 100 ug/ml en HCl 1 mM
15 añadiendo 250 μ L de HCl 1 mM a un vial que contenía 25 μ g de quimotripsina.

Luego, la quimotripsina se diluyó aún más en PBS hasta una concentración inferior a la de stock de 10 μ g/ml.

- Se añadieron 18 μ L del VHH preparado a tubos de PCR de baja unión a proteínas. Se añadieron 2 μ L de quimotripsina a 10 μ g/mL (o 2 μ L de PBS
20 para los controles) a cada tubo. A continuación, los tubos se centrifugaron durante 15 segundos para garantizar que se añada la quimotripsina al mismo tiempo a todos los tubos.

- A continuación, los tubos de PCR se transfirieron a un bloque térmico durante 1 h a 37 °C para llevar a cabo la digestión antes de detenerlos mediante la
25 adición de 3,3 μ L (7x) de inhibidor de proteasa y transferirlos a hielo.

Gel SDS-PAGE de VHH después de la incubación con quimotripsina

- Se toman 5 μ L de cada muestra de VHH detenida y se añaden a 2 μ L de tamponador de carga SDS de 5x añadido a cada tubo, y los tubos se sellan
30 con un sello de placa adhesivo en hoja. Los tubos se transfieren a un bloque de calor y se incuban a 80 °C durante 10 minutos antes de centrifugarlos para

recoger el evaporado. Las muestras desnaturalizadas se colocan en un gel SDS-PAGE graduado al 4-20 %. Una vez que el gel se ha secado, se tiñe con el reactivo de tinción de Coomassie durante 24 h y luego se destiñe con agua antes de tomar fotografías para evaluar la degradación después de la digestión con quimotripsina.

Ensayo de células de glóbulos rojos inducido por NetB con VHH incubado con quimotripsina

Se toman 10 μ L de cada muestra de VHH detenida y se agregan a 65 μ L de PBS, antes de diluirlos 1 en 3 desde 2 μ M hasta 5,49 nM. Estas diluciones se realizan a una concentración final de 4x para permitir la dilución tras la adición de chRBC y toxina NetB. La NetB se utilizará a la concentración submáxima (EC80) de 20 nM. La concentración final máxima de VHH será de 500 nM = relación molar 25:1 (VHH:NetB), y la concentración más baja será de 1,37 nM = relación molar 0,0685:1 (VHH:NetB).

Los VHH se diluyen desde 2 μ M hasta 5,49 nM en diluciones seriadas de 3 veces y se transfieren 17,5 μ L a una placa de ensayo de 96 pocillos con fondo en V. Luego, se agregan 17,5 μ L de NetB (diluido en PBS a 4X la CE80) a los pocillos respectivos. Para el control positivo, solo se utilizó NetB. El control negativo no contenía NetB. Los clones NetB y VHH (volumen total de 35 μ L) se incuban en la placa de ensayo durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 35 μ L de RBCs lavados y preparados. La placa de ensayo se sella con un sello adhesivo y luego se incuba a 37 °C durante 30 minutos, agitando (450 rpm). Después de la incubación, la placa se centrifuga a 1100 xg durante 3 minutos y se retiran 50 μ L de cada una de las muestras a una placa de fondo plano adecuada, teniendo cuidado de no alterar el pellet de RBC. La OD405 de la placa se registra con un espectrofotómetro.

Resultados y discusión:

Los datos (ver Figura 2A) muestran claramente que, si bien algunos VHH se degradan fácilmente después de la incubación con quimotripsina (a juzgar por la presencia de múltiples bandas de degradación, ver, por ejemplo, Net 11, Net 15, Net 17 y Net 74), algunos permanecen prácticamente intactos y, cuando se

prueban, aún pueden inhibir la lisis de glóbulos rojos inducida por NetB (ver Figura 2B y Tabla 5). En los geles que se muestran en este (y otros ejemplos incluidos), la banda VHH aparece alrededor de los 15 kDa.

