

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 827**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2014** **PCT/AU2014/000447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014** **WO14169344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2014** **E 14784945 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2023** **EP 2986316**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile***

30 Prioridad:

19.04.2013 AU 2013901386

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2023

73 Titular/es:

**IMMURON LIMITED (100.0%)
Unit 10, 25-37 Chapman Street
Blackburn North, Victoria 3130, AU**

72 Inventor/es:

**LYRAS, DENA;
HUTTON, MELANIE;
CUNNINGHAM, BLISS;
LI, LUCY;
CARTER, GLEN y
ROOD, JULIAN**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 940 827 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*

5 **Sector técnico**

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (CDAD, *Clostridium difficile* associated disease). En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* y son capaces de inhibir la infección por *C. difficile*, como mínimo, un síntoma de la enfermedad asociada a *C. difficile*, excreción de *C. difficile* y mortalidad asociada a *C. difficile*.

Estado de la técnica anterior

15 *C. difficile* es una bacteria anaeróbica grampositiva que es una de las causas más importantes de diarrea asociada a antibióticos en el mundo desarrollado, lo que conduce a una morbilidad y mortalidad significativas y representa una carga económica considerable para los sistemas sanitarios. La ocurrencia de diarrea en pacientes hospitalizados que reciben antibióticos oscila entre el 3 % y el 29 %. *C. difficile* ha sido implicado como el organismo causante en el 10-25 % de los pacientes con diarrea asociada a antibióticos, el 50-75 % de aquellos con colitis asociada a antibióticos y el 90-100 % de aquellos con colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos.

El organismo provoca una serie de enfermedades intestinales denominadas colectivamente infecciones por *C. difficile* (CDI, *C. difficile* infections) o enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD). Esta enfermedad puede variar desde una diarrea autolimitante leve hasta una diarrea moderadamente grave que puede provocar complicaciones más graves, incluyendo colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico, que es mortal en, aproximadamente, un tercio de los pacientes afectados. A diferencia de otros patógenos entéricos, la enfermedad casi siempre se asocia a la terapia antimicrobiana o una alteración de la microbiota gastrointestinal endógena. La mortalidad de la enfermedad asociada a *C. difficile* oscila entre el 6 % y el 30 % cuando se demuestra la presencia de colitis pseudomembranosa y es considerable incluso en ausencia de colitis.

Aunque la CDAD ha sido un problema continuo en los hospitales desde la introducción de los antibióticos, ha habido un aumento asombroso en la tasa y prevalencia de CDI en la última década, lo que ha dado como resultado grandes epidemias en muchas partes del mundo, incluido el Reino Unido, EE. UU., Canadá y Europa continental. Además, la proporción de pacientes con enfermedad grave, refractaria o recurrente ha aumentado en la última década.

Estas epidemias mundiales se deben en gran medida a la aparición de cepas de mayor virulencia, o aislados "hipervirulentos", pertenecientes a la categoría BI/NAP1/027. Estas cepas son resistentes a las fluoroquinolonas y se asocian a enfermedades más graves y tasas de mortalidad más elevadas. Ahora, *C. difficile* provoca también enfermedad en personas que antes no estaban en riesgo, tales como niños y mujeres embarazadas, y la enfermedad por *C. difficile* asociada a la comunidad es cada vez más común.

Históricamente, el tratamiento de la CDAD ha implicado la utilización de vancomicina, metronidazol y una combinación de vancomicina y metronidazol; sin embargo, ha habido fallos notables en el tratamiento y recurrencias en una gran cantidad de estudios publicados sobre la eficacia de los antibióticos.

Es importante destacar que la CDAD reaparece después del tratamiento en el 8-50 % de los casos.

Por consiguiente, quedaban problemas significativos por superar en el diseño de un tratamiento eficaz para la enfermedad asociada a *C. difficile*. Es un aspecto de la presente invención el dar a conocer composiciones para la prevención y el tratamiento de la CDAD.

Van Dissel Jaap T et al (J. Med. Microbiol., vol. 54, n° 2, 1 de febrero de 2005, páginas 197-205) da a conocer la utilización del suero de leche enriquecido con anticuerpos bovinos (Immune WPC-40) en el tratamiento de la diarrea asociada a *C. difficile*. Mattila et al (Scandinavian Journal of Infectious Diseases, vol. 40, n° 9, 8 de enero de 2008, páginas 702-708) enseña la utilización de suero inmune a *C. difficile* (CDIW, *C. difficile* immune whey) en el tratamiento de diarrea asociada a *C. difficile* recurrente de leve a moderada (CDAD).

Características de la invención

La presente invención da a conocer una composición que comprende anticuerpos de mamíferos para su utilización en el tratamiento y/o la profilaxis de, como mínimo, un síntoma de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*, en la que los anticuerpos comprenden: a) anticuerpos que se unen a la toxina B de *Clostridium difficile*; y b) anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile*, y/o anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile*.

Los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende toxina B de la cepa 630 de *Clostridium difficile*.

5 En una realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* se unen a una toxina B de una segunda cepa de *Clostridium difficile*.

10 Los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende células vegetativas de una cepa KI de *Clostridium difficile*. Los anticuerpos se unen a SlpA.

10 En una realización, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* de una segunda cepa de *Clostridium difficile*.

15 Los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende endosporas de una cepa KI de *Clostridium difficile*. En una realización, los anticuerpos se unen a proteínas de exosporio.

20 En una realización adicional, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* de una segunda cepa de *Clostridium difficile*.

Los anticuerpos se derivan a partir de calostro hiperinmune bovino.

25 En una realización, el material hiperinmune se prepara mediante la vacunación de un primer grupo de uno o más mamíferos con una vacuna que comprende la toxina B de *Clostridium difficile*, la vacunación de un segundo grupo de uno o más mamíferos con una vacuna que comprende células vegetativas de *Clostridium difficile* y la vacunación de un tercer grupo de uno o más mamíferos con una vacuna que comprende endosporas de *Clostridium difficile* y la mezcla posterior del material hiperinmune procedente de los grupos.

30 La composición se formula para administración oral.

35 En una realización, la composición se formula para la administración a una dosis de, aproximadamente, 30 mg a, aproximadamente, 10000 mg por día, o se formula para la administración a una dosis de, aproximadamente, 1800 mg por día.

La composición se puede administrar a una dosis de, aproximadamente, 30 mg a, aproximadamente, 10000 mg por día, o se puede administrar a una dosis de, aproximadamente, 1800 mg por día.

40 La composición se puede administrar antes de que aumente el riesgo de contraer la infección por *C. difficile*. Además, la composición se puede administrar antes del ingreso en un hospital o en una residencia de ancianos. La composición se puede administrar durante, como mínimo, 3 días antes de un mayor riesgo de adquirir una infección por *C. difficile*, como mínimo, 5 días antes de un mayor riesgo de adquirir una infección por *C. difficile* o, como mínimo, 7 días antes de un mayor riesgo de adquirir la infección por *C. difficile*.

45 En otra realización el, como mínimo, un síntoma de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* se selecciona entre el grupo que consiste en diarrea, dolor abdominal, fiebre, pérdida de apetito, colitis pseudomembranosa, megacolon citotóxico, colonización por *C. difficile*, pérdida de peso, citotoxicidad, daño gastrointestinal, cambio histopatológico en el tracto gastrointestinal, excreción fecal de esporas de *C. difficile* y mortalidad asociada a *C. difficile*.

50 En el presente documento, una referencia a un documento de patente u otro asunto que se da como estado de la técnica anterior no se debe tomar como una admisión de que el documento o asunto era conocido o que la información que contiene era parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones. En la presente memoria descriptiva, las referencias a los procedimientos de tratamiento mediante terapia o cirugía o a procedimientos de diagnóstico *in vivo* se deben interpretar como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su utilización en dichos procedimientos.

60 Descripción breve de los dibujos

Figura 1: La infección de ratones con endosporas de *C. difficile* da como resultado enfermedad asociada a *C. difficile*.

65 Los resultados muestran pérdida de peso en grupos de tres ratones C57/BL6 infectados por vía oral con 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 endosporas generadas a partir de la cepa KI de *C. difficile*. Los ratones mostraron enfermedad

asociada a *C. difficile*, medida mediante la pérdida de peso después de la infección.

Figura 2: La infección de ratones con endosporas de *C. difficile* da como resultado la colonización con *C. difficile* y la excreción fecal de *C. difficile*.

Los resultados muestran la excreción fecal de esporas de *C. difficile* en grupos de tres ratones C57/BL6 infectados por vía oral con 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 endosporas generadas a partir de la cepa KI de *C. difficile*. Los ratones mostraron una colonización medible, medida por excreción fecal, después de la infección.

Figura 3: La infección de ratones con endosporas de *C. difficile* produce daño gastrointestinal en el ciego y el colon durante la infección.

Los resultados muestran un cambio histopatológico en el ciego y el colon de ratones C57/BL6 48 horas después de la infección con 10^3 endosporas generadas a partir de la cepa KI de *C. difficile*. A - Colon de ratón de control no infectado; B - Colon de ratón de ratón infectado con 10^3 de esporas; C - Ciego de ratón de control no infectado; D - Ciego de ratón de ratón infectado con 10^3 de esporas. Los tejidos se tiñeron con PAS/azul alcian. Se demostró daño histopatológico en el ciego y el colon 48 horas después de la infección.

Figura 4: Detección de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en calostro hiperinmune bovino y demostración de que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* de una primera cepa se unen a la toxina B de una segunda cepa.

Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B. A - El calostro no inmune no contiene anticuerpos que se unen a la toxina A histórica purificada comercial (toxina A-Hist), a la toxina B histórica purificada (toxina B-Hist) o la toxina B de la cepa 027 hipervirulenta purificada (toxina B-HV); B - El calostro derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B histórica purificada (toxina B-Hist) y a la toxina B de la cepa 027 hipervirulenta (toxina B-HV), pero no a la toxina A.

Los resultados también muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de diferentes cepas de *C. difficile*. C - El calostro no inmune no contiene anticuerpos que se unen a la toxina A histórica purificada comercial (toxina A-Hist), a la toxina B histórica purificada (toxina B-Hist) o a la toxina B de la cepa 027 hipervirulenta purificada (toxina B-HV); D - El calostro derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B histórica purificada (toxina B-Hist) y a la toxina B de la cepa 027 hipervirulenta (toxina B-HV), pero no a la toxina A.

Figura 5: Los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* neutralizan la citotoxicidad de la toxina B en las células, y demostración de que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* de una primera cepa neutralizan la citotoxicidad de la toxina B de una segunda cepa.

Los resultados muestran microfotografías tomadas de células Vero después de la exposición a la toxina con o sin incubación previa con anticuerpos IgG de calostro. El panel A muestra células Vero no expuestas a TcdB-HV; B, células Vero expuestas a TcdB-HV; C, células Vero que se expusieron a la toxina que se había incubado anteriormente con IgG purificada de calostro no inmune; D, células Vero que fueron expuestas a la toxina que había sido preincubada con anticuerpos de calostro frente a toxina B de 630 y E, células Vero que fueron expuestas a la toxina que había sido preincubada con anticuerpos comerciales anti-toxina B; la muerte celular se observa por el redondeo celular. Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a e inhiben la citotoxicidad de la toxina B. Los resultados también muestran que el calostro derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a e inhiben la citotoxicidad de la toxina B de una cepa 027 hipervirulenta.

Figura 6. Detección de la concentración total de IgG en calostro hiperinmune bovino preparado con una vacuna de toxina B recombinante y detección de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en calostro hiperinmune bovino preparado utilizando una vacuna de toxina B recombinante.

A. Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B recombinante de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos IgG. Se preparó calostro de una vaca no inmune (n.º 7017), así como calostro de las vacas n.º 7009, n.º 7010 y n.º 7028b (todas con toxina B recombinante de la cepa 630 de *C. difficile*) y se determinó la concentración total de IgG en cada muestra mediante ELISA de IgG. Los resultados muestran la concentración de IgG (en mg) por 1 g de polvo de calostro bovino. Los resultados muestran que el calostro no inmune (vaca n.º 7017) tiene una concentración de IgG de 365 mg/g, mientras que las vacas n.º 7009, n.º 7028b y n.º 7010 tienen concentraciones totales de IgG de 199 mg/g, 253 mg/g y 415 mg/g, respectivamente. B. Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con la toxina B recombinante de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B recombinante de 630 de *C. difficile*. Se preparó el calostro de una vaca no inmune (n.º 7017), así como calostro de las vacas n.º 7009, n.º 7010 y n.º 7028b

(todas con toxina B recombinante de la cepa 630 de *C. difficile*) y se confirmó la presencia de anticuerpos anti-toxina B específicos mediante ELISA. Para ello, los pocillos se recubrieron con 1 µg/ml de toxina B recombinante/pocillo y se incubaron con diluciones en serie de 4 veces (a partir de una dilución de 1:1000 de calostro de calostro no inmune o de toxina B). Los resultados muestran que el título de anticuerpos para el calostro no inmune fue inferior a 4000, el título de anticuerpos para la vaca n.º 7028b fue de 64.000 y los títulos para los lotes de calostro de la vaca n.º 7009 y n.º 7010 fueron superiores a 256.000. Los resultados muestran que el calostro derivado de vacas vacunadas con la toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B.

Figura 7: La administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* es eficaz para prevenir la pérdida de peso asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho de 6-7 semanas de edad con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro no inmune o toxina B (en el agua potable) durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 esporas/ratón). Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso y la supervivencia. Se agrupan los datos de tres ensayos independientes con ratones. N = 14 ratones/grupo. Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con la toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que son eficaces en el tratamiento de la pérdida de peso asociada con la infección por *C. difficile*. Los resultados también muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con la toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que son altamente eficaces para prevenir la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Figura 8: La administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino es eficaz para prevenir el daño gastrointestinal asociado a *C. difficile*.

Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con la toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que son eficaces en el tratamiento del daño histopatológico asociado con la infección por *C. difficile*. Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro no inmune o toxina B (en el agua potable) durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 esporas/ratón). Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se recogieron y analizaron el colon y el ciego de los ratones para determinar el daño histopatológico. Se agrupan los datos de tres ensayos independientes con ratones. N ≥ 14 ratones/grupo. Se muestran imágenes representativas de secciones de tejido teñidas con PAS/azul alcian. Los resultados demuestran que los ratones que recibieron calostro no inmune mostraron tejido colónico gravemente dañado en comparación con los ratones que recibieron anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino antes de la infección o los ratones de control no infectados (PBS). Estos resultados indican que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino son eficaces para neutralizar la actividad de la toxina B *in vivo*, previniendo de este modo el daño al tracto gastrointestinal de los ratones pretratados.

Figura 9: Detección de anticuerpos que se unen a endosporas de *C. difficile* en calostro hiperinmune bovino preparado utilizando una vacuna de endosporas.

Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile*. Se preparó calostro de la vaca n.º 7003 (espora de KI) y se confirmó mediante ELISA la presencia de anticuerpos anti-endospora específicos. Para ello, los pocillos se recubrieron con 10^4 endosporas de KI/pocillo y se incubaron con diluciones en serie de 4 veces (a partir de una dilución 1:250 de calostro de calostro no inmune o de esporas de KI). Los resultados muestran que el título de anticuerpos para el calostro de esporas de KI fue superior a 256.000.

Figura 10: Detección de anticuerpos que se unen a endosporas de *C. difficile* y anticuerpos que se unen a proteínas de exosporio de *C. difficile*.

Se examinó la capacidad para unirse a las proteínas de exosporio de KI del calostro derivado de vacas vacunadas con endosporas de KI. Se extrajo el exosporio de la cepa KI, se fraccionó utilizando SDS-PAGE, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y posteriormente se sondó con calostro de una vaca no inmunizada o una vaca vacunada con endosporas de KI. La figura 4 muestra que el calostro de la vaca vacunada contenía anticuerpos que podían unirse a las proteínas de exosporio de las endosporas de KI de *C. difficile* (figura 4B). Por el contrario, no hubo anticuerpos en el calostro no inmune capaces de unirse a las proteínas del exosporio, lo que sugiere que el calostro de la espora de KI contiene anticuerpos específicos para la superficie de la espora de KI. Estos resultados también muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a las proteínas de exosporio de *C. difficile*.

Figura 11: La administración de anticuerpos que se unen a endosporas de *C. difficile* es eficaz para la prevención de la pérdida de peso asociada a *C. difficile*, la mortalidad asociada a *C. difficile*, la colonización por *C. difficile* y la excreción de esporas de *C. difficile*.

5 Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro no inmune o con esporas de KI (en el agua potable) durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^5 esporas/ratón). Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso, la supervivencia y la excreción de esporas en las heces. N = 5 ratones/grupo. Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que son eficaces en el tratamiento de la pérdida de peso asociada con la infección por *C. difficile* y son altamente eficaces en la prevención de la mortalidad asociada a *C. difficile*. Los resultados también muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que son altamente eficaces para inhibir la colonización de ratones por *C. difficile* a las 24 horas y reducir el número de esporas de *C. difficile* en las heces.

Figura 12: Detección de anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* en suero bovino.

20 Los resultados muestran que el suero derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a las células vegetativas de *C. difficile*. La presencia de anticuerpos anti-células vegetativas específicos fue confirmada por ELISA. Cada pocillo se recubrió con 1×10^6 de células de KI y se incubó con diluciones en serie de 4 veces (a partir de una dilución de suero 1:50) de suero de tercer sangrado n.º 7006. Se determinó que el título de anticuerpos para este suero era de 64.000.

25 **Figura 13: Detección de anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* y demostración de que los anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* de una primera cepa se unen a células vegetativas de una segunda cepa.**

30 Los resultados muestran que el suero derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de *C. difficile* se une a las células vegetativas de *C. difficile*. Los resultados también muestran que el suero derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de *C. difficile* se une a células vegetativas de *C. difficile* de diferentes cepas de *C. difficile*. En primer lugar, se realizó inmunotransferencia para detectar anticuerpos dirigidos contra células vegetativas de *C. difficile*. Los lisados de células enteras de KI (la cepa contra la que se generaron los anticuerpos), así como otros aislados humanos y animales de *C. difficile* clínicamente relevantes, se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12 %. Después de la transferencia a nitrocelulosa, las membranas se sondaron con el sangrado previo o con el tercer sangrado (1:10.000) de la vaca n.º 7006. Se detectaron anticuerpos contra proteínas bacterianas de KI. Además, los anticuerpos generados contra esta cepa hipervirulenta mostraron reacción cruzada con diversos aislados de *C. difficile* diferentes. Los carriles en A y B son los siguientes: 1. escala, 2. KI, 3. JGS6133, 4. AI35, 5. CD71, 6. VPI10463, 7. SP, 8. CD37, 9. CD84, 10. CD39, 11. M322630, 12. M322832, 13. CD63, 14. FW07/06, 15. JIR8078.

40 **Figura 14: Detección de anticuerpos que se unen a proteínas de la capa S de *C. difficile* en calostro hiperinmune bovino.**

45 Para identificar las bandas de proteínas dominantes de la figura 13, se escindieron dos bandas de, aproximadamente, 49 kDa y 35 kDa de KI de un gel de SDS-PAGE y se enviaron a APAF para análisis nanoLC ESI MS/MS 1D. Estas bandas se identificaron como los componentes de alto y bajo peso molecular de SlpA, la proteína principal ubicada en la capa S de *C. difficile*. La figura 14 muestra inmunotransferencias que utilizan SlpA extraída de KI (figura 14A) para confirmar que los anticuerpos son contra las proteínas de la capa S. La identificación de estas proteínas ha sido confirmada por espectrometría de masas de bandas escindidas de un gel de SDS-PAGE cargado con preparaciones de capa S (SLP). Los carriles en el panel A (Vaca n.º 7006, sangrado previo) son los siguientes; 1. escala, 2. SLP de la cepa KI de *C. difficile*. Los carriles en el panel B (Vaca n.º 7006, tercer sangrado) son los siguientes; 1. escala, 2. en blanco (contiene desbordamiento del carril 3 y 3. SLP de la cepa KI de *C. difficile*).