Tabla 5: Actividad de VHH después de la incubación con quimotripsina

ID de Clon	IC50 después de la incubación con quimotripsina a 1 ug/mL (nM)
Net_07	204
Net_14	114
Net_30	131
Net_83	195

Ejemplo 5: Estabilidad y actividad después de la incubación con pepsina (resistencia a la pepsina)

Los VHH candidatos se incubaron con pepsina durante un período de tiempo de hasta 45 minutos. Después de la incubación con pepsina, las reacciones se detuvieron y los VHH se analizaron en un gel SDS-PAGE y se evaluó su capacidad continua para inhibir la lisis de glóbulos rojos inducida por NetB.

Material y métodos:

La pepsina (Sigma Aldrich; cat n.º P7125) se preparó a 5 mg/ml (5360 U/ml) en PBS de pH 1.5 (pH reducido a 1.5 utilizando HCl concentrado). La pepsina se diluyó aún más a 300 U/mL en PBS pH 1.5. Para mantener la máxima actividad de la proteasa de pepsina, el pH en el ensayo debe ser inferior a 2.

Todos los VHH se prepararon a 30 uM en 10 uL de PBS pH 7.4 antes de la adición de 8 uL de PBS pH 1.5 para producir 18 uL de VHH a 16.67 uM. A esto se añaden 2 uL de pepsina a 300 U/mL en PBS pH 1.5 para producir una reacción final de: 15 uM de VHH y 30 U/ml de pepsina en PBS a pH 1.8. A continuación, los tubos se centrifugan durante 15 segundos para garantizar que la

pepsina se añade al mismo tiempo a todos los tubos. A continuación, los tubos de PCR se transfieren a un bloque térmico a 37 °C y se retira 1 tubo de cada VHH a los 5, 15, 30 y 45 minutos. Cuando se retiran del bloque de calor, los tubos se transfieren inmediatamente a hielo para detener la digestión, antes de la adición de 1,2 µL de NaOH 0,1 M para llevar el pH de nuevo a 7.4, inactivando la pepsina. Las muestras se almacenan en hielo hasta que se analizan en un gel SDS-PAGE o se utilizan en el ensayo de detección de lisis de chRBC.

Como prueba adicional con clones seleccionados, la preparación de VHH y la incubación con pepsina se realizó como se indicó anteriormente, pero con tiempos de incubación extendidos a 120 minutos, con muestras tomadas a los 5, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.

Gel SDS-PAGE de VHH después de la incubación con pepsina

Se toman 5 µL de cada muestra de VHH detenida y se agregan a 2 µL de tamponador de carga SDS 5x agregado a cada tubo, y los tubos se sellan con un sello de placa adhesivo en hoja. Los tubos se transfieren a un bloque de calor y se incuban a 80 °C durante 10 minutos antes de centrifugarlos para recoger cualquier evaporado. Las muestras desnaturalizadas se colocan en un gel SDS-PAGE graduado al 4-20 %. Una vez que el gel se ha secado, se tiñe con el reactivo de tinción de Coomassie durante 24 h y luego se destiñe con agua antes de tomar fotografías para evaluar la degradación después de la digestión con pepsina.

Ensayo de células de glóbulos rojos inducido por NetB con VHH incubado con pepsina

Se toman 10 µL de cada muestra de VHH detenida y se agregan a 65 µL de PBS, antes de diluirlos 1 en 3 desde 2 µM hasta 5,49 nM. Estas diluciones se realizan a una concentración final de 4x para permitir la dilución tras la adición de chRBC y toxina NetB. La NetB se utilizará a la concentración submáxima (EC80) de 20 nM. La concentración final máxima de VHH será de 500 nM = relación molar 25:1 (VHH:NetB), y la concentración más baja será de 1,37 nM = relación molar 0,0685:1 (VHH:NetB).

Los VHH se diluyen desde 2 µM hasta 5,49 nM en diluciones

seriadas de 3 veces y se transfieren 17,5 uL a una placa de ensayo de 96 pocillos con fondo en V. Luego, se agregan 17,5 uL de NetB (diluido en PBS a 4x la CE80) a los pocillos respectivos. Para el control positivo, solo se utilizó NetB. El control negativo no contenía NetB. Los clones NetB y VHH (volumen total de 35 uL) se incuban en la placa de ensayo durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 35 uL de RBCs lavados y preparados. La placa de ensayo se sella con un sello adhesivo y luego se incuba a 37 °C durante 30 minutos, agitando (450 rpm). Después de la incubación, la placa se centrifuga a 1100 xg durante 3 minutos y se retiran 50 ul de cada una de las muestras a una placa de fondo plano adecuada, teniendo cuidado de no alterar el pellet de RBC. La OD405 se registra para la placa con un espectrofotómetro.