55 **Figura 15: La administración de anticuerpos que se unen a las células vegetativas de *C. difficile* es eficaz para la prevención de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile*.**

60 Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que son eficaces en el tratamiento de la pérdida de peso asociada con la infección por *C. difficile* y son altamente eficaces en la prevención de la mortalidad asociada a *C. difficile*. Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro no inmune o de células vegetativas n.º 7006 (en el agua potable) durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^5 esporas/ratón). Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso, la supervivencia y la excreción de esporas/células vegetativas. Los datos siguientes se agrupan a partir de dos ensayos independientes con ratones. N=10 ratones/grupo. Los ratones que recibieron calostro específico de células vegetativas mostraron una pérdida de peso retrasada y una mayor supervivencia (40 %) en comparación con los

ratones que recibieron calostro no inmune. Los ratones que recibieron calostro no inmune perdieron peso rápidamente y sucumbieron a la infección a las 36 horas.

Figura 16: Detección de anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* en calostro hiperinmune bovino.

Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile*. La presencia de anticuerpos anti-células vegetativas específicos fue confirmada por ELISA. Los títulos de anticuerpos del calostro para la vaca n.º 7028 y la vaca n.º 7029 son 16.000-64.000 y 256.000 respectivamente.

Figura 17: La administración de combinaciones de anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* es eficaz para la prevención de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con diferentes antígenos derivados de *C. difficile* comprende anticuerpos que son eficaces en el tratamiento de la pérdida de peso asociada con la infección por *C. difficile* y son altamente eficaces en la prevención de la mortalidad asociada a *C. difficile*. Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro de toxina B no inmune o una combinación de calostro de toxina B, esporas y células vegetativas (1:1:1) en el agua potable durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 esporas/ratón). Los ratones se mantuvieron con calostro durante el ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso y la morbilidad. Los datos se agrupan a partir de, como mínimo, dos ensayos independientes con ratones. $N \geq 10$ ratones/grupo. Los resultados demuestran que los ratones no infectados (PBS) no pierden peso y sobreviven la duración del ensayo. Los ratones que no recibieron calostro o calostro no inmune mostraron una pérdida de peso severa y mortalidad. Los ratones que recibieron calostro de células vegetativas mostraron una pérdida de peso y un 20 % de supervivencia. Los ratones que recibieron calostro de esporas mostraron una menor pérdida de peso y un 40 % de supervivencia. Los ratones que recibieron calostro con toxina B mostraron una menor pérdida de peso y un 80 % de supervivencia. Los ratones que recibieron la combinación de calostro de células vegetativas y toxina B (1:1) y la combinación de calostro de esporas y toxina B (1:1) mostraron una pérdida de peso severa y mortalidad. Los ratones que recibieron una combinación de calostro de células vegetativas, esporas y toxina B (1:1:1) mostraron una menor pérdida de peso y un 70 % de supervivencia. Estos resultados indican que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* solos o una combinación de antígenos de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino son eficaces para neutralizar la actividad de la toxina B *in vivo* y de otros antígenos, evitando de este modo daños en el tracto gastrointestinal de ratones pretratados.

Figura 18: La administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino reduce el daño gastrointestinal asociado a *C. difficile*.

Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con la toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que son eficaces para detener el daño histopatológico asociado con la infección por *C. difficile*. Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A continuación, los ratones se infectaron con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 esporas/ratón). 6 horas después de la infección, a los ratones se les administraron 200 µl de calostro no inmune o con toxina B o 100 µl de vancomicina (6 mg/ml) mediante sonda oral. Después de la sonda oral, se administró diariamente calostro (10 % p/v) o vancomicina (0,4 mg/ml) frescos en las botellas de agua donde los ratones podían beber *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se recogieron y analizaron el colon y el ciego de los ratones para determinar el daño histopatológico. Se muestran imágenes representativas de secciones de tejido colónico teñidas con PAS/azul alcian. Los resultados demuestran que los ratones que recibieron calostro no inmune mostraron tejido colónico gravemente dañado en comparación con los ratones que recibieron anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino después de la infección, o los ratones de control no infectados (PBS). Estos resultados también muestran que los ratones que recibieron una combinación de calostro (toxina B, células vegetativas y endospora en una proporción de 1:1:1) después de la infección y sobrevivieron a la infección mostraron colonos más sanos, y el 70 % de los ratones tratados mostraron prevención de daño al tracto GI respecto a aquellos que recibieron la combinación y no sobrevivieron.

Figura 19: La administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* es eficaz para el tratamiento de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Los resultados muestran que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B recombinante derivada de *C. difficile* comprende anticuerpos que son eficaces en el tratamiento de la pérdida de peso asociada con la infección por *C. difficile* y son altamente eficaces en la prevención de la mortalidad asociada a *C. difficile*. Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. Los ratones se infectaron con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 esporas/ratón). 6 horas después de la infección; a los ratones se les administró una sonda oral de 200 µl de calostro no inmune, calostro con toxina B o 100 µl de vancomicina. Después de la administración por sonda oral de tratamientos específicos, los ratones

recibieron estos tratamientos en agua potable durante la duración del ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso y la supervivencia. Los resultados demuestran que los ratones tratados con calostro no inmune mostraron una severa pérdida de peso y morbilidad, al igual que los ratones que no recibieron tratamiento. Los ratones que fueron tratados con anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino después de la infección mostraron una menor pérdida de peso y una marcada recuperación y, por tanto, los resultados muestran que los anticuerpos contra la toxina B detuvieron la mortalidad asociada a *C. difficile*. Este resultado fue similar al observado con ratones que fueron tratados con el antibiótico de control de vancomicina. Estos resultados muestran que la administración de calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con diferentes antígenos derivados de *C. difficile* después de la infección es eficaz en el tratamiento de la pérdida de peso asociada con la infección por *C. difficile* y es altamente eficaz en la prevención de la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Descripción detallada

El trabajo anterior que caracteriza los factores de virulencia de *C. difficile* se ha centrado en dos miembros de la gran familia de citotoxinas clostridiales, conocidas como toxina A (TcdA) y toxina B (TcdB), que se consideran los principales factores de virulencia de *C. difficile*. Ambas son toxinas potentes y causan inflamación colónica extensa y daño del tejido epitelial en el huésped infectado. El efecto neto es una pérdida rápida de líquido hacia la luz intestinal, que se manifiesta como diarrea. Además de las principales toxinas, *C. difficile* puede producir otros factores de virulencia putativos, incluida una tercera toxina conocida como toxina binaria CDT, fimbrias, producción de paracresol, la proteína de unión a fibronectina FbpA, la cisteína proteasa Cwp84, las adhesinas putativas Cwp66 y CwpV, y la capa S SlpA. Sin embargo, queda por determinar la función precisa, si la hay, que desempeñan estos factores en la virulencia de *C. difficile*. Estudios recientes han demostrado que los flagelos mutantes construidos en la cepa 630Δerm demostraron una mayor adherencia a las células Caco-2, lo que sugiere que los flagelos no contribuyen a la adherencia de las células epiteliales. Estas cepas también fueron más virulentas en hámsteres en comparación con la cepa de tipo silvestre, lo que sugiere que no se requieren flagelos para la virulencia o que la represión de la motilidad puede ser una estrategia patógena empleada por *C. difficile* en hámsteres.

Aunque la mayoría de las cepas de *C. difficile* producen tanto la toxina A como la toxina B, durante muchos años se ha pensado que la toxina A era el principal factor de virulencia sobre la base de los primeros estudios que utilizaron toxinas purificadas. En estos experimentos, se provocó a los hámsteres de manera intragástrica con toxina purificada y posteriormente se supervisaron para detectar signos de enfermedad. Los hámsteres sucumbieron a la enfermedad y mostraron los síntomas típicos de la infección por *C. difficile* cuando se los provocó con toxina A purificada, incluida la acumulación de líquido, la inflamación y la necrosis de los tejidos intestinales. Por el contrario, la toxina B purificada no causaba enfermedad a menos que la toxina se coadministrara con concentraciones subletales de toxina A o si había daño intestinal previo. Esta observación condujo a la sugerencia de que las toxinas podrían funcionar de manera sinérgica, con la toxina B provocando un efecto solo después de que la toxina A hubiera causado daño tisular previo.

Evidencias adicionales de que la toxina A era el factor principal de virulencia en *C. difficile* surgieron de la observación de que la toxina A purificada por sí sola provocó hemorragias y aumentó la permeabilidad intestinal dando como resultado una necrosis grave de las células epiteliales en asas de íleon de conejo, mientras que la toxina B sola mostró poca enterotoxigenicidad. La vacunación con toxoides específicos de toxina A también protegió completamente a los animales contra la infección con cepas toxigénicas de *C. difficile*. Además, se ha observado que una fuerte respuesta humoral frente a la toxina A es un indicador importante de la gravedad de la enfermedad en pacientes infectados con *C. difficile*. En combinación, estos estudios implicaron que la toxina A era la principal toxina responsable de la enfermedad resultante de la CDI.

Trabajos más recientes han sugerido que la toxina B desempeña una función mucho más importante de lo previsto anteriormente. A la luz del trabajo sobre la toxina A discutido anteriormente, la identificación de cepas clínicas de *C. difficile* que no producen la toxina A pero aún causan la enfermedad sintomática fue desconcertante. Los experimentos que utilizaron toxinas purificadas indicaron claramente que la toxina A era el principal mediador de la CDI, aunque la aparición de aislados negativos de toxina A y positivos de toxina B sugería lo contrario. Además, el aislamiento de estas cepas de pacientes enfermos indicó que la toxina A no era necesaria para la actividad funcional de la toxina B *in vivo*. A nivel clínico, las cepas variantes de *C. difficile* eran indistinguibles de las cepas que producían ambas toxinas porque los pacientes infectados con cepas negativas de toxina A y positivas de toxina B mostraban el espectro completo de síntomas asociados con la CDI. Estos estudios sugieren también que estos aislados están asociados con una enfermedad más grave. Las razones de esto no se conocen; sin embargo, la variante de toxina B con especificidad de sustrato alterada producida por la mayoría de las cepas negativas de toxina A y positivas de toxina B podría desempeñar una función. De manera alternativa, la ausencia de una respuesta inmunitaria específica para la toxina A, que es un determinante clave en el control de la CDAD, podría contribuir a una mayor gravedad de la enfermedad.

Los experimentos que examinaron el efecto de las toxinas purificadas en ratones portadores de explantes intestinales humanos también demostraron que la toxina B por sí sola podría causar todos los síntomas de la CDI, incluso en ausencia de la toxina A. En este estudio, se demostró que la toxina B purificada es una enterotoxina más

potente que la toxina A, que causa un daño grave al epitelio intestinal y conduce a una respuesta inflamatoria aguda. Estos experimentos restablecieron la importancia de la toxina B en la CDI y cuestionaron la hipótesis generalmente aceptada entonces de que la toxina A era el principal factor de virulencia de *C. difficile*. La investigación que utilizó el modelo de intoxicación de embriones de pez cebra mostró posteriormente que los peces tratados con toxina B purificada presentaron daño cardiovascular, con una reducción del 90 % en el flujo sanguíneo sistémico y una caída del 20 % en la frecuencia cardíaca, lo que sugiere que la toxina B es cardiotoxica. Por lo tanto, estos estudios sugieren que la toxina B también podría tener la capacidad de causar daño sistémico al huésped además del daño localizado dentro del intestino. En este contexto, podría ser relevante que, en un pequeño porcentaje de pacientes, la infección por *C. difficile* dé como resultado síndrome de disfunción multiorgánica, posiblemente como resultado del daño sistémico por toxinas.

A pesar de los estudios detallados realizados utilizando toxinas purificadas, la contribución individual de la toxina A y la toxina B a la enfermedad permaneció ambigua principalmente porque los descubrimientos de la investigación no se correlacionaron con las variantes de aislados clínicos que se estaban volviendo cada vez más comunes.

El trabajo de uno de los inventores de la presente invención utilizando mutantes de toxina *tcdA* y *tcdB* de *C. difficile* ha implicado a la toxina B como el principal factor de virulencia de *C. difficile*, no a la toxina A, y sugirió que la toxina B no requiere la presencia de la toxina A para causar la enfermedad. Este descubrimiento fue consistente con los correlatos con la situación clínica y el aislamiento de aislados negativos de toxina A, positivos de toxina B, naturales que son completamente virulentos, tal como se ha discutido anteriormente. En particular, en estos experimentos (Lyras et al. Nature 458, 1176-1179 (30 de abril de 2009)), se infectaron grupos de hámsteres dorados sirios con la cepa de tipo silvestre o con uno de los mutantes de toxina derivados de forma independiente. Cuando se infectaron con la cepa de tipo silvestre, el 90 % de los hámsteres sucumbió a la enfermedad y murió. De manera similar, cuando se infectaron con los mutantes que ya no producían la toxina A, aproximadamente, el 94 % de los hámsteres murieron, lo que proporcionó una clara evidencia de que la toxina A no era necesaria para la enfermedad. Por el contrario, cuando los hámsteres se infectaron con mutantes que ya no producían toxina B, solo el 22 % sucumbió a la infección, y el análisis posterior de estos hámsteres reveló que los gránulos fecales contenían toxina B, lo que sugiere que en estos animales había tenido lugar la reversión de los mutantes al tipo silvestre.

Sin embargo, trabajos más recientes han restablecido la importancia tanto de la toxina A como de la toxina B (Kuehne et al. Nature 467, 711-713 (7 de octubre de 2010)). En este trabajo en el que se utilizaron inactivaciones génicas para inactivar los genes de la toxina de forma permanente, se demostró que *C. difficile* que producía una o ambas toxinas mostraba actividad citotóxica *in vitro* que se traducían directamente en virulencia *in vivo*. Además, al construir la primera cepa doblemente mutante de *C. difficile*, en la que se inactivaron ambos genes de la toxina, la virulencia se atenuó por completo.

Por consiguiente, este trabajo deja claro que las contramedidas eficaces contra *C. difficile* deben dirigirse a ambas toxinas, ya que la presencia de cualquiera de las toxinas es suficiente para la morbilidad y mortalidad por *C. difficile*. Por ejemplo, los datos de Kuehne et al. sugieren que las contramedidas contra *C. difficile* dirigidas a la toxina B sola no disminuirían la citotoxicidad *in vitro*, o la colonización o la mortalidad *in vivo*, en ausencia de dirección contra la toxina A.

En contraste directo con los descubrimientos mencionados anteriormente, los inventores de la presente invención han demostrado que los anticuerpos que se unen a la toxina B son capaces de inhibir la enfermedad asociada a *C. difficile*. En particular, la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile*, un antígeno de células vegetativas de *C. difficile* o un antígeno de endospora de *C. difficile* son capaces de inhibir la morbilidad asociada a *C. difficile*, la mortalidad asociada a *C. difficile* y la excreción fecal de esporas de *C. difficile* de individuos infectados.

Los inventores de la presente invención han establecido un modelo de enfermedad asociada a *C. difficile* (ejemplos 1 a 3). La figura 1 demuestra que la infección oral de ratones con esporas de *C. difficile* da como resultado una enfermedad asociada a *C. difficile*, medida por la pérdida de peso después de la infección. La figura 2 demuestra la colonización y excreción fecal de *C. difficile* después de la infección. La figura 3 demuestra que la infección por *C. difficile* da como resultado daño asociado a *C. difficile* en el ciego y el colon, medido por el cambio histopatológico después de la infección.

Es importante destacar que los inventores de la presente invención han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B (ejemplo 4 y figura 4), y que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de otras cepas, incluida la toxina B histórica purificada (toxina B-Hist) y la toxina B de la cepa hipervirulenta 027 (toxina B-HV), pero no la toxina A (figura 4B). Por consiguiente, se espera que los procedimientos y composiciones de la presente invención sean eficaces para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad asociada a *C. difficile* causada por diferentes cepas de *C. difficile*. Por ejemplo, la figura 4 demuestra que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de las cepas KI, M7404, VPI10463, CD196, R20291, 'CA' y JGS6133 de *C. difficile*.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer una composición que comprende anticuerpos de mamíferos para su utilización en el tratamiento y/o la profilaxis de, como mínimo, un síntoma de enfermedad asociada a *Clostridium difficile*, en la que los anticuerpos comprenden: a) anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* y b) anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile*.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “anticuerpo”, “anticuerpos” y similares incluyen cualquier molécula monoespecífica o biespecífica que comprenda una parte de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada para efectuar la unión al epítipo al que el anticuerpo tiene especificidad de unión. Se entenderá que, si el material inmunitario se genera por vacunación de mamíferos, contendrá anticuerpos policlonales. Los anticuerpos, tal como se utilizan en el presente documento, también pueden incluir anticuerpos policlonales, humanizados, antiidiotípicos, quiméricos o de cadena sencilla. Entre los ejemplos de anticuerpos y fragmentos de los mismos que se pueden preparar, según este aspecto de la presente invención, se incluyen moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y fragmentos que contienen un parátipo.

Los fragmentos, tal como se utilizan en el presente documento, incluyen normalmente una parte de una molécula de anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, un antígeno de la gripe) e incluyen, sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener a partir de anticuerpos tales como los descritos anteriormente mediante procedimientos tales como digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína y/o mediante la escisión de los puentes disulfuro mediante reducción química. Los anticuerpos de cadena sencilla también pretenden estar incluidos en el término “fragmento”. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizan un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Aún, además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o fragmento del mismo con una o más proteínas o péptidos. Entre los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión se incluyen la utilización de la región central de estreptavidina para hacer una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y la utilización de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058).

Tal como se utiliza en el presente documento, “tratamiento” se refiere a la reducción o eliminación de la gravedad de un síntoma de la enfermedad, la frecuencia con la que se presenta dicho síntoma, o ambos. El término incluye una acción que ocurre mientras un paciente padece una infección por *C. difficile* o un trastorno asociado que reduce la gravedad de uno o más síntomas o efectos de una infección por *C. difficile* o una enfermedad o síntoma asociado a *C. difficile*.

Tal como se utiliza en el presente documento, “profilaxis” se refiere a prevenir o inhibir total o parcialmente un síntoma de la enfermedad o la frecuencia con la que se presenta dicho síntoma, o una reducción del riesgo de adquirir un síntoma dado, de la CDAD. La profilaxis incluye inhibir la diarrea asociada a *C. difficile*, prevenir la diarrea asociada a *Clostridium difficile*, disminuir la gravedad de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* o mejorar los signos y síntomas relacionados con la diarrea asociada a *Clostridium difficile*. La profilaxis incluye inhibir, prevenir o disminuir la gravedad de un síntoma de CDAD, tal como se describe en el presente documento. El término incluye una acción que ocurre antes de que un paciente comience a padecer una infección por *C. difficile* o un trastorno asociado, tal como, sin limitación, un trastorno intestinal o gastrointestinal, que retrasa la aparición y/o inhibe o reduce la gravedad de una infección por *C. difficile* o la enfermedad o síntoma asociados a *C. difficile*.

Tal como se utiliza en el presente documento, “enfermedad asociada a *C. difficile*” se refiere a cualquier enfermedad que implique crecimiento no deseado, producción de toxinas o invasión de tejido en el intestino por *C. difficile*. Las enfermedades asociadas a *C. difficile* son bien conocidas e incluyen específicamente diarrea asociada a antibióticos (también conocida como colitis por *C. difficile*), colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico asociado a *C. difficile*. La colitis por *C. difficile* generalmente se refiere a una enfermedad diarreica abundante y acuosa asociada con la presencia de, como mínimo, una toxina de *C. difficile*. La colitis pseudomembranosa se refiere a una forma grave de colitis por *C. difficile* caracterizada además por diarrea sanguinolenta, fiebre e invasión de la pared intestinal por *C. difficile*. La aparición de “pseudomembranas” en la superficie del colon o del recto puede ser un diagnóstico de la afección. Las pseudomembranas están compuestas principalmente por restos inflamatorios y glóbulos blancos. El término también incluye una recaída de la infección por *C. difficile* en un individuo que ha padecido anteriormente una infección por *C. difficile* o una enfermedad asociada a *C. difficile*.