Resultados y discusión:

Los datos muestran claramente que, si bien algunos VHH se degradan fácilmente después de la incubación con pepsina (a juzgar por la presencia de múltiples bandas de degradación y la pérdida de la banda VHH de 15 kDa, ver, por ejemplo, Net 7 y Net 30 en las Figuras 3A y 3B), algunos permanecen prácticamente intactos y aún pueden inhibir la lisis inducida por NetB de las células de glóbulos rojos, incluso después de 120 minutos de incubación con 30 U/ml de pepsina. Por ejemplo, la banda de 15 kDa todavía está presente para Net 83 a los 120 minutos (ver Figura 3C), y 250 nM de Net 83 todavía muestra una inhibición del 35 % de NetB a los 60 y 90 minutos (ver Figura 3D). Net 14 también sigue mostrando una inhibición del 45 % de NetB a los 45 y 60 minutos (ver Figura 3D). Net 7 tiene un rendimiento mucho menor en términos de resistencia a la pepsina. Los valores de CI50 de varios clones en el ensayo de lisis de NetB se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Actividad de VHH después de la incubación con pepsina

ID de Clon	Resistencia a la Pepsina (a partir de gel SDS-PAGE)	Inhibición de la lisis de glóbulos rojos inducida por NetB en varios puntos temporales de incubación con pepsina IC50 (nM)			
		0	5 mins	15 mins	30 mins
Net_07	-	62	497	724	nd
Net_13	++	105	180	459	541
Net_14	++	23	109	124	113
Net_30	+	33	183	624	nd
Net_83	+++	61	179	231	208

Ejemplo 6: Estabilidad y actividad después de la incubación con pancreatina (resistencia a la pancreatina)

Los VHH candidatos se incubaron con concentraciones crecientes de pancreatina durante 30 min, y las muestras se analizaron en gel SDS-PAGE para evaluar la resistencia a la degradación. Un clon seleccionado (Net 83) se incubó adicionalmente con pancreatina durante un período de tiempo. Después de la incubación con pancreatina, las reacciones se analizaron en un gel SDS-PAGE y se evaluó el grado de degradación.

Material y métodos:

Incubación de VHH con diferentes concentraciones de pancreatina

Los VHH se prepararon a una concentración final de 30 μ M incubados con pancreatina (8×especificaciones USP) (Sigma Aldrich; n.º de cat. P7545-25G) a: 0, 0,1, 0,5, 1, 5 mg/ml de concentración final de pancreatina en 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8 + 10 mM de CaCl₂. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, antes de detener la reacción calentándolas (95 °C durante 3 minutos) en un tamponador de carga de SDS. Las muestras se analizaron en un gel con un grupo de control sin VHH para ver el fondo de la pancreatina.

Incubación del clon seleccionado con pancreatina, evolución temporal

La pancreatina se preparó a 25 mg/ml en HCl 1 mM (pH 3.0) y se

colocó en el rodillo durante 90 minutos.

Después de 60 minutos, la pancreatina se diluyó a 1 mg/ml en tamponador de ensayo (50 mM Tris-HCl pH 6.8 + 10 mM CaCl₂) y se mantuvo en hielo. El VHH se diluyó a 15 µM en tamponador de ensayo y se colocó en hielo.

5 Se añadieron pancreatina y VHH en una proporción de 1:1, lo que dio como resultado una concentración final de 0,5 mg/ml de pancreatina y 7,5 µM de Net_83 y los tubos se colocaron en el bloque térmico a 37 °C.

Después de 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, se retiraron 20 µL del tubo, se añadieron 4 µL de tamponador de carga SDS 5 x y las muestras se
10 desnaturalizaron a 99 °C durante 3 minutos antes de congelarlas.

Una vez que todas las muestras se digirieron, desnaturalizaron y congelaron, se analizaron por SDS-PAGE.

Resultados y discusión:

Los datos (ver Figura 4A y Figura 4B) muestran claramente que el
15 VHH seleccionado (Net 83) permanece prácticamente intacto después de la incubación con varias concentraciones de pancreatina, e incluso después de 90 minutos de incubación con 0,5 mg/ml de pancreatina.