Tal como se utiliza en el presente documento, un “síntoma” de enfermedad asociada a *C. difficile* incluye infección

por *C. difficile*, o un síntoma de enfermedad asociada a *C. difficile*, tal como diarrea autolimitante leve, diarrea, dolor en el abdomen, fiebre y pérdida de apetito, dolor abdominal, hasta afecciones potencialmente mortales tales como colitis pseudomembranosa y megacolon citotóxico u otros síntomas clínicos asociados con la enfermedad asociada a *C. difficile*, incluidos los descritos en el presente documento.

5 Entre otros síntomas de la enfermedad asociada a *C. difficile* se incluyen colonización con bacterias *C. difficile*, pérdida de peso, citotoxicidad, daño gastrointestinal, cambio histopatológico en el tracto gastrointestinal, excreción de *C. difficile* en las heces y mortalidad.

10 El cambio histopatológico es un cambio en un tejido durante la infección por *C. difficile* o CDAD que se puede detectar utilizando procedimientos histológicos bien conocidos en el sector. En una realización, el cambio histopatológico es un cambio en el tracto gastrointestinal. En otra realización, el cambio histopatológico es un cambio en un tejido distinto de un tejido del tracto gastrointestinal.

15 *C. difficile* se excreta en las heces de las personas infectadas. Reducir la excreción de *C. difficile* incluye disminuir el número de esporas de *C. difficile* en las heces de una persona infectada.

En otra realización el, como mínimo, un síntoma de enfermedad asociada a *Clostridium difficile* se selecciona entre el grupo que consiste en diarrea, dolor abdominal, fiebre, pérdida de apetito, colitis pseudomembranosa, megacolon citotóxico, colonización por *C. difficile*, pérdida de peso, citotoxicidad, daño gastrointestinal, cambio histopatológico en el tracto gastrointestinal, excreción fecal de esporas de *C. difficile* y mortalidad asociada a *C. difficile*.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, "toxina B" se refiere a una familia de citotoxinas proteicas de, aproximadamente, 270 kDa de tamaño que son similares a la toxina A, pero significativamente más citotóxicas. Al igual que la toxina A, la toxina B tiene una actividad enzimática dentro de la región N-terminal que actúa alterando el citoesqueleto de la célula de mamífero causando la muerte celular. Tal como se describirá a continuación, hay una serie de variantes naturales de la toxina B dentro de las cepas de *C. difficile* que se denominan "toxintipos".

25 Las toxinas A y B son, ambas, miembros de la familia de grandes toxinas clostridiales (LCT, *large clostridial toxin*), que incluye las toxinas letales y hemorrágicas (TcsL y TcsH, respectivamente) de *Clostridium sordellii*, la toxina alfa (TcnA) de *Clostridium novyi* y la TpeL de aislados de *Clostridium perfringens* de ganado doméstico. Las LCT son una importante familia de toxinas bacterianas; son monoglicosiltransferasas que inactivan las GTPasas de la familia Rho, entre las que se incluyen Rho, Rac, Ras, Ral y Cdc42, a través de la transferencia covalente de un resto de glucosa o, para TcnA y TpeL, un resto de N-acetilglucosamina. La glicosilación de estas proteínas las bloquea en una conformación inactiva bloqueando así las actividades celulares aguas abajo que requieren GTPasas Rho funcionales.

30 Sin desear quedar limitado por la teoría, es probable que la intoxicación celular comience con la unión del extremo C-terminal de la LCT a uno o más receptores presentes en la superficie de la célula diana. Es importante tener en cuenta que la naturaleza exacta de los receptores de toxinas no se conoce en la actualidad, y se han sugerido todos los receptores de carbohidratos, glicolípidos y proteínas. Después de la unión al receptor, las toxinas son sometidas a endocitosis a través de vías dependientes de clatrina y dinamina, antes de trasladarse a los primeros endosomas de la célula huésped. Se cree que la acidificación del endosoma es necesaria para la translocación de las toxinas al citosol de la célula huésped. La evidencia de esto proviene de la observación de que la citotoxicidad mediada por la toxina B puede ser inhibida mediante la bafilomicina A1, un potente inhibidor de la bomba ATPasa vacuolar endosómica, que bloquea la acidificación endosómica. Dentro del endosoma, cada toxina sufre un cambio conformacional inducido por el pH, muy probablemente entre la región CROP C-terminal y el dominio de cisteína proteasa, con una protuberancia que parece estar involucrada en la inserción en la membrana o en la interacción temprana con la membrana. Tanto las toxinas A como las B pueden formar poros a un pH bajo, y la formación de poros inducida por la toxina A depende de la presencia de colesterol. En el caso de la toxina B, la actividad formadora de poros se encuentra dentro de la región hidrofóbica, más específicamente entre los residuos 830 y 990, siendo el glutamato 970 y el glutamato 976 particularmente importantes porque actúan como sensores de pH para la inserción en la membrana. Después de la formación de poros, la unión del inositol hexaquisfosfato conduce a un cambio conformacional dentro del dominio de cisteína proteasa de la toxina, lo que da como resultado una escisión autocatalítica en un sitio ubicado entre los dominios de glucosiltransferasa y cisteína proteasa de la proteína, con la posterior liberación del dominio de glucosiltransferasa N-terminal activo en el citosol. Las GTPasas Rho son fundamentales para muchos procesos celulares, tales como la organización del citoesqueleto de actina; también desempeñan una función en el control de la función de la barrera epitelial y participan en la señalización y la motilidad de las células inmunitarias. La inactivación de las GTPasas Rho mediante la toxina A o la toxina B tiene, por lo tanto, un efecto profundo en la célula. Uno de los efectos más llamativos y tempranos de la intoxicación es la pérdida de la integridad estructural de la célula diana como consecuencia de una disminución en la cantidad de actina F, como resultado de la desregulación de la despolimerización de la actina. La pérdida de integridad estructural y el "redondeo celular" normalmente preceden a la apoptosis y, finalmente, a la muerte de la célula intoxicada, que se cree que ocurre a través de una vía dependiente de caspasa-3 y caspasa-9. La alteración del citoesqueleto de actina mediada por toxinas y la muerte posterior de los colonocitos conduce a una pérdida de la función de barrera epitelial intestinal y al deterioro de las uniones celulares estrechas. Las células epiteliales

intestinales también liberan una serie de citocinas en respuesta a la exposición a la toxina y esto conduce a la activación de neutrófilos, mastocitos, nervios entéricos y neuronas sensoriales dentro de la lámina propia intestinal. Estos, a su vez, liberan neuropéptidos y citocinas proinflamatorias que dan como resultado una respuesta inflamatoria profunda, que compromete aún más la función de barrera epitelial. La pérdida de la función de barrera epitelial da como resultado un aumento de la permeabilidad intestinal y la acumulación de líquido, seguido de la aparición de diarrea, que es uno de los rasgos característicos de la CDAD.

Se dice que un anticuerpo “se une a” un determinado antígeno si es capaz de reaccionar específicamente con el antígeno entre los que, por ejemplo, se puede incluir toxina B, un antígeno de endospora o un antígeno de células vegetativas, para unir de esta manera la molécula de antígeno al anticuerpo. Un anticuerpo que se une a un antígeno de interés es capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad para que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico.

En una realización, un anticuerpo que “se une a” un antígeno es uno que se une a un antígeno de *C. difficile* con una afinidad (K_3) de, como mínimo, 10^4 M.

Tal como se utiliza en el presente documento, “célula vegetativa” o “estado vegetativo” se refiere a la fase de crecimiento de una bacteria o bacterias de *C. difficile*, por ejemplo, la fase de crecimiento activo y división de *C. difficile*.

Tal como se utiliza en el presente documento, “espora” se refiere a los términos utilizados convencionalmente “espora” y “endospora”. Las endosporas bacterianas son altamente resistentes a condiciones físicas y químicas hostiles, demostrando ser uno de los tipos de células más duraderos que se encuentran en la naturaleza. Pueden sobrevivir a temperaturas elevadas, secado, radiación y muchos productos químicos dañinos y son una forma latente de la bacteria que le permite sobrevivir en condiciones ambientales subóptimas. Las endosporas pueden sobrevivir durante mucho tiempo y posteriormente volver a un estado de crecimiento, un proceso denominado germinación. Debido a que las endosporas son resistentes al calor, la radiación, los desinfectantes y la desecación, son difíciles de eliminar de los materiales médicos y farmacéuticos y son una causa frecuente de contaminación. “Espora” se refiere tanto a ambos términos utilizados convencionalmente “espora” y “endospora”.

Un “antígeno” es una molécula o una parte de una molécula capaz de unirse a un anticuerpo, que además es capaz de inducir a un animal a producir un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener un epítipo o más de uno. El término “epítipo” se refiere a la parte de cualquier molécula capaz de unirse a un anticuerpo que también puede ser reconocida por ese anticuerpo. Los epítipos o “determinantes antigénicos” suelen consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Por consiguiente, un antígeno de células vegetativas es una molécula o una parte de una molécula, capaz de unirse a un anticuerpo, que está presente en las células vegetativas de *C. difficile*.

Un antígeno de endospora es una molécula o una parte de una molécula, capaz de unirse a un anticuerpo, que está presente en las endosporas de *C. difficile*.

Las endosporas de *C. difficile* están encerradas en una estructura proteica multicapa formada por el ensamblaje ordenado de muchos polipéptidos. La endospora contiene cuatro capas protectoras, el núcleo, la corteza, la cubierta y el exosporio. La capa más externa de la espora es el exosporio, una cubierta delgada hecha de proteína. En el interior se encuentra la cubierta de esporas, que se compone de queratina altamente entrecruzada y capas de proteínas específicas de esporas. La cubierta de esporas es impermeable a muchas moléculas tóxicas y también puede contener enzimas que intervienen en la germinación. La corteza se encuentra debajo de la cubierta de esporas y consiste en peptidoglicano. La pared del núcleo se encuentra debajo de la corteza y rodea el protoplasto o núcleo de la endospora. El núcleo tiene estructuras celulares normales, tales como el ADN y los ribosomas, pero es metabólicamente inactivo.

Por lo tanto, algunas realizaciones de la presente invención incluyen anticuerpos que se unen a una proteína específica de esporas tal como, por ejemplo, una proteína de exosporio, una proteína de cubierta de esporas, una proteína de corteza de esporas, una proteína de membrana interna de esporas o una proteína de núcleo de esporas de *C. difficile*. Entre las proteínas de ensamblaje de la cubierta de esporas se incluyen CotA, CotB, CotC, CotD, CotE y SodA. El exosporio es una estructura similar a un saco holgado que envuelve la espora madura. Por lo tanto, algunas realizaciones de la presente invención incluyen anticuerpos que se unen a una proteína específica de exosporio. Entre las proteínas de exosporio se incluyen BclA1, BclA2 y BclA3.

Los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo policlonal” se refiere a un anticuerpo producido a partir de más de un único clon de células plasmáticas. Por el contrario, “anticuerpo monoclonal” se refiere a un

- anticuerpo producido a partir de un único clon de células plasmáticas. La preparación de anticuerpos policlonales es bien conocida. Se puede obtener un anticuerpo policlonal contra un antígeno diana inmunizando cualquiera de una variedad de animales huéspedes con un inmunógeno. Se puede utilizar cualquiera de una amplia variedad de protocolos de inmunización. El animal huésped puede ser cualquier mamífero, por ejemplo, un ratón, hámster, rata, conejo, cobaya, cabra, oveja, caballo, vaca, búfalo, bisonte, camello o llama. Un animal huésped puede ser un pájaro, por ejemplo, un pollo o un pavo. En algunas realizaciones, una preparación de anticuerpos, en lugar de obtenerse de una muestra de sangre, puede obtenerse a partir de otra fuente de fluido, por ejemplo, de leche, calostro, clara de huevo o yema de huevo.
- 5 El calostro hiperinmune de la presente invención que comprende anticuerpos que se unen a un antígeno se genera contra una vacuna que comprende un antígeno de *Clostridium difficile*.
- Una de las vacunas antigénicas utilizadas para generar los anticuerpos de la presente invención es una toxina de *C. difficile*. La toxina es la toxina B de *C. difficile*.
- 15 La toxina B de *C. difficile* puede ser una toxina B de *C. difficile* purificada o recombinante.
- La producción de toxina B de *C. difficile* purificada se indica como ejemplo en los ejemplos.
- 20 Las vacunas utilizadas en la presente invención incluyen toxina B recombinante de la cepa 630.
- La producción de endosporas de *C. difficile* y células vegetativas de *C. difficile* se indica como ejemplo en los ejemplos.
- 25 Entre las vacunas utilizadas en la presente invención se incluyen endosporas de la cepa KI y células vegetativas de la cepa KI.
- El inmunógeno utilizado para generar los anticuerpos de la presente invención también puede estar parcial o completamente inactivado, es decir, tener una toxicidad reducida. Entre los ejemplos de modificación se incluyen: tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con UDP-dialdehído, formaldehído, formalina, glutaraldehído, peróxido u oxígeno) y procedimientos recombinantes (por ejemplo, deleciones o mutaciones en la toxina). Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un toxoide de *C. difficile* o un fragmento del mismo derivado de la toxina nativa por tratamiento con formaldehído. De manera alternativa, se puede generar un toxoide recombinante inactivando selectivamente el motivo del sitio activo mediante mutagénesis dirigida al sitio. Un ejemplo de mutagénesis dirigida al sitio para reducir o suprimir los efectos de la toxina de las toxinas A y B es la modificación del motivo DXD en el dominio N-terminal de la toxina. Los aspartatos y/u otros residuos pueden estar mutados, por ejemplo, a alanina para reducir la actividad biológica de la toxina B.
- 30 Los antígenos se pueden formular con un adyuvante. Entre los adyuvantes adecuados se pueden incluir alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), que se utiliza ampliamente en humanos, y otros adyuvantes, tales como la saponina y su componente purificado Quil A, el adyuvante completo de Freund, el adyuvante RIBBI y otros adyuvantes utilizados en investigación y aplicaciones veterinarias.
- 40 Los inventores de la presente invención han demostrado anticuerpos que se unen a la toxina B “estándar” (TcdB_{HIST}) a partir de la cepa histórica 630, y anticuerpos que se unen a la toxina B “hipervirulenta” (TcdB_{HV}) a partir de la cepa R2029. Los inventores de la presente invención también han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de las cepas KI, M7404, VPI10463, CD196, R20291, 'CA' y JGS6133 de *C. difficile*. Además, los inventores de la presente invención han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile*, y que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* de otras cepas (figura 13). Por ejemplo, los inventores de la presente invención han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* de las cepas KI, 8374, AI35, CD71, VPI10463, SP, CD37, CD84, CD39, M322832 y JIR8078.
- 45 Una “cepa” de *C. difficile* es una muestra de la bacteria *C. difficile* tomada de un individuo infectado en una ocasión única. Se pueden utilizar procedimientos de rutina para distinguir entre diferentes cepas de *C. difficile*.
- 50 Entre las cepas utilizadas en la presente invención se incluyen cepas seleccionadas entre el grupo que consiste en KI y 630.
- Recientemente, la morbilidad y la mortalidad resultantes de CDAD han aumentado significativamente, muy probablemente como resultado de cambios en la virulencia de las cepas causales junto con cambios en los patrones de utilización de antibióticos. Las cepas hipervirulentas, que pertenecen predominantemente al grupo BI/NAP1/027, parecen causar epidemias más fácilmente que otras cepas de *C. difficile*, lo que conduce a una mayor incidencia de
- 65

CDI y una mayor gravedad de la enfermedad. Se estima de manera conservadora que las infecciones por estas cepas le cuestan al sistema de salud de EE. UU. 3,2 miles de millones de dólares por año. En particular, estos aislados son resistentes a las fluoroquinolonas, producen significativamente más TcdA y TcdB y, a menudo, producen más esporas en comparación con las cepas históricas. La comparación genotípica y fenotípica de los aislados hipervirulentos de BI/NAP1/027 con cepas históricas ha identificado una serie de diferencias que podrían contribuir al aumento de la virulencia de estas cepas. De particular interés es la observación de que estas cepas tienen una mutación sin sentido en *tcdC*, que se postula que es responsable del aumento de los niveles de toxina producidos por estas cepas. Un trabajo reciente que utilizó un derivado de una cepa BI/NAP1/027 complementado con *tcdC* ha confirmado esta hipótesis y ha demostrado que esta mutación natural es un factor importante en el aumento de la producción de toxinas de estas cepas y en el desarrollo de un fenotipo más virulento. Los aislados de BI/NAP1/027 también codifican una forma variante de TcdB, que recientemente demostró ser citotóxica para una gama más amplia de líneas celulares en comparación con TcdB de aislados históricos.

C. difficile es una especie genéticamente heterogénea con una variación cromosómica sustancial entre cepas. Esta variación genética se extiende a la región PaLoc, incluidos los genes estructurales de la toxina *tcdA* y *tcdB*, lo que facilita el desarrollo de un esquema de tipificación de toxinas de *C. difficile*. Este esquema de tipificación clasifica las cepas, según el análisis por PCR definido y el posterior análisis de fragmentos de ADN con endonucleasas de restricción, en 'toxintipos', que reflejan los cambios de nucleótidos específicos que están presentes en el PaLoc. Actualmente hay más de 30 toxintipos además del toxintipo 0, de los cuales la cepa VPI10463 es el miembro arquetípico y sirve como cepa de referencia para el esquema. Aunque se desconoce el impacto de los toxintipos variantes en la enfermedad, está claro que las mutaciones dentro de PaLoc pueden tener un efecto profundo en las toxinas producidas por una cepa en particular. En los casos más sorprendentes, estas mutaciones pueden abolir la producción de una o ambas toxinas principales, tal como se observa en las cepas variantes negativas de toxina A, positivas de toxina B, la mayoría de las cuales son toxintipo VIII, X, XXX y XXXI, o en aislados negativos de toxina A, negativos de toxina B tales como los toxintipos XIa y XIb. Téngase en cuenta que el último grupo de cepas, que carece de ambas LCT, no causa enfermedad y se considera avirulento. Recientemente, se llevó a cabo un amplio estudio de la variación genética dentro del PaLoc de un gran número de aislados del Reino Unido (n=1.290) junto con el análisis de tipificación de secuencias multilocus (MLST, *multilocus sequence typing*). La evidencia de la adquisición de PaLoc mediante recombinación genética se obtuvo a partir del análisis por PCR de cepas de ribotipo 078 dentro de uno de los cinco lados principales de *C. difficile*, pero en general los resultados mostraron que la variación genética en PaLoc era más probable que surgiera por mutación.

Sin querer quedar limitado por la teoría, podría ser de relevancia clínica que también se haya descubierto que las variantes de toxinas tienen alteraciones en su especificidad de sustrato, lo que podría tener un impacto en la gravedad y el resultado de la enfermedad. Por ejemplo, los aislados pertenecientes a los toxintipos VIII, X y XIV, producen proteínas de toxina B que inactivan un subconjunto alterado de GTPasas de la familia Rho en comparación con la toxina B de las cepas de referencia. Específicamente, la toxina B de la cepa de referencia VPI10463 glucosila Rho, Rac y Cdc42, mientras que la toxina equivalente producida por las cepas de toxintipo VIII y X glucosila Rap, Ral y R-Ras pero ya no modifica Rho. Curiosamente, en el modelo de enfermedad en ratones, la toxina B purificada producida por la cepa 8864 del toxintipo X fue más tóxica que la de la cepa VPI10463 con una dosis letal, aproximadamente, ocho veces menor que la toxina específica del toxintipo 0.