Ejemplo 7: Estabilidad de VHH en agua

Material y métodos

Incubación de VHH en agua

Se intercambió el tamponador de VHH en agua y se diluyó a 50 ug/ml (Net_14) o 100 ug/ml (Net_07 y Net_83) en agua y se incubó a temperatura ambiente. En varios puntos de tiempo se tomaron muestras y se congelaron a -80
25 °C hasta la finalización del estudio, cuando las muestras se analizaron en un gel o se analizaron para la inhibición de la lisis de glóbulos rojos inducida por NetB.

Preparación de VHH para la inhibición de la lisis de células de glóbulos rojos inducida por NetB

Los VHH se diluyen de 4 uM a 5,49 nM en diluciones seriadas de 3
30 veces y se transfieren 17,5 uL a una placa de ensayo de 96 pocillos con fondo en V. Luego se agregan 17,5 uL de NetB (diluido en PBS a 4 veces la CE80) a los

pocillos respectivos. Para el control positivo, solo se utilizó NetB. El control negativo no contenía NetB. Los clones NetB y VHH (volumen total de 35 μ L) se incubaron en la placa de ensayo durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 35 μ L de RBCs lavados y preparados. La placa de ensayo se sella con un sello adhesivo y luego se incuba a 37 °C durante 30 minutos, agitando (450 rpm). Después de la incubación, la placa se centrifuga a 1100 xg durante 3 minutos y se retiran 50 μ L de cada una de las muestras a una placa de fondo plano adecuada, teniendo cuidado de no alterar el pellet de RBC. La DO405 se registra para la placa mediante un espectrofotómetro.

Resultados y discusión

Como se puede ver en la Figura 5A, los VHH permanecen inalterados a lo largo del tiempo: la banda de 15 kDa todavía está presente después de 4 días, sin signos significativos de degradación.

La Figura 5B y la Tabla 7 muestran que los VHH no muestran pérdida de potencia a lo largo del tiempo.

Este período de tiempo se extendió hasta los 28 días y aún se observó estabilidad del VHH, incluso en el ensayo funcional NetB.

Tabla 7: Estabilidad del VHH en agua

ID de Clon	IC50 despues de la incubación en agua (nM)		
	Día 0	Día 1	Día 4
Net_14	44.23	52.95	51.1
Net_83	163.4	168.1	244.7

Ejemplo 8: Determinación de la afinidad de VHH por la toxina NetB (KD por Biacore)

Material y métodos:

Se determinó la afinidad de unión para la toxina NetB de Clostridium perfringens por cada uno de los anticuerpos VHH identificados mediante resonancia de plasmón de superficie.

Determinación de KD por Biacore

Para evaluar la afinidad de los clones purificados seleccionados para la toxina NetB, la proteína de la toxina NetB se recubrió mediante acoplamiento de amina en un chip sensor CM5 (Cytiva Cat. nr. 29149603). Se utilizó la resonancia de plasmón de superficie (SPR) (Biacore 8K+, Cytiva) en cinética de ciclo único (SCK) para determinar la cinética de unión de VHH seleccionados a pH 7.4. Se inmovilizaron aproximadamente 350 RU de toxina NetB en tamponador de acetato a pH 5.0 o pH 5.5 en un chip CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina estándar. El control de calidad de la inmovilización se realizó utilizando un anticuerpo comercial anti-histidina (BioLegend; Cat. nr. 652505) a 5 nM y 30 nM diluido en tamponador 1xHBS-EP+ pH 7.4.

Se utilizó 1xHBS-EP pH 7.4 como tamponador de ejecución durante las mediciones cinéticas de unión. Los VHH purificados se inyectaron en diluciones seriadas dobles comenzando con 20 nM hasta 1,3 nM en 1xHBS-EP+ pH 7.4, a 30 μ l/min durante 2 minutos, seguido de un lavado fuera de velocidad durante 1 minuto entre las inyecciones de VHH. El lavado fuera de velocidad final se realizó 5 minutos después de la inyección final de VHH en cada ciclo.

La afinidad y la RU máxima se calcularon utilizando el método de evaluación predefinido Single Cycle Kinetics del software de evaluación Biacore Insight.