La toxina B producida por las cepas epidémicas BI/NAP1/027 de *C. difficile* también es una toxina variante. Recientemente, las propiedades de la toxina B "hipervirulenta" (TcdBHV) de la cepa R20291 se compararon con la toxina "estándar" (TcdBHIST) de la cepa histórica 630. Aunque se descubrió que estas dos toxinas tenían el 92 % de identidad en general, se identificó mucha más variación en el dominio de unión al receptor C-terminal con algunas regiones que mostraban tan solo el 80 % de identidad. Además, la comparación funcional de la toxina B purificada de la cepa VPI10463 (que es idéntica a la de la cepa 630 y también se define como TcdBHIST) y una cepa BI/NAP1/027 mostró que TcdBHV podía ingresar a las células mucho más rápidamente que TcdBHIST, lo que dio como resultado una destrucción de tejido más extensa y necrosis en el modelo de intoxicación de embriones de pez cebra. Es posible que las diferencias en el dominio de unión al receptor de TcdBHV puedan facilitar la unión de la toxina a un receptor huésped más ampliamente distribuido no reconocido por TcdBHIST o que estas diferencias puedan permitir que la toxina se una a múltiples receptores diferentes en diferentes tejidos a los que TcdBHIST normalmente no se uniría. Independientemente de la explicación subyacente, es muy probable que las variaciones de TcdBHV tengan una función importante en la hipervirulencia de las cepas BI/NAP1/027. Téngase en cuenta que además de las variaciones de toxinas bien caracterizadas descritas anteriormente, se han identificado otras variantes de toxinas que difieren en tamaño, especificidad de sustrato y antigenicidad; sin embargo, se desconoce la importancia clínica de estas toxinas.

Tal como se ha discutido anteriormente, los inventores de la presente invención han demostrado que los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* se unen además a una toxina B de *Clostridium difficile* de un toxintipo diferente al toxintipo de la toxina B de la vacuna. Es importante destacar que los inventores de la presente invención han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a otra toxina B variante de otras cepas tal como se ha descrito anteriormente, incluida la toxina B "hipervirulenta" (por ejemplo, TcdBHV). Por consiguiente, en una realización, la presente invención da a conocer una composición, tal como se describe en el presente documento, en

la que los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* se unen, además, a una toxina B de *Clostridium difficile* de un toxinotipo diferente al toxinotipo de la toxina B de la vacuna.

5 Los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende la toxina B de la cepa 630 de *Clostridium difficile*.

En una realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* se unen a una toxina B de una segunda cepa de *Clostridium difficile*.

10 Los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende células vegetativas de una cepa KI de *Clostridium difficile*. La vacuna puede comprender preparaciones de capa S de *Clostridium difficile*. Los anticuerpos se unen a SlpA.

15 En una realización, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* de una segunda cepa de *Clostridium difficile*.

20 Los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende endosporas de la cepa KI de *Clostridium difficile*. En una realización, los anticuerpos se unen a proteínas de exosporio.

En una realización adicional, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de una segunda cepa de *Clostridium difficile*.

25 Tal como se ha discutido anteriormente, la presente invención se basa en parte en la demostración de que el calostro hiperinmune de la presente invención que comprende anticuerpos que se unen a un antígeno generados contra una vacuna que comprende un antígeno de *Clostridium difficile* es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de los síntomas de una enfermedad asociada a *C. difficile*.

30 Los inventores de la presente invención han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de *C. difficile* comprende anticuerpos que inhiben la citotoxicidad de la toxina B en las células (ejemplo 5 y figura 5), y que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de *C. difficile* comprende anticuerpos que inhiben la citotoxicidad de la toxina B, de toxinas B de otras cepas (ejemplo 5 y figura 5). Es importante destacar que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B de *C. difficile* es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* en ratones y la mortalidad asociada a *C. difficile* (ejemplo 6 y figuras 7, 18 y 19), y el tratamiento del daño gastrointestinal asociado a *C. difficile* en ratones (ejemplo 6 y figuras 8, 18 y 19).

40 La "neutralización" de la citotoxicidad de la toxina significa la acción de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo) que bloquea la acción biológica de una o más de las citotoxinas (toxina A y/o toxina B) de *C. difficile*. La acción biológica de las citotoxinas ("citotoxicidad") es la capacidad de la toxina para destruir o alterar la función de las células de mamíferos, en particular las células del epitelio intestinal de mamíferos. La actividad neutralizadora de toxinas de una sustancia se puede medir por su capacidad para prevenir la muerte de células de mamífero cultivadas.

45 Tal como se ha discutido anteriormente, la presente invención se basa en parte en la demostración de que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* son capaces de inhibir los síntomas de la enfermedad asociada a *C. difficile*. Los inventores de la presente invención también han demostrado que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* son capaces de inhibir la enfermedad asociada a *C. difficile*. En particular, el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de *C. difficile* es eficaz para el tratamiento de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* en ratones, la mortalidad asociada a *C. difficile*, la inhibición de la colonización de ratones por *C. difficile* y la reducción de la excreción de esporas de *C. difficile* a partir de ratones infectados (ejemplo 10 y figura 11).

50 Por consiguiente, la presente invención da a conocer composiciones en las que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende células vegetativas de *Clostridium difficile*.

60 *C. difficile* expresa una capa superficial cristalina o paracristalina (capa S) sobre la superficie externa de la célula. Dichas capas S comprenden proteínas o glicoproteínas que forman una red dispuesta regularmente en la superficie externa de la bacteria y se ha demostrado anteriormente que son esenciales para la virulencia de patógenos, tales como *Aeromonas salmonicida* y *Campylobacter fetus*. Al contrario que la mayoría de las bacterias que comprenden una capa S, se sabe que *C. difficile* comprende dos capas S paracristalinas superpuestas, cada una compuesta por una subunidad de glicoproteína que varía ligeramente en peso molecular aparente entre las diferentes cepas de *C. difficile*. La mayoría de las cepas de *C. difficile* expresan dos proteínas principales de la capa S (SLP, *S-layer protein*), una de 32 a 38 kDa (SLP de bajo peso molecular) y una segunda de 42 a 48 kDa (SLP de alto peso

molecular). La SLP de bajo peso molecular parece ser inmunodominante y es el antígeno reconocido de manera más común por pacientes que padecen CDAD, y es el único antígeno reconocido en extractos de bacterias con EDTA por antisueros generados en conejos contra células enteras de *C. difficile* (Calabi, E. et al., 2001, Mol. Microbiol., 40(5) pi 187-99, PMID: 11401722).

La capa S de *C. difficile* consiste principalmente en la proteína principal SlpA de la capa S y una familia de homólogos de SlpA, la familia de proteínas de la pared celular (CWP, *cell wall protein*). Los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de célula vegetativa de *Clostridium difficile* se unen a SlpA.

Los inventores de la presente invención han demostrado que el suero derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* (ejemplo 11 y figuras 12 y 13), y que el suero derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a proteínas de la capa S (ejemplo 12 y figura 14). La figura 14 demuestra que los anticuerpos que se unen a las proteínas de la capa S de las células vegetativas se unen además a, como mínimo, una proteína de la capa S de *C. difficile* de una cepa diferente de *Clostridium difficile*.

Es importante destacar que los inventores de la presente invención han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con células vegetativas de *C. difficile* es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* en ratones y la mortalidad asociada a *C. difficile* en ratones (ejemplo 13 y figura 15).

Tal como se ha discutido anteriormente, los inventores de la presente invención han demostrado que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de la cepa KI de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a endosporas (ejemplo 8 y figura 9), y a proteínas del exosporio (ejemplo 9 y figura 10). Es importante destacar que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de *C. difficile* es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* en ratones y la mortalidad asociada a *C. difficile* y la inhibición de la colonización de ratones por *C. difficile* y la excreción fecal de esporas de *C. difficile* a partir de animales infectados (ejemplo 10 y figuras 11 y 18).

Los inventores de la presente invención han demostrado también anticuerpos en los que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende endosporas de *Clostridium difficile*.

Las endosporas son endosporas de la cepa KI de *Clostridium difficile*.

En una realización, los anticuerpos se unen a proteínas de exosporio.

Los inventores de la presente invención han demostrado también que los ratones a los que se administró una composición que comprende anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas, mostraron una pérdida de peso retardada y una mayor supervivencia en comparación con los ratones que recibieron calostro no inmune.

Por consiguiente, la presente invención comprende una composición que comprende anticuerpos que se unen a más antígenos de *C. difficile*.

La composición comprende anticuerpos que se unen a una toxina B y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas.

La composición puede comprender anticuerpos que se unen a la toxina B y a la toxina A, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas.

La proporción de los diferentes anticuerpos en la composición se puede variar según procedimientos estándar. Por ejemplo, la proporción del primer anticuerpo respecto al segundo anticuerpo puede ser de, aproximadamente, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 o 5:1. La proporción del primer anticuerpo respecto al segundo y tercer anticuerpo puede ser de, aproximadamente, 1:1:1, 2:1:1, 3:1:1, 4:1:1, 5:1:1, 6:1:1, 7:1:1 u 8:1:1.

Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora están en una proporción de 1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora están en una proporción de 2:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en

una proporción de 1:1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en una proporción de 2:1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en una proporción de 3:1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en una proporción de 4:1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en una proporción de 5:1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en una proporción de 6:1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en una proporción de 7:1:1.

En otra realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas están en una proporción de 8:1:1. Es importante destacar que los inventores de la presente invención han demostrado que los anticuerpos de la presente invención se pueden derivar a partir de material hiperinmune.

Según una realización específica, los anticuerpos derivados de material hiperinmune que se unen a antígenos de *C. difficile* pueden comprender inmunoglobulina monomérica, dimérica o multimérica seleccionada entre el grupo que consiste en IgG, IgA e IgM y cualquiera de sus fragmentos. En los rumiantes, la principal diferencia de composición entre el calostro y la leche madura es el contenido muy elevado de inmunoglobulinas del calostro, de las cuales la clase IgG constituye el 80-90 %.

De este modo, según una realización específica, los anticuerpos derivados de material hiperinmune que se unen a antígenos de *C. difficile* de la presente invención comprenden principalmente IgG, específicamente, IgG1 e IgG2.

El término "inmunoglobulina G" (IgG), tal como se utiliza en el presente documento, es una inmunoglobulina multimérica, formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada complejo tiene dos sitios de unión al antígeno. Esta es la inmunoglobulina más abundante y se distribuye, aproximadamente, por igual en la sangre y en los líquidos tisulares, constituyendo el 75 % de las inmunoglobulinas séricas en humanos. En general, el número de subclases de IgG ha variado ampliamente entre diferentes especies, desde una subclase en conejos hasta siete subclases en caballos, lo que dificulta encontrar ortólogos. En humanos, por ejemplo, IgG1 e IgG3 son las subclases de IgG más proinflamatorias. En ratones, sin embargo, IgG2a e IgG2b son las moléculas de IgG más proinflamatorias que muestran una mayor actividad que las IgG1 e IgG3 de ratón en muchos sistemas modelo *in vivo*.

De manera opcional o adicional, los anticuerpos derivados de material hiperinmune que se unen a antígenos de *C. difficile* pueden comprender un anticuerpo secretor, específicamente, sIgA.

Las IgA e IgM diméricas y multiméricas son secretadas por diversos tejidos exocrinos. La IgA es la inmunoglobulina secretora predominante presente en el calostro, la saliva, las lágrimas, las secreciones bronquiales, la mucosa nasal, el fluido prostático, las secreciones vaginales y las secreciones mucosas del intestino delgado. La producción de IgA supera la de todas las demás inmunoglobulinas, lo que la convierte en el principal anticuerpo producido diariamente por el cuerpo y es la principal inmunoglobulina que se encuentra en la leche, el suero y el calostro humanos. La secreción de IgM es menos abundante, pero puede aumentar para compensar las deficiencias en la secreción de IgA. La cadena J que contiene IgA es producida y secretada por inmunocitos B plasmáticos ubicados en la lámina propia justo debajo de la membrana basal de las células exocrinas. La IgA tiene una estructura típica de cuatro cadenas de inmunoglobulina (M_r 160.000) formada por dos cadenas pesadas (M_r 55.000) y dos cadenas ligeras (M_r 23.000). En humanos, hay dos subclases de IgA. Estas son IgA1 e IgA2 que tienen una y dos cadenas pesadas, respectivamente. La IgA se puede presentar como monómeros, dímeros, trímeros o multímeros. En plasma, el 10 % de la IgA total es polimérica mientras que el 90 % restante es monomérica. La IgA secretada se une a un receptor poly-Ig de M_r 100.000 ubicado en la superficie basolateral de la mayoría de las células mucosas. El

complejo receptor-IgA se traslada a continuación a la superficie apical en la que se secreta IgA. La unión de IgA dimérica al receptor poli-Ig depende completamente de la presencia de una cadena J. La IgA monomérica no se unirá al receptor.

La diferencia en la función de IgG e IgA, sigue la posición en la que operan las moléculas. La IgA se encuentra principalmente en las superficies de las mucosas, donde hay poco fluido tisular para transportar células inmunitarias y sustancias químicas. Por lo tanto, la IgA (a menudo como un dímero) se utilizaría preferentemente para la neutralización física de patógenos y puede ser demasiado eficaz en otras funciones inmunitarias. Las IgG están presentes en los fluidos tisulares y la sangre, en los que existe la colección completa de leucocitos, sistema del complemento, macrófagos, etc., que pueden neutralizar físicamente un patógeno de manera eficaz y también son más eficaces en una función de comunicación/presentación que la IgA, es decir, tienden a inducir mejor la opsonización por los fagocitos (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos y macrófagos) y activar mejor el sistema del complemento.

Los anticuerpos se derivan a partir del calostro hiperinmune bovino.

Más específicamente, los anticuerpos derivados del material hiperinmune que se unen a antígenos de *C. difficile* de la presente invención se pueden obtener a partir de uno de calostro, suero de calostro, calostro hiperinmunizado, suero de calostro (ya sea queso o caseína), o a partir de una forma reconstituida de dichas corrientes.

Debe apreciarse que los anticuerpos derivados de material hiperinmune que se unen a antígenos de *C. difficile* comprendidos dentro de la composición de la presente invención pueden ser cualquier fracción de calostro. De este modo, el término calostro, cuando se utiliza en el presente documento, incluye leche de calostro, leche de calostro procesada, tal como leche de calostro procesada para eliminar, de manera parcial o completa, uno o más de grasa, residuos celulares, lactosa y caseína.

El calostro que contiene los anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* y, opcionalmente, los anticuerpos específicos de antígeno se pueden recoger preferentemente ordeñando el animal. El calostro recogido de este modo se puede utilizar directamente, se puede procesar posteriormente, por ejemplo, para purificar los anticuerpos antiantígeno y, opcionalmente, anticuerpos específicos de antígeno. Los procedimientos para la purificación (parcial) de anticuerpos a partir de calostro o leche están presentes en la técnica.

Debe apreciarse además que se puede añadir cualquier adyuvante a las composiciones de la presente invención. Por lo tanto, los adyuvantes apropiados pueden ser cualquier antígeno, anticuerpo, glicoesfingolípidos, proteínas, citocinas, moléculas de adhesión y componentes que puedan activar o alterar la función de la célula presentadora de antígenos o de cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario, de manera directa o indirecta.

De manera alternativa, los anticuerpos derivados de material hiperinmune que se unen a antígenos de *C. difficile* pueden ser un anticuerpo purificado por afinidad o cualquier fragmento del mismo. El término "anticuerpo" pretende incluir tanto moléculas intactas como fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión tisular no específica que un anticuerpo intacto. Se apreciará que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden utilizar para inmunomodulación, según los procedimientos dados a conocer en el presente documento, para moléculas de anticuerpo intactas. Dichos fragmentos se producen normalmente mediante escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Según otra realización, la composición de la presente invención puede opcionalmente comprender, además, uno o más componentes de calostro tales como, por ejemplo, alarminas, defensinas, colostrina, y cualquier otro carbohidrato, glicolípidos o cualquier otra molécula o componente derivado de calostro o leche, que pueda mejorar más o inhibir la modulación de una respuesta inmunitaria, o cualquier preparación, mezcla o combinación de los mismos. Además, la composición de la presente invención puede comprender cualquier adyuvante adicional. Por lo tanto, los adyuvantes apropiados pueden ser cualquier antígeno, anticuerpo, glicoesfingolípidos, proteínas, citocinas, moléculas de adhesión y componentes que puedan activar o alterar la función de la célula presentadora de antígenos o de cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de manera directa o indirecta.

En algunas realizaciones de la composición, la composición comprende un constituyente de un huevo de ave, en el que el huevo de ave comprende IgY específica para la toxina B, un antígeno de células vegetativas o un antígeno de endospora o un fragmento del mismo. La yema de huevo cruda se puede utilizar como fuente de anticuerpos. Sin embargo, los anticuerpos aviares generalmente se purifican o concentran a partir de la yema antes de su utilización. El constituyente del huevo de ave se puede concentrar o purificar según sea necesario, tal como entienden los expertos en la materia. En algunas realizaciones de la composición, la composición comprende la yema del huevo, o cualquier fracción de la misma que contenga el anticuerpo IgY. La yema es preferente a la clara del huevo, ya que la yema normalmente contiene concentraciones mucho más elevadas de IgY que la clara. Sin embargo, la clara puede contener concentraciones de IgY suficientes para algunas aplicaciones.

En algunas realizaciones de la composición de anticuerpos, la IgY se concentra, aísla o purifica a partir del constituyente del huevo de ave. Esto se puede conseguir mediante una variedad de procedimientos. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden purificar mediante el procedimiento de dilución en agua. A continuación, el precipitado se puede eliminar mediante cualquier procedimiento convencional, incluida la centrifugación. A continuación, el sobrenadante se puede conservar congelado, por ejemplo, a -20 °C. A continuación, se puede aislar la IgY mediante precipitación con sulfato de amonio y posterior diálisis. Si se desea, el título de anticuerpos IgY se puede determinar mediante inmunoensayo, por ejemplo, ELISA. El procedimiento de dilución en agua se describe más completamente en la bibliografía bien conocida, por ejemplo, por Akita y Nakai (1993). Otros procedimientos útiles se describen, por ejemplo, en la Patente US4,550,019, la Patente US4,748,018 y la Patente US2004/0161427. Los kits comerciales están disponibles, por ejemplo, de Promega Corporation (Madison, Wisconsin).

Algunas realizaciones de la composición de anticuerpos están sustancialmente aisladas. En dichas realizaciones, se ha eliminado una fracción significativa de un componente de yema que no es un anticuerpo. El componente de yema que no es anticuerpo puede ser, por ejemplo, el componente lipídico de la yema, el componente de carbohidrato de la yema, los gránulos de yema, el componente hidrofóbico de la yema, el componente esteroideo de la yema y el componente proteico que no es inmunoglobulina de la yema. La fracción del componente eliminado es de, como mínimo, el 50 %. En algunas realizaciones, la fracción eliminada es, como mínimo, el 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 99,9 %. Las fracciones eliminadas mayores tienen la ventaja de producir una composición de anticuerpos más pura. Las fracciones eliminadas más pequeñas tienen la ventaja de requerir menos procesamiento.

Algunas realizaciones de la composición de anticuerpos están sustancialmente concentradas. En dichas realizaciones, la concentración de IgY será mayor en la composición que en la yema de huevo. Las composiciones de anticuerpos sustancialmente concentradas comprenden IgY que está, como mínimo, dos veces más concentrada que en la yema. Algunas realizaciones de la composición de anticuerpos sustancialmente concentrada se concentran en, como mínimo, un factor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 1000 o 10.000. Las composiciones de anticuerpos más concentradas tienen la ventaja de proporcionar la misma masa de anticuerpos en un volumen menor. Las composiciones de anticuerpos menos concentradas tienen la ventaja de requerir menos procesamiento.

Las composiciones de anticuerpos de la presente divulgación se pueden procesar para eliminar en gran medida todos los isotipos excepto IgG e IgY. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina se puede derivar a partir de numerosos donantes. Se puede utilizar cualquier número de donantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos se derivan de un donante. En realizaciones adicionales, los anticuerpos se derivan de 1-10 donantes. En realizaciones adicionales, los anticuerpos se derivan de 10-100 donantes. En realizaciones adicionales, los anticuerpos se derivan de 100-1000 donantes. En aún realizaciones adicionales, los anticuerpos se derivan de más de 1000 donantes.

La utilización de huevos de gallinas criadas para la producción de huevos o carne, y que son vacunadas según este propósito, tiene la gran ventaja de utilizar como materia prima para el proceso huevos que están ampliamente disponibles en el mercado en grandes volúmenes y a muy bajo precio. Anteriormente, los animales utilizados para la producción de anticuerpos se criaban única o principalmente con ese fin y se mantenían en pequeñas cantidades a un coste muy elevado.

La composición se formula para administración oral.

Se esperaría que los anticuerpos administrados por vía oral se degradaran en el tracto gastrointestinal, dado el bajo pH gástrico y la presencia de proteasas gástricas e intestinales. Sin embargo, la IgG de calostro bovino (BCIg, *bovine colostral IgG*) se ha citado como particularmente resistente a la destrucción GI, en relación con otras inmunoglobulinas. Los primeros estudios de BCIg citaron una notable "resistencia a la digestión proteolítica en el intestino de un huésped heterólogo". También hay pruebas de que la IgG1 bovina es algo más resistente a la proteólisis mediante tripsina, quimotripsina y pepsina que otras Ig. Estos resultados impulsaron gran parte del desarrollo inicial de la terapia con anticuerpos orales. Más específicamente, la composición de la presente invención puede ser adecuada para administración mucosal, por ejemplo, administración pulmonar, bucal, nasal, intranasal, sublingual, rectal, vaginal y cualquier combinación de las mismas.

Además, los anticuerpos que se unen a una toxina B, un antígeno de células vegetativas o un antígeno de endospora utilizados por las composiciones y composiciones combinadas de la presente invención se pueden preparar en preparaciones tales como aditivos alimentarios, soluciones acuosas, preparaciones oleosas, emulsiones, geles, etc., y estas preparaciones se pueden administrar por vía oral. Las preparaciones se pueden administrar en formulaciones de dosificación que contienen vehículos aceptables no tóxicos convencionales y también pueden incluir uno o más aditivos aceptables, entre los que se incluyen sales, polímeros, disolventes, tampones, excipientes, agentes de carga, diluyentes, excipientes, agentes de suspensión, agentes lubricantes, adyuvantes, vehículos, sistemas de administración, emulsionantes, disgregantes, absorbentes, conservantes, surfactantes, colorantes, saborizantes o edulcorantes aceptables. Una forma de dosificación opcional de la presente invención puede ser un polvo para incorporar a bebidas, píldoras, jarabes, cápsulas, comprimidos, gránulos, perlas, pastillas masticables o aditivos alimentarios, utilizando técnicas conocidas en el sector. De este modo, la composición inmunomoduladora de la presente invención se puede administrar en una forma seleccionada entre el grupo que consiste en polvos, píldoras, cápsulas, téis, extractos, extractos secos, sublinguales, aerosoles,

dispersiones, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, y geles activos por vía oral.

Las formulaciones terapéuticas se pueden administrar en cualquier formulación de dosificación convencional. Las formulaciones normalmente comprenden, como mínimo, un principio activo, tal como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo.

Cada vehículo debe ser aceptable farmacéutica y fisiológicamente en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes y no perjudicial para el paciente. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para la administración oral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica farmacéutica. La naturaleza, disponibilidad y fuentes, y la administración de todos estos compuestos, incluidas las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un individuo, son bien conocidas en la técnica y no es necesario describirlas adicionalmente en el presente documento.

La preparación de composiciones farmacéuticas es bien conocida en la técnica y se ha descrito en muchos artículos y libros de referencia, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1990, y especialmente las págs. 1521-1712 en el mismo.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar y dosificar según la buena práctica médica.

La composición de la presente invención puede comprender el principio activo en forma libre y administrarse directamente al individuo a tratar. Las formulaciones comprenden normalmente, como mínimo, un ingrediente activo, tal como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo. Cada vehículo debe ser aceptable farmacéutica y fisiológicamente en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes y no perjudicial para el paciente.

Las formulaciones son aquellas adecuadas para la administración oral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica farmacéutica. La naturaleza, disponibilidad y fuentes, y la administración de todos estos compuestos, incluidas las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un individuo, son bien conocidas en la técnica y no es necesario describirlas adicionalmente en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención generalmente comprenden un agente tampón, un agente que ajusta la osmolaridad del mismo y, opcionalmente, uno o más vehículos, excipientes y/o aditivos aceptables farmacéuticamente, tal como es conocido en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios en las composiciones. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante la utilización de surfactantes.

Tal como se utiliza en el presente documento, "vehículo aceptable farmacéuticamente" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares. La utilización de dichos medios y agentes para principios activos farmacéuticos es bien conocido en la técnica. Excepto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su utilización en la composición terapéutica.

En los casos en los que la administración oral es en forma de comprimido o cápsula, los componentes activos del fármaco (anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile*, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile*) se pueden combinar con un vehículo inerte no tóxico aceptable farmacéuticamente, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, azúcares modificados, almidones modificados, metilcelulosa y sus derivados, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y otros azúcares reductores y no reductores, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearilfumarato de sodio, behenato de glicerilo, estearato de calcio y similares. Para la administración oral en forma líquida, los componentes del fármaco activo se pueden combinar con vehículos inertes no tóxicos aceptables farmacéuticamente, tales como etanol, glicerol, agua y similares. Cuando se desee o se requiera, también se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes y agentes colorantes y aromatizantes adecuados. También se pueden añadir agentes estabilizantes, tales como antioxidantes, galato de propilo, ascorbato de sodio, ácido cítrico, metabisulfito de calcio, hidroquinona y 7-hidroxycumarina para estabilizar las formas de dosificación. Entre otros compuestos adecuados se pueden incluir gelatina, edulcorantes, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginatos, carboximetilcelulosa, polietileno, glicol, ceras y similares.

Según una realización, los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile*, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* y/o los anticuerpos que se unen a,

como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* utilizados para la presente invención comprenden inmunoglobulina monomérica, dimérica o multimérica seleccionada entre el grupo que consiste en IgG, IgA e IgM y cualquier fragmento, mezcla o combinación de las mismas.

5 Los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* y/o los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se pueden utilizar para fabricar una composición o composición combinada que opcionalmente puede comprender además uno o más componentes de calostro, leche o productos lácteos y cualquier adyuvante o adyuvantes, preferentemente, alarminas, defensinas, colostrina y cualquier preparación, mezcla o combinación de los mismos. Debe apreciarse, además, que la composición de la presente invención puede comprender cualquier adyuvante adicional. Por lo tanto, los adyuvantes apropiados pueden ser cualquier antígeno, anticuerpo, glicoesfingolípidos, proteínas, citocinas, moléculas de adhesión y componente que pueda activar o alterar la función de la célula presentadora de antígenos o de cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de manera directa o indirecta. Cabe señalar que, según ciertas realizaciones, la presente invención da a conocer, además, la utilización de calostro o cualquier preparación derivada del calostro en las composiciones combinadas de la presente invención para potenciar un efecto inmunomodulador de un agente terapéutico inmunomodulador.

El término alarmina denota una serie de proteínas del huésped multifuncionales estructuralmente diversas que se liberan rápidamente durante la infección o el daño tisular, y que tienen efectos de movilización y activación en las células que expresan receptores involucradas en la defensa del huésped y la reparación del tejido. Entre los mediadores inmunitarios innatos que tienen función de alarmina se incluyen defensinas, neurotoxina derivada de eosinófilos, catelicidinas y HMGB1.

Las defensinas son proteínas catiónicas pequeñas (15-20 residuos) ricas en cisteína que se encuentran tanto en vertebrados como en invertebrados. Son activas contra bacterias, hongos y virus envueltos. Consisten en 15-20 aminoácidos que incluyen de seis a ocho residuos de cisteína conservados. Las células del sistema inmunitario contienen estos péptidos para ayudar a eliminar las bacterias fagocitadas, por ejemplo, en los granulocitos de los neutrófilos y en casi todas las células epiteliales. La mayoría de las defensinas funcionan al penetrar la membrana celular de los microbios a través de la atracción eléctrica y, una vez incrustadas, forman un poro en la membrana que permite el flujo.

El término "colostrina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que, en su forma natural, se obtiene del calostro de mamíferos. La colostrina se conoce a veces como "colostrina", y tiene un peso molecular en el intervalo de 16.000 a 26.000 Dalton. La colostrina puede formar un dímero o trímero de subunidades (que tienen, cada una, un peso molecular en el intervalo de 5.000 a 10.000 Dalton, preferentemente 6.000 Dalton), y contiene principalmente prolina (la cantidad de prolina es mayor que la cantidad de cualquier otro aminoácido individual). La colostrina se caracteriza porque estimula la producción de citocinas, especialmente interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral TNF- α), interleucinas (por ejemplo, IL-6 e IL-10) y diversos factores de crecimiento.

Los anticuerpos se derivan del calostro hiperinmune.

Los inventores de la presente invención han demostrado que cuando se coadministra a un mamífero bovino con más de una vacuna, por ejemplo, una vacuna que comprende la toxina B de *Clostridium difficile* y una vacuna que comprende células vegetativas de *Clostridium difficile*, o se coadministra con una vacuna que comprende la toxina B de *Clostridium difficile* y una vacuna que comprende endosporas de *Clostridium difficile*, la respuesta inmunitaria puede estar sesgada hacia una de las vacunas coadministradas.

Por consiguiente, en una realización, el material hiperinmune se prepara mediante la vacunación de un primer grupo de uno o más mamíferos con una vacuna que comprende la toxina B de *Clostridium difficile*, y la vacunación de un segundo grupo de uno o más mamíferos con una vacuna que comprende células vegetativas de *Clostridium difficile* y la vacunación de un tercer grupo de uno o más mamíferos con una vacuna que comprende endosporas de *Clostridium difficile* y mezcla posterior del material hiperinmune de los grupos.

La administración de la composición de la presente invención se lleva a cabo mediante la administración de una cantidad/dosis eficaz terapéuticamente de los compuestos de la composición a un individuo que necesite dicho tratamiento o profilaxis. La necesidad de una administración profiláctica se determina mediante la utilización de los factores de riesgo bien conocidos, tal como se han descrito en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, "paciente" o "individuo" incluye organismos que son capaces de sufrir una infección por *C. difficile* o CDAD, tales como, sin limitación, seres humanos y animales no humanos.

Una "cantidad eficaz terapéuticamente" se refiere a la cantidad del anticuerpo que, cuando se administra solo o en combinación a un paciente para tratar la CDAD o, como mínimo, uno de los síntomas clínicos de la CDAD, es suficiente para realizar dicho tratamiento de la enfermedad, o síntoma. La cantidad eficaz terapéuticamente puede variar según, por ejemplo, el anticuerpo, la infección y/o los síntomas de la infección, la gravedad de la infección y/o

los síntomas de la infección, la edad, el peso y/o la salud del paciente a tratar, y el juicio del médico prescriptor. Los expertos en la materia pueden establecer una cantidad eficaz terapéuticamente apropiada en cualquier caso dado o pueden determinarla mediante experimentación rutinaria. Una cantidad eficaz terapéuticamente es también aquella en la que los efectos beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo.

Una "cantidad eficaz profilácticamente" es cualquier cantidad del anticuerpo que, cuando se administra solo o en combinación a un paciente, inhibe o retrasa la aparición o la recurrencia de la CDAD o, como mínimo, uno de los síntomas clínicos de la CDAD. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz profilácticamente evita por completo la aparición o recurrencia de la infección por *C. difficile*. "Inhibir" la aparición significa disminuir la probabilidad de la aparición de la infección o prevenir la aparición por completo. El término incluye prevenir la aparición de los síntomas del trastorno en un individuo con riesgo de desarrollar el trastorno.

Cada forma de dosificación oral puede, por ejemplo, comprender el equivalente de calostro de hasta 20 g por día pero, preferentemente, menos de 1200 mg (en peso seco), preferentemente, menos de 800 mg, preferentemente, menos de 400 mg, más preferentemente, menos de 200 mg. Por equivalente de calostro se hace referencia a la cantidad de calostro crudo, sin importar cómo esté purificado, que se procesa para proporcionar el contenido de una forma de dosificación.

Para la administración oral, la forma de dosificación oral puede comprender de 5 mg a 800 mg de polvo de calostro bovino (BCP, *bovine colostrum powder*) (en peso seco), por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 500, 550, 600, 650, 700, 750 u 800 mg.

Los intervalos de dosificación adecuados son, por ejemplo, aproximadamente, de 30 mg a, aproximadamente, 20.000 mg/día, preferentemente, de 50 mg a, aproximadamente, 5000 mg/día, más preferentemente, de 500 mg a, aproximadamente, 5000 mg/día o, de la manera más preferente, de 1500 mg a, aproximadamente, 2000 mg/día de BCP (en peso seco). En una realización preferente, la dosis es de 1800 mg/día de BCP (en peso seco).

En una realización, la composición se formula para la administración a una dosis de, aproximadamente, 30 mg a, aproximadamente, 10000 mg por día, o se formula para la administración a una dosis de, aproximadamente, 1800 mg por día.

En una realización, la composición se administra a una dosis de, aproximadamente, 30 mg a, aproximadamente, 10000 mg por día, o se administra a una dosis de, aproximadamente, 1800 mg por día.

En una realización, los anticuerpos están presentes en la composición para administración oral en una cantidad suficiente para proporcionar, como mínimo, un 30 % en peso seco de la composición de IgG.

Por consiguiente, para la administración oral, la forma de dosificación oral puede comprender de 1,5 mg a 240 mg de IgG, por ejemplo, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 125, 150, 175, 200, 240, 400, 600, 800 o 1.000 mg de IgG.

En otra realización, los anticuerpos están presentes en la composición para administración oral en una cantidad suficiente para proporcionar, como mínimo, el 36 % en peso de la composición de IgG.

Los intervalos de dosificación adecuados son por ejemplo de, aproximadamente, 10 a, aproximadamente, 3.333 mg/día, preferentemente, de 20 a, aproximadamente, 4000 mg/día, más preferentemente, de 200 a, aproximadamente, 2000 mg/día o, de la manera más preferente, de 600 mg a, aproximadamente, 800 mg/día de IgG. En una realización preferente, la dosis es de 600 mg/día de IgG.

En una realización, los anticuerpos que se unen al antígeno están presentes en la composición para administración oral en una cantidad suficiente para proporcionar, como mínimo, un 5 % de IgG específica del peso de IgG.

Por consiguiente, para la administración oral, la forma de dosificación oral puede comprender de 0,075 mg a 12 mg de IgG específica, por ejemplo, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11,0 o 12 mg de IgG específica.

En una realización, los anticuerpos que se unen al antígeno están presentes en la composición para administración oral en una cantidad suficiente para proporcionar, como mínimo, el 10 % de IgG específica del peso de IgG.

Los intervalos de dosificación adecuados son por ejemplo de, aproximadamente, 0,5 a, aproximadamente, 167 mg/día, preferentemente, de 10 a, aproximadamente, 150 mg/día, más preferentemente, de 15 a, aproximadamente, 100 mg/día o, de la manera más preferente, de 30 mg a, aproximadamente, 100 mg/día de IgG específica. En una realización preferente, la dosis es de 30 mg/día de IgG específica.

La forma de dosificación oral se puede administrar durante, aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días.

En una realización, la composición se administra durante 30 días.

5 Los inventores de la presente invención han demostrado que la administración de las composiciones de la presente invención, antes de la infección con *C. difficile*, es eficaz para tratar y prevenir los síntomas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, entre los que se incluyen el daño gastrointestinal, la infección por *C. difficile*, la excreción de *C. difficile* en las heces y la mortalidad asociada a *C. difficile*.

10 Los ejemplos 5 y 6 y las figuras 5, 7, 8, 17, 18 y 19 demuestran que la administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile*, antes de la infección por *C. difficile* y durante o después de la misma, es eficaz para tratar y prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile* en ratones, incluida la mortalidad asociada a *C. difficile* y el daño gastrointestinal.

15 El ejemplo 10 y la figura 11 demuestran que la administración de anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile*, antes de la infección por *C. difficile* y durante o después de la misma, es eficaz para tratar y prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile*, la mortalidad asociada a *C. difficile* y para reducir la excreción de *C. difficile* y la transmisión de *C. difficile* después de la infección.

20 El ejemplo 13 y la figura 15 demuestran que la administración de anticuerpos que se unen a las células vegetativas de *C. difficile* antes de la infección con *C. difficile* y durante la misma es eficaz para tratar y prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile*.

25 El ejemplo 16 y la figura 17 demuestran que la administración de una combinación de anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* antes de la infección con *C. difficile* y durante la misma es eficaz para tratar y prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Por consiguiente, en una realización, la composición se administra antes de que aumente el riesgo de contraer la infección por *C. difficile*.

30 En una realización, la composición se administra durante, como mínimo, 3 días antes de que aumente el riesgo de contraer la infección por *C. difficile*.

35 En otra realización, la composición se administra durante, como mínimo, 3, 4, 5, 6 o 7 días antes de que aumente el riesgo de contraer la infección por *C. difficile*.

En una realización, la composición se administra antes del ingreso en un hospital o en una residencia de ancianos, o en el momento del ingreso en un hospital o en una residencia de ancianos.

40 En una realización, la composición se administra durante el ingreso en un hospital o en una residencia de ancianos.

En una realización, la composición se administra para prevenir la recaída de una infección previa.

45 En otra realización, una composición de la presente invención se administra después de la infección con *C. difficile*. Por ejemplo, una composición de la presente invención se puede administrar, como mínimo, 2 horas después de la infección, como mínimo, 4 horas después de la infección, como mínimo, 12 horas después de la infección o, como mínimo, 24 horas después de la infección con *C. difficile*.

50 La forma de dosificación oral comprende, preferentemente, calostro derivado del calostro hiperinmune y/o calostro que se ha añadido a los anticuerpos policlonales según las enseñanzas de la Patente WO/2003/080082. La forma de dosificación oral también puede comprender un sistema tampón tal como el dado a conocer en la Patente WO/2006/053383.

55 La magnitud de la dosis profiláctica o terapéutica de los ingredientes activos puede variar, por supuesto, con la naturaleza de la gravedad de la afección a tratar. También puede variar según la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y se puede administrar al individuo en dosis únicas o divididas. Por otro lado, en algunos casos, puede ser necesario utilizar dosis fuera de los intervalos dados a conocer en el presente documento.

60 La presente invención se describirá ahora más completamente con referencia a los siguientes ejemplos, que no constituyen limitación.

Ejemplo 1 (no según la presente invención): Determinación de la dosis infecciosa de endosporas de *C. difficile* para experimentos *in vivo*

65 Se realizaron dos ensayos independientes con ratones para determinar la dosis infecciosa mínima de endosporas de KI que se puede administrar a los ratones y que da como resultado una enfermedad asociada a *C. difficile* medible.

Para estos estudios, se infectaron grupos de 3 ratones por sonda oral con 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 endosporas generadas a partir de la cepa KI de *C. difficile*. Se supervisó la morbilidad (medida mediante la pérdida de peso) y la colonización (medida mediante la excreción de esporas) de los ratones, y se sacrificaron humanitariamente en diferentes momentos (entre 12 y 96 horas). La enfermedad asociada a *C. difficile* en ratones también se examinó utilizando histopatología.

La figura 1 muestra que la infección de ratones C57/BL6 con 10^3 endosporas de KI dio como resultado una enfermedad asociada a *C. difficile* medible (pérdida de peso)

La figura 2 muestra que la infección de ratones C57/BL6 con 10^3 endosporas de KI dio como resultado una colonización con *C. difficile* medible (según se determina mediante la excreción de esporas en las heces).

La figura 3 muestra el cambio histopatológico en el ciego y el colon de ratones infectados, lo que indica que una dosis de 10^3 endosporas es suficiente para causar un daño gastrointestinal grave asociado a *C. difficile* después de 48 horas de infección.

Estos resultados indican que la dosis infecciosa de endosporas se puede reducir a 10^3 endosporas por ratón.

Ejemplo 2 (no según la presente invención): Producción de anticuerpos que se unen a un antígeno de *C. difficile*

Preparación de antígeno

Se utilizaron con modificaciones los procedimientos para preparar microbios o antígenos que contienen productos microbianos informados en la Patente WO/2004/078209.