Resultados y discusión:

Como se puede observar en la Tabla 8 y la Figura 6, los valores de KD para los VHH seleccionados fueron 0,095 nM para Net14 y 0,213 nM para Net83.

Tabla 8: Resumen de los datos de afinidad de Biacore

VH H	χ^2 (RU ²)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)
Net _14	0.03	6.68E+0 5	6.32E- 05	57	0.095
Net _83	0.05	1.17E+0 6	2.48E- 04	62	0.213

Ejemplo 9: Estudio de eficacia del modelo de enteritis necrótica en pollos

El objetivo del estudio fue investigar la seguridad y eficacia de Net_83 en combinación con un anticuerpo contra la toxina alfa de la enteritis necrótica (CPA) de *C. perfringens* después de la inducción experimental de enteritis necrótica (NE) en pollos de engorde. El anticuerpo contra la CPA era un anticuerpo VHH proporcionado por ECO Animal Health Ltd.

1. Descripción de los grupos

El día 1 del estudio, se asignaron un total de 810 pollitos Ross 308 de un día a corrales de 15 aves cada uno. Los corrales fueron posteriormente asignados aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento: T01 = control no tratado infectado (IUC), T02 = no desafiado no tratado (UUC), T03 = amoxicilina en agua potable durante 5 días, T04 = anticuerpos CPA + Net_83 en agua potable durante 6 días, T05 = NaHCO₃ en agua potable durante 6 días y T06 = anticuerpos CPA + Net_83 en agua con NaHCO₃ durante 6 días. Cada grupo tenía 10 corrales excepto T02 que tenía 4 corrales. Al iniciar el desafío, el número de aves por corral se redujo a 13, lo que resultó en un total de 702 aves incluidas en la evaluación. Todos los grupos excepto T02 fueron desafiados como se describe más adelante. El tratamiento en el agua comenzó el día antes del primer desafío con *C. perfringens*. A continuación, se presenta un resumen de los grupos en la Tabla 9.

Tabla 9: Descripción de los diferentes grupos de tratamiento.

Group	Tratamiento*	Régimen de tratamiento	Vía de administración	No. Total de aves	Replicas (corrales)	Aves por réplica
T01 (IUC)	No	-	-	130	10	13
T02 (UUC)	No	-	-	52	4	13
T03	Amoxicilina (13.1 mg/kg)	d17 to d21 (5d)	<i>ad libitum</i> en agua	130	10	13

T04	CPA+Net_83 (5mg of cada/ave/día)	d17 to d22 (6d)	<i>ad libitum</i> En agua	130	10	13
T05	NaHCO ₃ (0.5g/L)	d17 to d22 (6d)	<i>ad libitum</i> En agua	130	10	13
T06	CPA+Net_83+NaHCO ₃ (5mg de cada VHH/ave/día + 0.5g/L)	d17 to d22 (6d)	<i>ad libitum</i> En agua	130	10	13

*Las aves recibieron el elemento de prueba correspondiente y fueron desafiadas con coccidios y *C. perfringens* (ver la descripción del desafío más abajo).

2. Modelo de enteritis necrótica en pollos

La enteritis necrótica fue inducida por una combinación de factores de predisposición. El día 14 y 16 se administró por sonda una sobredosis de 10 veces la dosis de una vacuna contra *Eimeria* disponible comercialmente (para proporcionar un desafío contra coccidios). El día 17, se cambió el alimento a un alimento de crecimiento con un 30 % de harina de pescado. A partir del día 18, se administró por sonda oral una cepa de *C. perfringens* productora de toxina alfa y NetB-positiva durante cuatro días consecutivos. Se hizo un seguimiento de las aves hasta los 30 días de edad.

Administración del tratamiento

2.1. Viabilidad de la administración de Net_83 en agua

Antes del estudio de eficacia, se evaluó la viabilidad de la administración en agua del anticuerpo Net_83 en un estudio piloto. El objetivo de ese estudio fue evaluar si Net_83 llega al tracto gastrointestinal de las aves cuando se administra en el agua de bebida, ya sea solo (T01-1) o en combinación con NaHCO₃ (T02-1). Cada tratamiento se administró *ad libitum* durante 24 horas a un corral que albergaba 10 aves. Cada corral tenía una línea de agua que imitaba a las de las granjas comerciales. Se recogieron muestras de digesta 24 horas después del inicio de la administración para analizar la presencia de Net_83 en el buche mediante ELISA. El anticuerpo se pudo recuperar de las muestras de buche en cantidades comparables en ambos grupos de tratamiento (Figura 7).

Este estudio demuestra que el anticuerpo es estable en estas

condiciones de administración y que esta es una forma adecuada de administrar el anticuerpo a las aves, ya que la presencia en el buche indica que el anticuerpo llega al tracto digestivo de las aves utilizando este método.

5 **2.2 Administración del tratamiento en el estudio de eficacia**

Los tratamientos se administraron en el agua potable ofrecida *ad libitum*.

A las aves del estudio T03 se les administró una formulación soluble en agua disponible comercialmente de amoxicilina en el agua potable. La dosis
10 objetivo fue de 13,1 mg de amoxicilina por kg de peso corporal durante 5 días consecutivos, según la recomendación de la etiqueta. El tratamiento con amoxicilina se administró de manera preventiva comenzando 1 día antes de la exposición a *C. perfringens* y continuó durante cinco días (días de estudio 17, 18, 19, 20 y 21).

15 Las aves en T04 y T06 recibieron agua suplementada con una combinación de anticuerpos Net_14 y CPA en la misma concentración. Este tratamiento de agua se proporcionó desde el día 17 al día 22 a una tasa de dosis de 5 mg/ave/día para cada anticuerpo. Los anticuerpos se mezclaron en el agua que consumiría un corral en un día de la siguiente manera:

20 1. Los viales que contenían los anticuerpos CPA y Net_83 se homogeneizaron suavemente invirtiéndolos.

2. El contenido de cada vial se mezcló con el volumen de agua agregado al corral correspondiente para ese día.

25 Los anticuerpos Net_83 y CPA se suministraron como una solución lista para usar para mezclar en el agua potable.

El agua se preparó diariamente por corral utilizando agua del grifo. Para T06, se preparó una solución en stock de agua con 0,5 g/L de bicarbonato de sodio antes de agregar los anticuerpos. La cantidad de agua que se debía agregar se basó en la ingesta diaria de agua (DWI) esperada. La cantidad se
30 calculó para cada corral en función de la cantidad de aves en ese corral y la ingesta diaria de alimento de acuerdo con los estándares Ross308 2018. Se

asumió que la ingesta de agua de las aves es el doble de la ingesta de alimento. La concentración objetivo de cada anticuerpo en el agua (mg/mL) para lograr una dosis de 5 mg/ave se calculó teniendo en cuenta esta ingesta de agua estimada.

3. Evaluación de eficacia

5 La variable principal fue la mortalidad relacionada con NE.

El desafío de enteritis necrótica fue exitoso, como lo confirmó la alta mortalidad relacionada con NE en el T01 (IUC) (79%). Esta mortalidad fue mayor a la esperada, lo que resultó en un bajo poder estadístico. Los análisis de supervivencia iniciales mostraron que ambos grupos tratados con anticuerpos (T04 y T06) tuvieron un desempeño muy similar (Figura 8). Los análisis también mostraron que el NaHCO_3 no tuvo efecto sobre la mortalidad y podría considerarse un placebo (Figura 8). Debido a que no se observó ningún efecto del NaHCO_3 sobre la mortalidad, y con el fin de aumentar el poder estadístico, se realizaron análisis adicionales sobre los datos agrupados de los grupos T01 (IUC) y T05 (NaHCO_3) (aves no tratadas) en comparación con los datos agrupados de los grupos tratados con anticuerpos (T04 y T06).

Los análisis de supervivencia sobre los datos agrupados mostraron una reducción significativa en la probabilidad de muerte (71%) para las aves tratadas con anticuerpos en comparación con las aves no tratadas (77%; $P = 0,038$; Figura 9).

Debido a la gravedad del desafío, varios corrales perdieron todas las aves. Se realizó un análisis de supervivencia adicional para comparar la probabilidad de que un corral perdiera todas las aves en los grupos tratados y no tratados. Los análisis de los datos agrupados mostraron que la cantidad de corrales que perdieron todas las aves debido a la NE fue menor en las aves tratadas con anticuerpos en comparación con los datos agrupados de los grupos IUC y NaHCO_3 (45 % frente a 75 %; $P = 0,048$; Figura 10). Esto es una indicación de que en el campo, las unidades tratadas con estos VHH se verán menos afectadas por la NE.