En resumen, se prepararon antígenos bacterianos para la producción de vacunas a partir de *C. difficile*. Se produjeron los siguientes antígenos:

1. Toxina B de *C. difficile*
2. Células vegetativas de *C. difficile*
3. Endosporas de *C. difficile*
4. Preparaciones de la capa S de *C. difficile*

Las vacunas se prepararon emulsionando un volumen igual de cada antígeno con el mismo volumen de adyuvante Montanide ISA206VG.

1. Toxina B

Se utilizó como antígeno toxina B recombinante de *C. difficile* de la cepa 630. En resumen, se inocularon 2 volúmenes de 500 ml de caldo Terrific K⁺ fosfato + 50 mg/ml de kanamicina en un matraz de 2 l con 5 ml de cada una de las células de *E. coli* BL21 que expresaban toxB (clon CSB1 (CSB4P x 2B1) (toxB(NIX): PET30R: BL21 (DE3)) y cultivo durante toda la noche (dilución 1:100), incubado a 37 °C, 225 rpm. La expresión de toxina B se indujo a las 3½ horas con una concentración final de IPTG de 0,1 mM (40 µl o IPTG 0,5 M/matraz), se incubó a 250 rpm, 37 °C durante 4,5 horas. Los cultivos se centrifugaron para sedimentar el cultivo en cubetas de 250 ml en un rotor GSA y una centrifuga Sorvall a 16.000 x g durante 15 minutos 4 °C. Se descartó el sobrenadante y los sedimentos se almacenaron a -20 °C. Los sedimentos se resuspendieron en la Solución I (3 x 40 ml volúmenes), se incubaron en una rueda giratoria a 4 °C durante toda la noche a baja velocidad, se sonicaron utilizando una sonda grande en un ajuste bajo (aproximadamente 50) con ráfagas de 20 segundos con 40 segundos de pausa en hielo), se centrifugaron en un rotor SS34 en cubetas de 50 ml a 11.000 durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se agruparon y se añadió resina de níquel proffinity, y se agitaron lentamente durante toda la noche a 4 °C, se centrifugaron en volúmenes de 50 ml para recoger la resina a 100 x g, 5 minutos a temperatura ambiente, sin freno y flujo continuo retenido, se lavaron con 2 volúmenes de 50 ml de Solución II, se centrifugaron como antes, se eluyeron en 4,5 ml de Solución III, se recogieron en 4 fracciones (fracción 1 = 05 ml; 2 = 2 ml, 3 = 1 ml cada una), se neutralizaron con unas gotas de NaOH 0,1 N y se almacenaron a 4 °C.

También se utilizó la toxina B purificada a partir del sobrenadante del cultivo de un aislado australiano hipervirulento de *C. difficile*, cepa KI. También se utilizó la toxina B aislada del sobrenadante del cultivo de un aislado animal australiano de *C. difficile*, cepa AI35, negativo a la toxina A y positivo a la toxina B de origen natural. Las toxinas se purificaron parcialmente de la siguiente manera: en resumen, se cultivó *C. difficile* durante toda la noche en agar Heart Infusion complementado con taurocolato de sodio al 1 % (p/v), glucosa al 1,5 % (p/v) y L-cisteína al 1 % (p/v). Las colonias se utilizaron para inocular volúmenes de 500 ml de caldo de levadura de triptona (3,0 % de triptona, 2,0 % de extracto de levadura y 0,1 % de tioglicolato de sodio) y los cultivos se cultivaron durante 3 días, después de

lo cual las células se sedimentaron mediante centrifugación (10.000 g, 15 min, 4 °C). Para la toxina B de la cepa KI, se concentró 1 l de sobrenadante hasta un volumen final de 20 ml (X50). Para la toxina B de la cepa AI35, se concentraron 3 l de sobrenadante hasta un volumen final de 20 ml (X150). A continuación, los sobrenadantes del cultivo se esterizaron mediante filtración (filtros de 0,45 µm, seguidos de filtros de 0,2 µm) y se concentraron utilizando un casete de concentración de 100.000 MWCO (Sartorius). Los sobrenadantes se dializaron utilizando PBS durante la concentración. Los sobrenadantes se trataron con formaldehído (1 % del volumen final) durante toda la noche a 4 °C, seguido de diálisis y concentración posterior para eliminar el exceso de formaldehído antes de la vacunación de las vacas. El sobrenadante de toxina se ajustó a 1 mg/ml (según lo determinado mediante el ensayo BCA) y se mezcló con adyuvante para la vacunación de vacas.

2. Células vegetativas de *C. difficile*

Se germinaron las endosporas de KI en agar HIS que contenía taurocolato de sodio al 10 % p/v (24-48 horas de incubación anaeróbica a 37 °C). Se realizó el pase de KI dos veces en agar HIS complementado con taurocolato de sodio al 10 % p/v (24 horas de incubación anaeróbica a 37 °C). Se seleccionó una colonia de la placa final y se utilizó para inocular caldo HIS (5 ml) que contenía taurocolato de sodio al 10 % p/v. Posteriormente, este caldo se diluyó en serie a 10^{-7} y los 8 cultivos se incubaron durante toda la noche (aproximadamente 10 horas) en condiciones anaeróbicas a 37 °C. Después de la incubación, se midió la densidad óptica (OD, *optical density*) de todos los cultivos a 600 nm. Se utilizó una dilución 1:100 del cultivo en su fase de crecimiento exponencial media (OD_{600 nm} 0,40 - 0,70) para inocular caldo HIS (20 ml) que contenía 10 % p/v de taurocolato de sodio y se cultivó hasta OD_{600 nm} 0,50. Se utilizó una dilución 1:100 de este cultivo para inocular caldo HIS (500 ml) que contenía taurocolato de sodio al 10 % p/v y se hizo crecer hasta OD_{600 nm} 0,50 - 0,70. Para recolectar las células, los cultivos se centrifugaron a 3.200 x g durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces utilizando PBS (centrifugando a 3200 x g durante 20 minutos a 4 °C entre lavados). Las células se fijaron utilizando formaldehído al 1 % en PBS durante toda la noche a 4 °C. Después de la fijación, las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el formaldehído. Se resuspendieron en un volumen final de 20 ml y posteriormente se ajustaron a, aproximadamente, $2,25 \times 10^{10}$ células/ml. Se utilizó 1 ml de células para las vacunaciones.

3. Endosporas de *C. difficile*

Las endosporas de *C. difficile* se prepararon mediante procedimientos de rutina. En resumen, se cultivaron las cepas de *C. difficile* en volúmenes de 500 ml de caldo de levadura de triptona (3,0 % de triptona, 2,0 % de extracto de levadura y 0,1 % de tioglicolato de sodio) en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 7-10 días para inducir la esporulación. Posteriormente, las endosporas se recolectaron mediante centrifugación a 7.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se lavaron de 4 a 6 veces con PBS dH₂O estéril antes de aplicar un choque térmico a 60 °C durante 20 min para destruir las células vegetativas supervivientes y se almacenaron en dH₂O estéril a 4 °C hasta que se requirieron. A continuación, se cuantificaron las endosporas antes de utilizarlas sembrando diluciones en serie de diez veces de las endosporas en taurocolato-cefoxitina-D-cicloserina-fructosa-agar (TCCFA). Cada vaca recibió $2,8 \times 10^9$ endosporas en la vacunación.

4. Preparaciones de capa S de *C. difficile*

Para preparar las preparaciones de la capa S, se hacen crecer cultivos de KI durante toda la noche utilizando caldo HIS. Las células se recolectan mediante centrifugación a 3200 x g durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez con PBS, posteriormente se resuspendieron en 0,04 volúmenes de glicina 0,2 M a pH 2,2 y se incubaron, mezclando consecutivamente, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante que contenía proteínas de la capa S. El sobrenadante se neutralizó utilizando Tris 2 M a pH 9,0. La SLP se dializó durante toda la noche en PBS con múltiples cambios de tampón. La proteína total se cuantificó utilizando un ensayo BCA y se ajustó a 1,0 mg/ml. Se utilizó formalina al 0,3 % para la fijación y se dejó durante 3 días.

Preparación de calostro hiperinmune que comprende anticuerpos

Se utilizaron los procedimientos para preparar anticuerpos antimicrobianos o de productos microbianos a partir de ganado vacunado informados en la Patente WO/2004/078209.

En resumen, la vacuna antigénica se administró a vacas lecheras durante las últimas ocho semanas de gestación. El calostro se recogió de vacas inmunizadas hasta 48 horas después del parto. El calostro se recogió en recipientes individuales y se mantuvo congelado hasta su procesamiento. En resumen, la grasa de la leche se eliminó mediante centrifugación y la leche desnatada se pasteurizó a 63,5 °C durante 30 minutos. El calostro se enfría rápidamente a 4 °C (en hielo), posteriormente se deja durante toda la noche a 4 °C, se centrifuga, se filtra a través de Kimwipes y se concentra hasta que se elimina el 30-35 % del volumen original utilizando un casete de MWCO de 30.000. Después de la concentración (eliminación de lactosa y sales), se realiza la diafiltración añadiendo agua MilliQ, el agua MilliQ se añade al calostro concentrado para devolver el volumen a la cantidad original. El calostro se vuelve a concentrar hasta, aproximadamente, el 60 % del volumen original. El calostro se divide en alícuotas y se almacena a -20 °C o se liofiliza y se almacena a temperatura ambiente hasta que se necesite.

Ejemplo 3 (no según la presente invención): Detección de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* mediante ELISA

- 5 Se utilizó toxina B de *C. difficile* recombinante de la cepa 630 en una vacuna antigénica, vacas inmunizadas y calostro hiperinmune purificado tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

10 Las placas se recubrieron con toxina B recombinante purificada de la cepa 630 [1 µg/ml] en tampón de carbonato [pH 9,6], 100 µl/pocillo, durante toda la noche, 4 °C. La toxina B se preparó en glicerol al 10 %, a 1,94 mg/ml. Las placas se lavaron 6 veces en tampón PBS-Tween al 0,05 %, que comprendía NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, pH 7,4. Se diluyeron 100 µl de cada calostro de prueba preparado a partir de vacas, tal como se ha descrito en el ejemplo 2 en PBS-Tween que contenía 12 mg/ml de caseína, se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron 6 veces en tampón PBS-Tween, después de lo cual se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado anti-IgG bovina-peroxidasa de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama, EE. UU.), diluido 1:10.000 en PBS-Tween-caseína. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se lavaron 6 veces. Se añadieron 100 µl de sustrato de peroxidasa (Kirkegaard y Perry Lab. Inc., Gaithersburg, Maryland, EE. UU.) a cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente hasta que se reveló el color (7 minutos). La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 2 M y las placas se leyeron en un lector de placas Diagnostics Pasteur LP400 (Sanofi, Marnes-la-Coquette, Francia) a 450 nm-630 nm. Los resultados se expresaron como la O.D. neta promedio (después de restar la reacción del blanco) de pocillos duplicados analizados en, como mínimo, dos ocasiones distintas.

25 Se tomaron los títulos de punto final de los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* de tres vacas, respectivamente. Estos datos indican que el calostro hiperinmune bovino producido contra una vacuna que comprende la toxina B de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile*.

30 Además, se descubrió que la concentración total de anticuerpos IgG de una composición de calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a la toxina B de *C. difficile* está entre 199 y 415 mg de IgG por gramo de polvo de calostro bovino (BCP) según se determina mediante ELISA de IgG.

La figura 6 demuestra que el calostro hiperinmune bovino generado contra una vacuna que comprende la toxina B recombinante de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile*.

35 La figura 6 muestra también que el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B recombinante de la cepa 630 de *C. difficile* comprende anticuerpos IgG.

Ejemplo 4 (no según la presente invención): Detección de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* mediante inmunotransferencia

40 Se examinó el calostro derivado de vacas vacunadas con toxina B recombinante (toxina B de cepa 630) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2 para determinar su capacidad de unirse a la toxina A histórica purificada comercial (toxina A-Hist), a la toxina B histórica purificada (toxina B-Hist) o la toxina B de la cepa hipervirulenta 027 (toxina B-HV).

45 La figura 4 demuestra que el calostro hiperinmune bovino generado contra una vacuna que comprende la toxina B de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile*.

50 Se cargaron los carriles con 50 µg de proteína purificada, se fraccionaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y posteriormente se sondaron con anticuerpos que se aislaron del calostro de una vaca no inmunizada o una vaca vacunada con toxina B recombinante.

55 El calostro de la vaca vacunada con toxina B de una primera cepa (cepa 630) contenía anticuerpos que se unían a la toxina B de otras cepas; toxina B que fue purificada a partir de una cepa histórica de *C. difficile* y toxina B purificada a partir de una cepa hipervirulenta de *C. difficile* (figura 4B). Los anticuerpos no se unieron a la toxina A (figura 4B).

Además, cuando se probó contra un panel de toxinas aisladas de los sobrenadantes de cultivo de diversas otras cepas de *C. difficile*, se demostró que los anticuerpos que se unían a la toxina B de *C. difficile* de una primera cepa se unían a la toxina B de *C. difficile* de cepas de *C. difficile* adicionales (diferentes) (figuras 4D y E).

60 Esto demuestra que los anticuerpos derivados de vacas que fueron vacunadas con la toxina B recombinante de 630 son capaces de unirse a la toxina B de otras cepas de *C. difficile*.

Ejemplo 5 (no según la presente invención): Demostración de que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* neutralizan la citotoxicidad de la toxina B

Los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile*, tal como los que se han descrito anteriormente, se examinaron en cuanto a su capacidad para neutralizar la citotoxicidad de la toxina B *in vitro*.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron utilizando células Vero (1×10^4 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos. Se incubaron diferentes cantidades de toxina B purificada comercial (200 pg, 100 pg, 50 pg o 10 pg/pocillo) durante 90 minutos con IgG purificada a partir del calostro de una vaca no vacunada y de una vaca vacunada con toxina B recombinante. Se utilizó anticuerpo anti-toxina B comercial como control positivo. También se incluyeron como controles 200 pg, 100 pg, 50 pg o 10 pg/pocillo de toxina comercial sola. Después de la incubación de la toxina con la IgG de calostro, se añadieron las diferentes mezclas a las células Vero (100 μ l/pocillo). A continuación, las células se incubaron durante toda la noche antes de puntuar el efecto citopático (CPE, *cytopathic effect*).

La figura 5 demuestra que los anticuerpos que se unen a la toxina B de la cepa 630 neutralizan la citotoxicidad de la toxina B de *C. difficile* purificada de una segunda cepa de *C. difficile* hipervirulenta 027 (TcdB-HV).

La figura 5 muestra microfotografías tomadas de células Vero después de la exposición a la toxina con o sin incubación previa con anticuerpos IgG de calostro. El panel 5A muestra células Vero no expuestas a TcdB-HV; B, células Vero expuestas a TcdB-HV; C, células Vero que se expusieron a la toxina que se había incubado anteriormente con IgG purificada de calostro no inmune; D, células Vero que se expusieron a la toxina que había sido preincubada con anticuerpos de calostro de toxina B de 630 y E, células Vero que se expusieron a la toxina que había sido preincubada con anticuerpos comerciales anti-toxina B; la muerte celular se observa por el redondeo celular.

Esto demuestra que los anticuerpos que se unen a una toxina B de *C. difficile* pueden neutralizar el efecto citopático de la toxina B de *C. difficile*, así como neutralizar el efecto citopático de la toxina B de una cepa diferente de *C. difficile*.

Ejemplo 6 (no según la presente invención): La administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* es eficaz para prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile*, incluido el daño gastrointestinal y la mortalidad asociada a *C. difficile* en ratones.

Se examinó la capacidad de los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* para prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile* en ratones.

Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro no inmune o toxina B (en el agua potable) durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 endosporas/ratón) tal como las que se han descrito en el ejemplo 1. Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso y la supervivencia. La figura 5 muestra los datos agrupados de tres ensayos independientes con ratones. $N \geq 14$ ratones/grupo.

Para examinar la enfermedad asociada a *C. difficile*, se examinó la pérdida de peso en ratones a los que se les administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a la toxina B de *C. difficile*. La figura 7 muestra que los anticuerpos que se unen a una toxina B de *C. difficile* previenen la enfermedad asociada a *C. difficile* tal como se mide por la pérdida de peso.

Para examinar la mortalidad asociada a *C. difficile*, se examinó la supervivencia de ratones a los que se les administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a una toxina B de *C. difficile*. La figura 7 muestra que los anticuerpos que se unen a una toxina B de *C. difficile* previenen la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Para examinar más a fondo el daño gastrointestinal durante la infección por *C. difficile*, se recogieron el colon y el ciego de ratones y se analizaron en busca de daño gastrointestinal mediante histopatología. En la figura 8 se muestran imágenes representativas de secciones de tejido, teñidas con PAS/azul alcian.

Tal como se puede observar en la figura 8, los ratones a los que se les administró calostro no inmune mostraron tejido colónico gravemente dañado, en comparación con los ratones a los que se les administró calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a la toxina B de *C. difficile* antes de la infección y durante la misma, o en comparación con los ratones de control no infectados (PBS).

Estos resultados demuestran que el calostro hiperinmune bovino que comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* previene el daño al tracto gastrointestinal de los animales infectados, según se mide por el cambio histopatológico.

Ejemplo 7 (no según la presente invención): Producción de calostro hiperinmune que comprende anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile*

Dos vacas han sido vacunadas con toxina B concentrada a partir de sobrenadantes de cultivo de *C. difficile* de la cepa KI australiana hipervirulenta. Además, se han vacunado dos vacas con la toxina sobrenadante aislada de un aislado de *C. difficile* animal natural australiano, cepa AI35, negativo para toxina A y positivo para toxina B, tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

Los anticuerpos que se unen a la toxina B se detectan utilizando ELISA e inmunotransferencia, tal como se ha descrito anteriormente en los ejemplos 3 y 4, respectivamente.

Los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* se examinan en cuanto a su capacidad para unirse a la toxina B mediante transferencia Western y su capacidad para neutralizar la citotoxicidad de la toxina B, tal como se ha descrito en el ejemplo 5 anterior.

Los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* se examinan en cuanto a su capacidad para prevenir medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile* y mortalidad asociada a *C. difficile* en ratones, tal como se ha descrito en el ejemplo 6 anterior.

Ejemplo 8 (no según la presente invención): Detección de anticuerpos en calostro hiperinmune que se unen a endosporas de *C. difficile* mediante ELISA.

Se preparó calostro de la vaca n.º 7003 (vacunada con endosporas de la cepa KI de *C. difficile*, tal como se ha descrito en el ejemplo 2 anterior) y la presencia de anticuerpos que se unían a las endosporas de *C. difficile* se confirmó mediante ELISA.

Para el análisis de ELISA, los pocillos se recubrieron con 10^4 endosporas/pocillo de la cepa KI y se incubaron con diluciones en serie de 4 veces (a partir de una dilución 1:250) de calostro no inmune o de esporas de KI.

Se determinó que el título de anticuerpos para el calostro de esporas de KI era superior a 256.000, tal como se muestra en la figura 9. Esto se consideró una fuerte respuesta de anticuerpos.

Además, se descubrió que la concentración total de anticuerpos IgG para este calostro era de 65,57 mg/ml, según se determinó utilizando una columna de unión a proteína G.

La figura 9 demuestra la producción de anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* mediante ELISA, lo que demuestra que los anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* se produjeron en el calostro hiperinmune bovino.

Ejemplo 9 (no según la presente invención): Detección de anticuerpos que se unen a antígenos de endosporas de *C. difficile* en calostro hiperinmune mediante inmunotransferencia.

Se examinó el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con endosporas de la cepa KI de *C. difficile* en cuanto a su capacidad para unirse a las proteínas del exosporio.

Se extrajo el exosporio de la superficie de las endosporas de KI, se fraccionó utilizando SDS-PAGE, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y posteriormente se sondó con calostro hiperinmune de una vaca no inmunizada o una vaca vacunada con endosporas de la cepa KI de *C. difficile*.

Tal como se muestra en la figura 9, el calostro hiperinmune generado contra una vacuna que comprendía antígeno de endosporas de la cepa KI de *C. difficile* contenía anticuerpos que se unían a las proteínas del exosporio de las endosporas de *C. difficile* (figura 9B). Por el contrario, no había anticuerpos en el calostro no inmune capaces de unirse a las proteínas del exosporio.