30 No se reportaron eventos adversos relacionados con los productos administrados.

En conclusión, la mortalidad por NE inducida en este estudio fue mayor de lo esperado y el poder estadístico fue bajo. Además, el desafío severo resultó en una reducción del consumo de agua y no se alcanzó la dosis de anticuerpos objetivo en algunos días de tratamiento. No obstante, los análisis adicionales realizados sobre los datos agrupados mostraron que, incluso en estas condiciones de desafío severas (que se espera que sean mucho más severas que las condiciones observadas en el campo cuando las aves están expuestas naturalmente a estos patógenos que inducen NE), la combinación de anticuerpos Net_83 + CPA logró una reducción estadística de la mortalidad en comparación con las aves no tratadas.

Ejemplo 10: Expresión de Net_83 y Net_14 en *Bacillus subtilis* como vector para administración oral

La cepa de *Bacillus subtilis* (PY79, obtenida de Bacillus Genetic Stock Center, BGSID No: 1A747) fue modificada genéticamente para expresar ya sea Net_14 o Net_83. Para cada constructo, el anticuerpo se clonó en el locus amyE de PY79 con un marcador de selección de resistencia al cloranfenicol (Cm) como se describe en otra parte (Yang et al., 2020). Los sobrenadantes de cultivo bacteriano se recolectaron y se sometieron a ELISA para confirmar la expresión del anticuerpo de unión como se describe a continuación.

Brevemente, la toxina NetB-His se recubrió en una placa Maxisorp a 2 µg/ml en PBS 1x, 4°C, O/N. La placa recubierta se bloqueó con leche desnatada al 4% en PBS 1x, 1 h, RT. El sobrenadante de tres clones de *Bacillus subtilis* que expresaban Net_14, tres que expresaban Net_83 y dos que expresaban un clon VHH irrelevante (anti-JTT) se tituló realizando diluciones seriadas de 7 pasos, comenzando con una dilución 1:2 en leche desnatada al 1 % en PBS de 1x.

Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo anti-VHH de cabra (Jackson ImmunoResearch, cat. No. 128-005-230) a una dilución 1:500 en leche desnatada al 1 % en PBS de 1x.

El anticuerpo anti-cabra-HRP de burro (Jackson ImmunoResearch, cat. nr. 705-035-147) a una dilución de 1:5000 en leche desnatada al 1% en PBS de 1x, se utilizó como detección secundaria.

El control del recubrimiento se realizó con Anti-Histidina-HRP (Miltenyi Biotec, cat. nr. 130-092-783) a una dilución de 1:500 en leche desnatada al 1% en PBS de 1x.

La unión a NetB-His se evaluó midiendo la D.O. a 450 nm

5 **Resultados y conclusiones:**

El sobrenadante de los tres clones de *B. subtilis*, que expresan Net_14, mostró una unión positiva a la toxina NetB hasta una dilución de 1:100000 (Figura 11), y cada sobrenadante debería contener entre 15 y 19 µg/mL de Net_14 VHH.

10 El sobrenadante de los tres clones de *B. subtilis*, que expresan Net_83, mostró una unión positiva a la toxina NetB desde una dilución de 1:2 a 1:1000 (Figura 12), y cada sobrenadante debería contener ~4 µg/mL de anticuerpo Net_83.

15 Se puede concluir que *B. subtilis* es un vector apropiado para los anticuerpos Net_14 y Net_83, ya que se puede utilizar para expresar anticuerpos funcionales en el sobrenadante que se unen a la toxina NetB objetivo. En otros experimentos, también se ha demostrado que estos anticuerpos secretados por *B. subtilis* conservan la función de inhibir la lisis de chRBC inducida por NetB.

20 **Referencia:**

Yang M, Zhu G, Korza G, Sun X, Setlow P, Li J. 2020. Ingeniería de *Bacillus subtilis* como una plataforma versátil y estable para la producción de nanocuerpos. *Appl Environ Microbiol* 86:e02938-19.