Estos datos indican que el calostro hiperinmune bovino generado contra una vacuna que comprende endosporas de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a las proteínas del exosporio de *C. difficile*, y el calostro comprende anticuerpos específicos para la superficie de la espora de KI.

Ejemplo 10 (no según la presente invención): La administración de anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* es eficaz para tratar y prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile*, disminuir la mortalidad asociada a *C. difficile* y reducir la excreción fecal de *C. difficile* y la transmisión de *C. difficile* después de la infección en ratones.

Se examinó la capacidad de los anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* para prevenir medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como la pérdida de peso, la mortalidad asociadas a *C. difficile* y la excreción de esporas de *C. difficile*.

Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro no inmune o anticuerpos que se unían a endosporas de *C. difficile* ("calostro de esporas de KI") (en el agua potable) durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 endosporas/ratón). Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso, la supervivencia y la excreción fecal de endosporas. La figura 10 muestra los datos de un solo ensayo con ratones. N = 5 ratones/grupo.

Para examinar la morbilidad asociada a *C. difficile*, se examinó la pérdida de peso en ratones a los que se administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a las endosporas de *C. difficile*. La figura 11 muestra que los anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* retrasan la morbilidad asociada a *C. difficile*, medida por la pérdida de peso. Los ratones que recibieron calostro no inmune perdieron peso rápidamente y sucumbieron a la infección a las 48 horas.

Para examinar la mortalidad asociada a *C. difficile*, se examinó la supervivencia en ratones a los que se administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a las endosporas de *C. difficile*. La figura 11 muestra que los anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* reducen la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Para examinar la enfermedad asociada a *C. difficile*, se examinó la colonización bacteriana en ratones a los que se les administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a las endosporas de *C. difficile*. La figura 11 muestra que los anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* reducen la colonización bacteriana, medida mediante una disminución en el número de endosporas en las heces de los ratones a las 24 horas. Además, la figura 11 muestra que los anticuerpos que se unen a las endosporas de *C. difficile* reducen el número de endosporas de *C. difficile* en las heces de los ratones hasta el momento del sacrificio. Se espera que la excreción fecal reducida de esporas infecciosas de *C. difficile* disminuya la transmisión de *C. difficile* a un animal intacto posterior.

Estos datos indican que los ratones a los que se les administró calostro hiperinmune bovino producido contra una vacuna que comprendía endosporas de *C. difficile* que comprendía anticuerpos que se unían a las proteínas de exosporio de *C. difficile* retrasaron la pérdida de peso, redujeron la colonización bacteriana a las 24 horas posteriores a la infección y aumentaron la supervivencia en comparación con los ratones que no recibieron calostro inmune.

Ejemplo 11 (no según la presente invención): Detección de anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* mediante ELISA.

Se utilizaron células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* en una vacuna antigénica, se inmunizaron vacas y se tomó suero y se purificó el calostro hiperinmune tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

Cada pocillo se recubrió con 1×10^6 células vegetativas de KI y se incubó con diluciones en serie de 4 veces (a partir de una dilución de suero 1:50) de suero de tercer sangrado n.º 7006.

La figura 12 demuestra que se determinó que el título de anticuerpos para este suero era 64.000.

Estos datos demuestran que el suero bovino producido contra una vacuna que comprende células vegetativas de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a las células vegetativas de *C. difficile*.

Ejemplo 12 (no según la presente invención): Detección de anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* mediante inmunotransferencia e identificación de antígenos inmunodominantes.

La figura 13 demuestra que el suero bovino producido contra una vacuna que comprende células vegetativas de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a antígenos de células vegetativas de *C. difficile*.

Se realizó inmunotransferencia para detectar anticuerpos dirigidos contra células vegetativas de *C. difficile*. Los lisados de células enteras de la cepa KI de *C. difficile* (la cepa contra la que se generaron los anticuerpos), así como otros aislados de *C. difficile* humanos y animales clínicamente relevantes, se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12 %. Después de la transferencia a nitrocelulosa, las membranas se sondaron con el suero previo al sangrado o el tercer sangrado (1:10.000) de la vaca n.º 7006.

Tal como se muestra en la figura 13, se detectaron anticuerpos que se unían a antígenos de células vegetativas de *C. difficile*. Es importante destacar que los anticuerpos generados contra esta cepa hipervirulenta mostraron reacción cruzada con las células vegetativas de diferentes aislados de *C. difficile*.

En particular, las bandas de proteínas dominantes que son visibles en la membrana sondada con suero del tercer sangrado (figura 13B) están ausentes en la membrana sondada con suero previo al sangrado (figura 13A).

Para identificar las bandas de proteínas dominantes y determinar si estas proteínas se podrían utilizar como antígenos inmunodominantes para el desarrollo de vacunas adicionales, se extrajeron dos bandas de, aproximadamente, 49 kDa y 35 kDa de material de células vegetativas de KI de un gel de SDS-PAGE y se enviaron a APAF para el análisis nanoLC ESI MS/MS 1D. Se identificaron como los componentes de SlpA de alto y bajo peso molecular, la proteína principal ubicada en la capa S de *C. difficile*.

Se realizaron inmunotransferencias utilizando SlpA extraída de células vegetativas de KI (figura 14) para confirmar que los anticuerpos son contra proteínas de la capa S. La identificación de estas proteínas ha sido confirmada por espectrometría de masas de bandas escindidas de un gel de SDS-PAGE cargado con preparaciones de capa S (SLP).

Estos datos indican que el suero bovino producido contra una vacuna que comprende células vegetativas de *C. difficile* comprende anticuerpos que se unen a las proteínas de la capa S de *C. difficile*, y el suero incluye anticuerpos que se unen a SlpA.

Ejemplo 13 (no según la presente invención): La administración de anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* es eficaz para tratar y prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile* en ratones

Se utilizaron células vegetativas de la cepa KI de *C. difficile* en una vacuna antigénica, se inmunizaron vacas y se purificó el calostro hiperinmune tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

Se examinó la capacidad de los anticuerpos que se unen a las células vegetativas de *C. difficile* para prevenir medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como la morbilidad y la mortalidad en ratones.

Se pretrataron grupos de ratones C57/BL6 macho, de 6-7 semanas de edad, con un cóctel de antibióticos durante 7 días. A los ratones se les administró calostro no inmune o anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* ("calostro de células vegetativas") durante 2 días antes de la infección con endosporas de KI de *C. difficile* (10^3 endosporas/ratón). Los ratones se mantuvieron con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisaron para determinar la pérdida de peso, la supervivencia y la excreción fecal de endosporas/células vegetativas. Los datos siguientes están combinados a partir de dos ensayos independientes con ratones (N = 10 ratones/grupo).

Para examinar la morbilidad asociada a *C. difficile*, se examinó la pérdida de peso en ratones a los que se les administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a las células vegetativas de *C. difficile*.

La figura 15 muestra que los ratones a los que se administró calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a células vegetativas de *C. difficile* mostraron una pérdida de peso retardada en comparación con los ratones que recibieron calostro no inmune. Los ratones que recibieron calostro no inmune perdieron peso rápidamente y sucumbieron a la infección a las 36 horas.

Para examinar la mortalidad asociada a *C. difficile*, se examinó la supervivencia en ratones a los que se administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía anticuerpos que se unían a las células vegetativas de *C. difficile*. La figura 15 muestra que los anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* reducen la mortalidad asociada a *C. difficile*.

Estos datos indican que los ratones a los que se les administraron anticuerpos que se unían a las células vegetativas de *C. difficile* preparadas en calostro hiperinmune bovino mostraron una pérdida de peso retardada y una mayor supervivencia, en comparación con los ratones que recibieron calostro no inmune.

Ejemplo 14 (no según la presente invención): Optimización de la preparación de antígenos de células vegetativas para vacunas bovinas

Con el fin de minimizar la posible cantidad de endosporas presentes en las preparaciones de células vegetativas y, por lo tanto, maximizar la cantidad de anticuerpos contra las células vegetativas (en lugar de las endosporas) presentes en el calostro, el protocolo de preparación de células vegetativas para la preparación de las vacunas para vacas es el siguiente:

Las endosporas de KI se germinaron en agar HIS que contenía taurocolato de sodio al 10 % p/v (24-48 horas de incubación anaeróbica a 37 °C). Se realizó el pase de KI dos veces en agar HIS complementado con taurocolato de sodio al 10 % p/v (24 horas de incubación anaeróbica a 37 °C). Se seleccionó una colonia de la placa final y se utilizó para inocular caldo HIS (5 ml) que contenía taurocolato de sodio al 10 % p/v. Posteriormente, este caldo se diluyó diez veces en serie a 10^{-7} y los 8 cultivos se incubaron durante toda la noche (aproximadamente 10 horas) en condiciones anaeróbicas a 37 °C. Después de la incubación, se midió la densidad óptica (OD) de todos los cultivos a 600 nm. Se utilizó una dilución 1:100 del cultivo en el medio de su fase de crecimiento exponencial ($OD_{600\text{ nm}}$

0,40-0,70) para inocular caldo HIS (20 ml) que contenía 10 % p/v de taurocolato de sodio y se hizo crecer hasta $OD_{600\text{ nm}}$ 0,50. Se utilizó una dilución 1:100 de este cultivo para inocular caldo HIS (500 ml) que contenía taurocolato de sodio al 10 % p/v y se hizo crecer hasta $OD_{600\text{ nm}}$ 0,50 - 0,70. Para recolectar las células, los cultivos se centrifugaron a $3.200 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . Las células se lavaron 3 veces utilizando PBS (centrifugando a $3.200 \times g$ durante 20 minutos a 4°C entre lavados). Las células se fijaron utilizando formaldehído al 1 % en PBS durante toda la noche a 4°C . Después de la fijación, las células se lavaron 3 veces utilizando PBS para eliminar el formaldehído. Se resuspendieron en un volumen final de 20 ml y posteriormente se ajustaron a, aproximadamente, $2,25 \times 10^{10}$ células/ml. Las células se enumeraron utilizando un hemocitómetro. Las vacas n.º 7028 y n.º 7029 se inmunizaron con 1 ml de esta vacuna y se purificó el calostro hiperinmune tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

Se han realizado ELISA en el calostro procesado para determinar el título de anticuerpos que se unen a las células vegetativas. Cada pocillo se recubrió con 1×10^6 células vegetativas de KI y se incubó con diluciones en serie de 4 veces.

La figura 16 demuestra que el título de anticuerpos para las vacas n.º 7028 y n.º 7029 es de 16.000-64.000 y 256.000, respectivamente.

Estos datos demuestran la producción de anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* mediante ELISA, lo que demuestra que los anticuerpos que se unen a células vegetativas de *C. difficile* se produjeron en calostro hiperinmune bovino.

Ejemplo 15 (no según la presente invención): Identificación de nuevos antígenos de vacuna utilizando suero bovino que comprende anticuerpos que se unen a antígenos de células vegetativas

Tal como se ha demostrado en el ejemplo 12, se identificó a la capa S, específicamente SIpA, como el antígeno inmunodominante en las vacunas de antígenos de células vegetativas. Para maximizar la cantidad de anticuerpo específico en el calostro, se inmunizó una vaca (n.º 7020) con una preparación de capa S (SLP).

El protocolo para esta vacuna se ha descrito en el ejemplo 2 anterior. En resumen, se hacen crecer cultivos de KI durante toda la noche utilizando caldo HIS. Las células se recolectan mediante centrifugación a $3.200 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . Las células se lavaron una vez con PBS, posteriormente se resuspendieron en 0,04 volúmenes de glicina 0,2 M a pH 2,2 y se incubaron, mezclando consecutivamente, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante que contenía proteínas de la capa S. El sobrenadante se neutralizó utilizando Tris 2 M a pH 9,0. La SLP se dializó durante toda la noche en PBS con múltiples cambios de tampón. La proteína total se cuantificó utilizando un ensayo BCA y se ajustó a 1,0 mg/ml. Se utilizó formalina al 0,3 % para la fijación y se dejó durante 3 días.

A la vaca n.º 7020 se le administró 1 mg de SLP por dosis de vacunación.

Los anticuerpos que se unen a SLP se detectan mediante ELISA e inmunotransferencia, tal como se ha descrito anteriormente en los ejemplos 3 y 4, respectivamente.

Los anticuerpos que se unen a SLP de *C. difficile* se examinan en cuanto a su capacidad para prevenir medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile* tales como morbilidad y mortalidad en ratones, tal como se ha descrito en el ejemplo 6 anterior.

Ejemplo 16: La administración de combinaciones de anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* son eficaces para tratar y prevenir la enfermedad asociada a *C. difficile* en ratones.

Se examinó la capacidad de las combinaciones de anticuerpos que se unen a *C. difficile* para prevenir medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como la morbilidad y la mortalidad en ratones. Se mezclaron diferentes combinaciones y proporciones de calostro hiperinmune que comprenden anticuerpos que se unen a la toxina B (n.º 7010), endosporas (n.º 7003) o calostro de células vegetativas (n.º 7006) antes de la administración a los ratones.

Las diferentes combinaciones de calostro bovino fueron las siguientes:

1. Anticuerpos que se unen a una toxina B y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora (proporción 1:1)

2. Anticuerpos que se unen a una toxina B y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 1:1)

3. Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 1:1:1)

4. Anticuerpos que se unen a una toxina B

5. Anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas

Para examinar la enfermedad asociada a *C. difficile*, se examinó la pérdida de peso en ratones a los que se administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía los anticuerpos relevantes o una mezcla de calostro que comprendía los anticuerpos relevantes.

Para examinar la mortalidad asociada a *C. difficile*, se examinó la supervivencia en ratones a los que se administró calostro no inmune o calostro hiperinmune bovino que comprendía los anticuerpos relevantes o una mezcla de calostro que comprendía los anticuerpos relevantes.

Tal como se muestra en la figura 17, 4 de 5 ratones que recibieron una combinación de tres anticuerpos sobrevivieron, lo que indica un efecto sinérgico de los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile*, los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* y los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile*.

Estos datos indican que los ratones a los que se les administró una composición que comprendía anticuerpos que se unían a una toxina B, anticuerpos que se unían a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unían a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas, mostraron una pérdida de peso retardada y una mayor supervivencia, en comparación con los ratones que recibieron calostro no inmune.

Estos resultados también indican que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* sola o a una combinación de antígenos de *C. difficile* en el calostro hiperinmune bovino son eficaces para neutralizar la actividad de la toxina B *in vivo* y otros antígenos, evitando de esta manera el daño al tracto gastrointestinal de ratones pretratados.

Ejemplo 17 (no según la presente invención): Tratamiento de ratones con anticuerpos que se unen a la toxina B para tratar la enfermedad asociada a *C. difficile*

Se pretratan grupos de ratones macho C57/BL6 de 6-7 semanas de edad con un cóctel de antibióticos durante 7 días antes de la infección por *C. difficile* (10^3 endosporas/ratón). Se administra el calostro hiperinmune que comprende anticuerpos que se unen a la toxina B (vaca n.º 7010) por sonda oral 2, 4 o 6 horas después de la infección. En estos momentos, el agua potable se reemplaza con calostro. Los ratones se mantienen con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisan para determinar la pérdida de peso y la supervivencia. Los ratones se sacrifican humanitariamente según la ética animal.

Se realizan experimentos adicionales en los que el calostro hiperinmune se administra 8, 10, 12 o 24 horas después de la infección.

Ejemplo 18: Pretratamiento de ratones con combinaciones de anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* para tratar la enfermedad asociada a *C. difficile*

Se examinan combinaciones de anticuerpos que se unen a *C. difficile* en cuanto a su capacidad para prevenir medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como morbilidad y mortalidad en ratones, tal como se ha descrito anteriormente.

Tras las pruebas individuales, las diferentes combinaciones y proporciones son las siguientes:

Anticuerpos que se unen a una toxina B y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora (proporción 1:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora (proporción 2:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 1:1:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 2:1:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 3:1:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 4:1:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 5:1:1)

5 Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 6:1:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 7:1:1)

10 Anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 8:1:1)

Anticuerpos que se unen a una toxina B y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas (proporción 2:1)

15 Anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas y anticuerpos que se unen a una proteína de la capa S (proporción 1:1)

20 Anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora (proporción 1:1)

Ejemplo 19: Tratamiento de ratones con combinaciones de anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* para tratar la enfermedad asociada a *C. difficile*.

25 Se prueban las combinaciones de anticuerpos del ejemplo 18 que son eficaces para prevenir medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como morbilidad y mortalidad en ratones, para determinar su eficacia en el tratamiento de medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como morbilidad y mortalidad en ratones. En resumen, se pretratan grupos de ratones macho C57/BL6 de 6-7 semanas de edad con un cóctel de antibióticos durante 7 días antes de la infección por *C. difficile* (10^3 endosporas/ratón). Se administran por sonda oral calostro hiperinmune que comprende anticuerpos que se unen a antígenos y combinaciones de anticuerpos que se unen a *C. difficile* 2, 4 o 6 horas después de la infección. En estos momentos, el agua potable se reemplaza con calostro. Los ratones se mantienen con calostro durante el transcurso del ensayo y se supervisan para determinar la pérdida de peso y la supervivencia. Los ratones se sacrifican humanitariamente según la ética animal.

35 **Ejemplo 20: Pretratamiento de ratones con anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* para inhibir la transmisión de *C. difficile*.**

Se prueban los anticuerpos y combinaciones de anticuerpos que son eficaces para prevenir y/o tratar medidas de la enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como morbilidad y mortalidad en ratones, para determinar su eficacia en la prevención de la transmisión de *C. difficile* a animales intactos. Este experimento tiene como objetivo imitar una infección humana en un entorno clínico en el que los pacientes contraen *C. difficile* del entorno.

45 En resumen, los ratones intactos tratados con antibióticos se colocan en una jaula que anteriormente contenía ratones que fueron pretratados con endosporas o calostro de células vegetativas antes de la infección con *C. difficile*, y se supervisó a los ratones intactos expuestos a las jaulas en cuanto a la colonización de *C. difficile*, pérdida de peso y supervivencia. Los ratones se sacrifican humanitariamente según la ética animal. Se determina la capacidad de los anticuerpos derivados del calostro que se unen a antígenos, tal como se ha descrito en el presente documento, para reducir la transmisión al unirse a toxinas, esporas y/o células vegetativas.

50 **Ejemplo 21 (no según la presente invención): Pretratamiento de ratones con anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* para inhibir la recurrencia de la infección por *C. difficile*.**

Para examinar si los anticuerpos derivados del calostro inhiben la enfermedad recurrente asociada a *C. difficile*, los ratones se infectan con *C. difficile* y posteriormente se tratan con vancomicina. Después de la recuperación de la infección, se interrumpe el tratamiento con vancomicina y se administra a los ratones calostro no inmune o específico de antígeno de *C. difficile*, y se supervisan las recaídas de la enfermedad asociada a *C. difficile*.

60 **Ejemplo 22: La administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* o la administración de combinaciones de anticuerpos que se unen a antígenos de *C. difficile* después de la infección reduce la pérdida de peso asociada a *C. difficile* y el daño gastrointestinal asociado a *C. difficile*.**

La figura 18 muestra que los ratones que recibieron una combinación de calostro (toxina B, células vegetativas y endospora en una proporción de 1:1:1) después de la infección y sobrevivieron a la infección mostraron colonos más sanos, y el 70 % de los ratones tratados mostraron prevención del daño al tracto GI, en comparación con los que recibieron la combinación y no sobrevivieron.

Estos datos indican que los ratones a los que se les administró una composición que comprende anticuerpos que se unen a una toxina B, anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas después de la infección, mostraron daño gastrointestinal reducido.

5 **Ejemplo 23 (no según la presente invención): La administración de anticuerpos que se unen a la toxina B de *C. difficile* son eficaces para el tratamiento de la pérdida de peso asociada a *C. difficile* y la mortalidad asociada a *C. difficile*.**

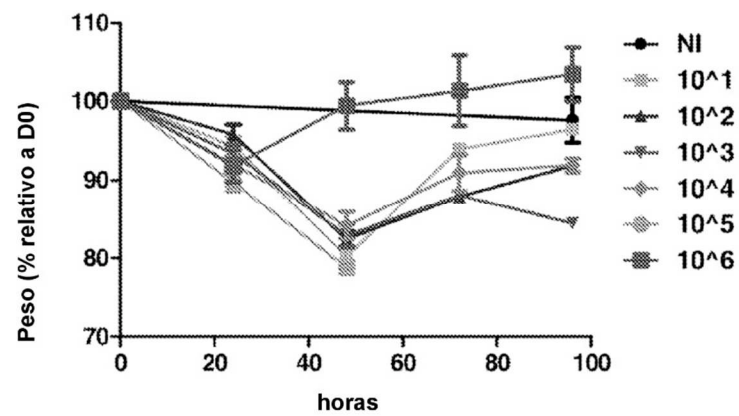
10 La figura 19 muestra el calostro hiperinmune derivado de vacas vacunadas con toxina B recombinante derivada de *C. difficile* que comprende anticuerpos que son eficaces en el tratamiento de la pérdida de peso asociada con la infección por *C. difficile*, y son altamente eficaces en la prevención de la mortalidad asociada a *C. difficile* cuando se administran después de la infección con *C. difficile*.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende anticuerpos bovinos para su utilización en el tratamiento y/o la profilaxis, administrados por vía oral de, como mínimo, un síntoma de la infección por *Clostridium difficile*, en la que los anticuerpos comprenden:
 - a) anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile*; y
 - b) anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* y anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile*, en la que los anticuerpos son de calostro hiperinmune bovino, y
- en la que los anticuerpos que se unen a una toxina B de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende toxina B de la cepa 630 de *Clostridium difficile*;
- en la que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* se generan contra una vacuna que comprende células vegetativas de una cepa KI de *Clostridium difficile*, en la que los anticuerpos se unen a SIpA, y
- en la que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se generan contra a una vacuna que comprende endosporas de la cepa KI de *Clostridium difficile*.
2. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, en la que los anticuerpos que se unen a la toxina B de *Clostridium difficile* se unen a una toxina B de una cepa diferente de *Clostridium difficile*.
3. Composición para su utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* se unen a, como mínimo, un antígeno de células vegetativas de *Clostridium difficile* de una cepa diferente de *Clostridium difficile*.
4. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que los anticuerpos se unen a proteínas de exosporio.
5. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que los anticuerpos que se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de *Clostridium difficile* se unen a, como mínimo, un antígeno de endospora de una cepa diferente de *Clostridium difficile*.
6. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, en la que el calostro hiperinmune se prepara mediante la vacunación de un primer grupo de una o más vacas con una vacuna que comprende toxina B de la cepa 630 de *Clostridium difficile*, la vacunación de un segundo grupo de una o más vacas con una vacuna que comprende células vegetativas de *Clostridium difficile* de una cepa KI de *Clostridium difficile* y la vacunación de un tercer grupo de una o más vacas con una vacuna que comprende endosporas de *Clostridium difficile* de la cepa KI de *Clostridium difficile*, y mezcla posterior del calostro hiperinmune procedente de los grupos.
7. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el, como mínimo, un síntoma de infección asociada a *Clostridium difficile* se selecciona entre el grupo que consiste en diarrea, dolor abdominal, fiebre, pérdida de apetito, colitis pseudomembranosa, megacolon citotóxico, colonización por *C. difficile*, pérdida de peso, citotoxicidad, daño gastrointestinal, cambio histopatológico en el tracto gastrointestinal, excreción fecal de esporas de *C. difficile* y mortalidad asociada a *C. difficile*.

Figura 1

Ensayo nº1



Ensayo nº2

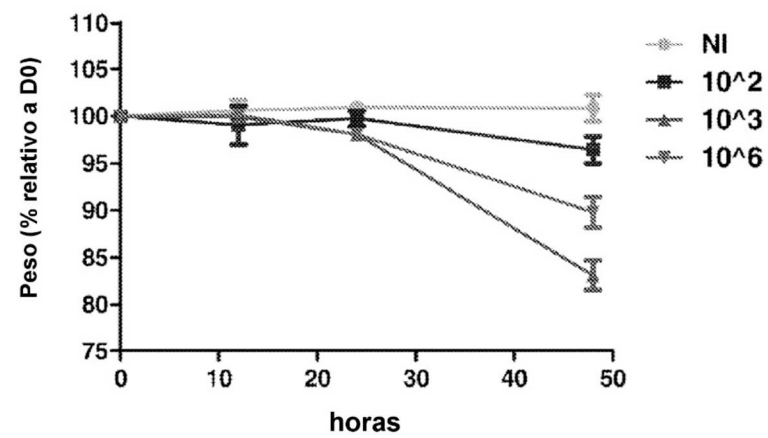
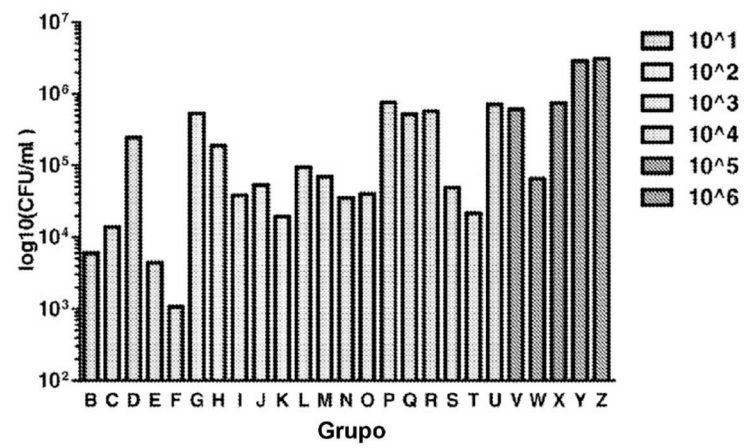


Figura 2

Ensayo n°1



Ensayo n°2

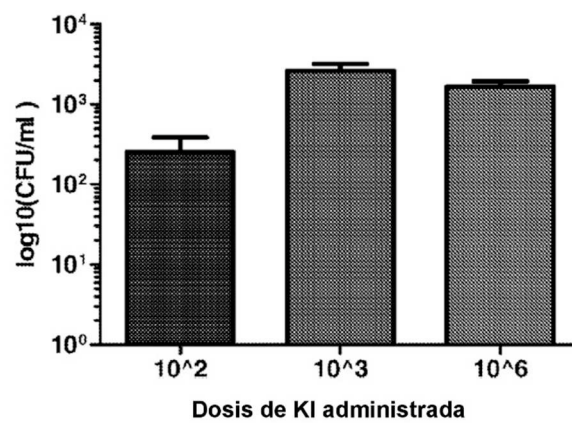


Figura 3

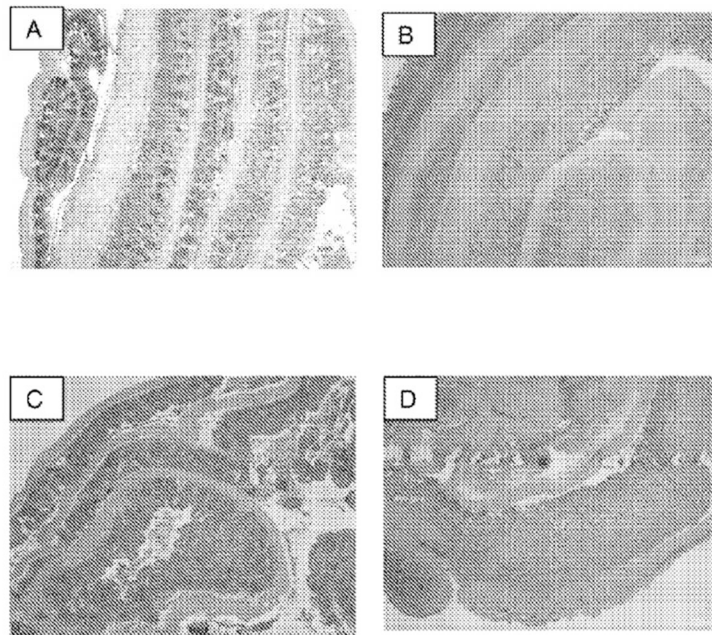


Figura 4

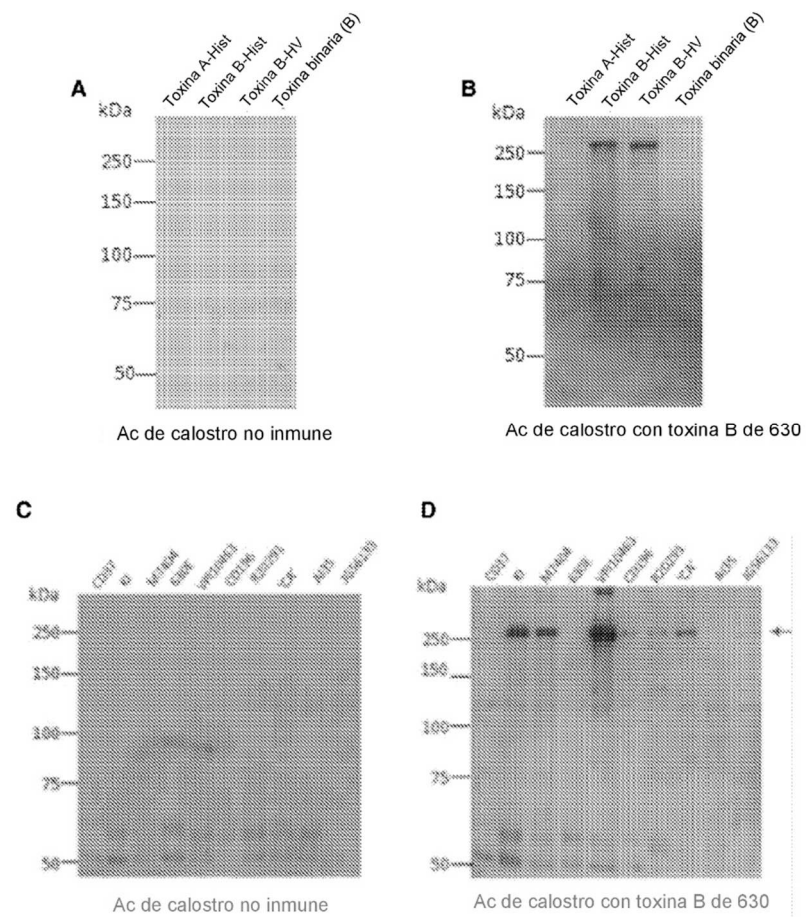


Figura 5

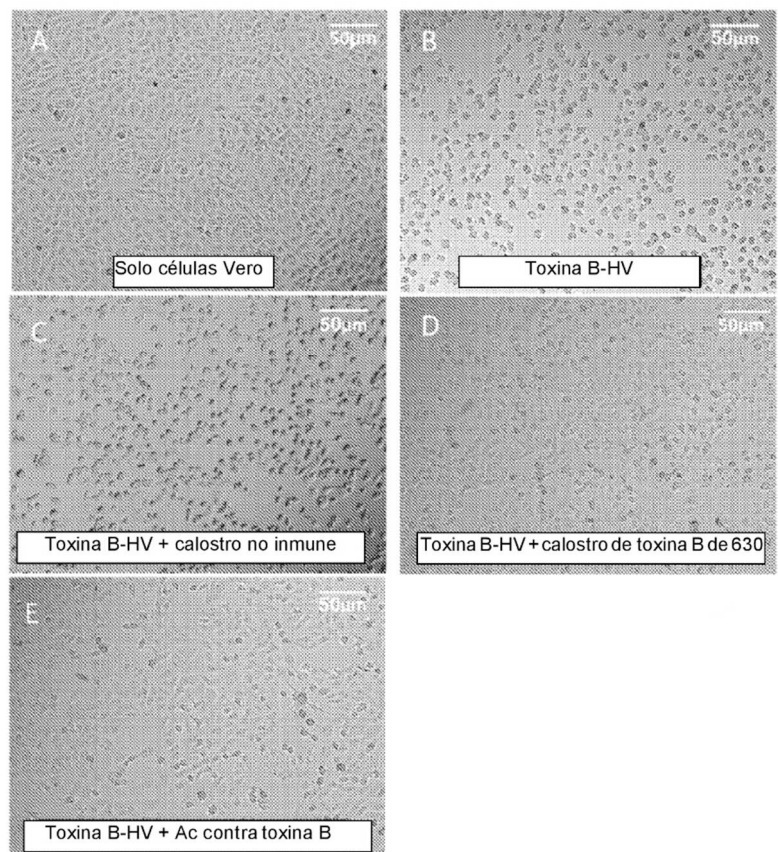


Figura 6

Concentración total de IgG en polvo de calostro bovino

Número de vaca	Antígeno	Concentración de IgG en polvo de calostro (mg de IgG/g de calostro)
7017	No inmune	365 mg/g
7009	Toxina B	199 mg/g
7028b	Toxina B	253 mg/g
701	Toxina B	475 mg/g

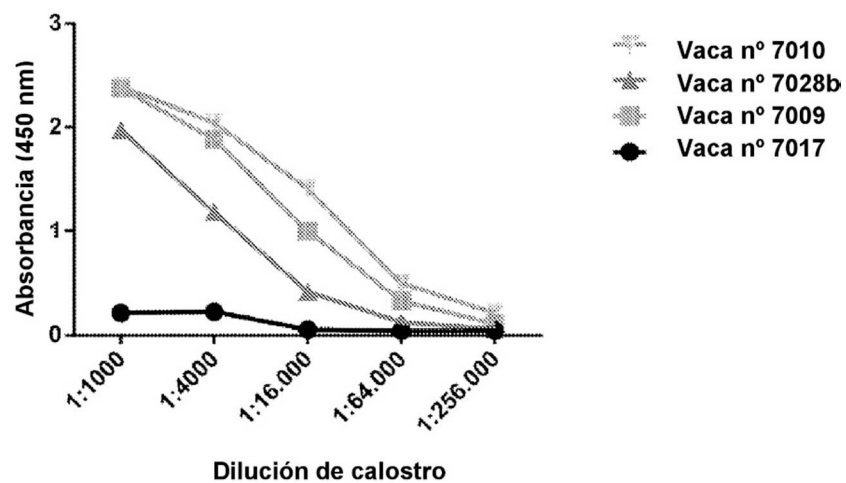
ELISA de toxina B

Figura 7

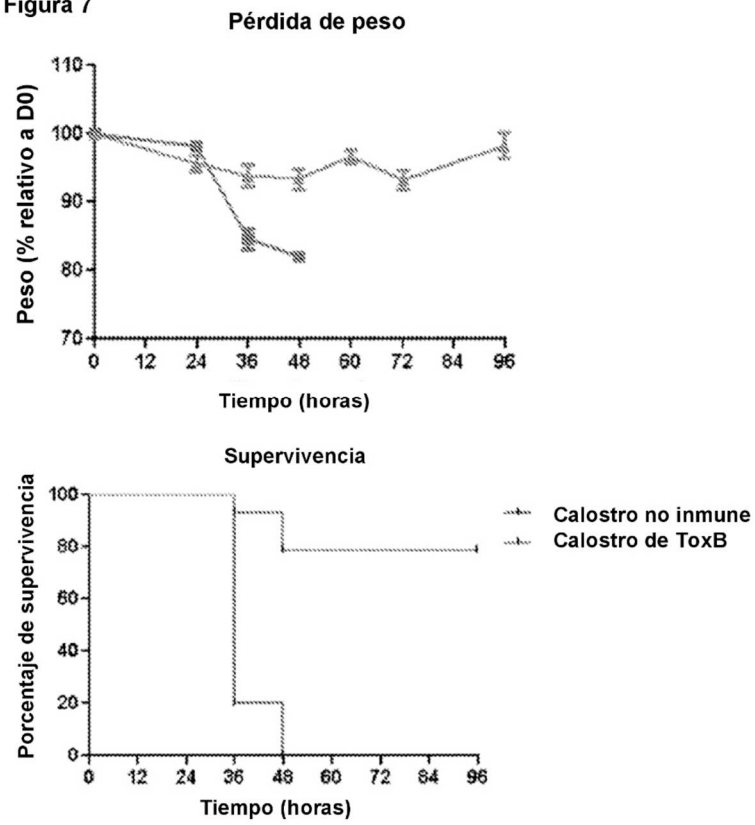


Figura 8

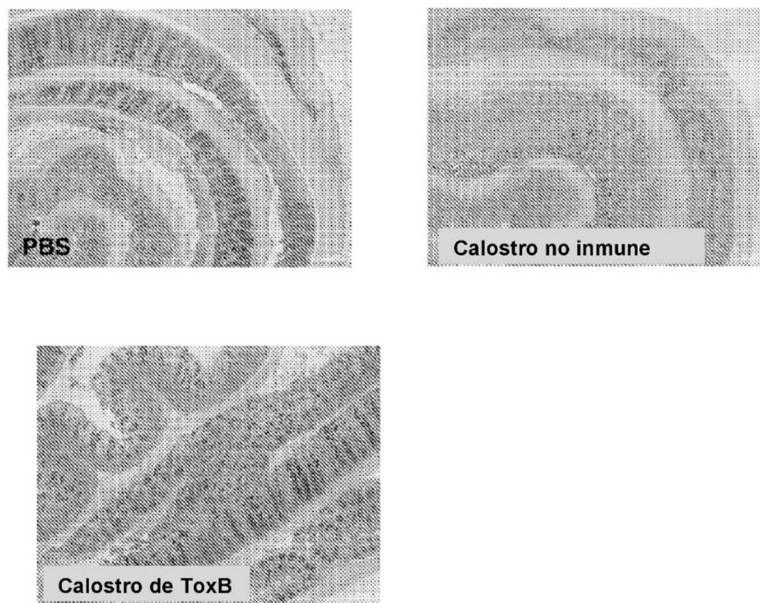


Figura 9

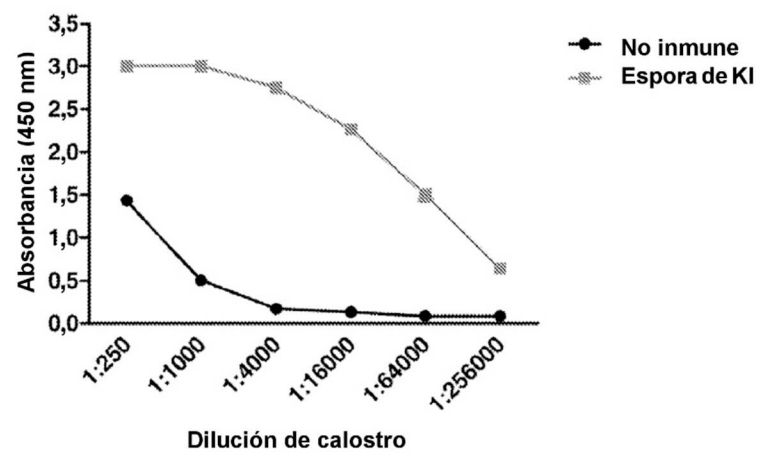


Figura 10

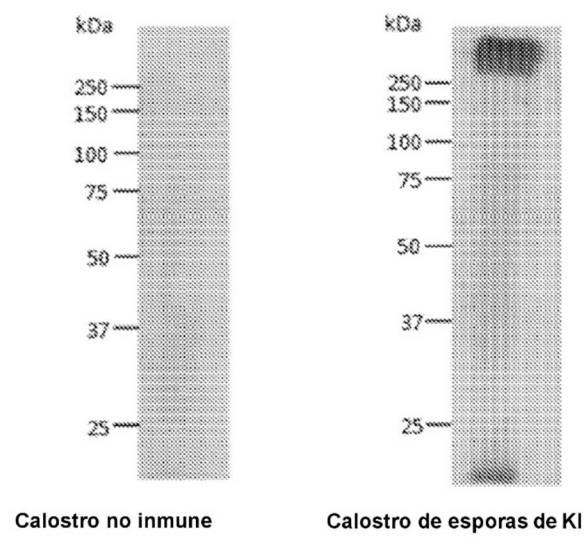


Figura 11

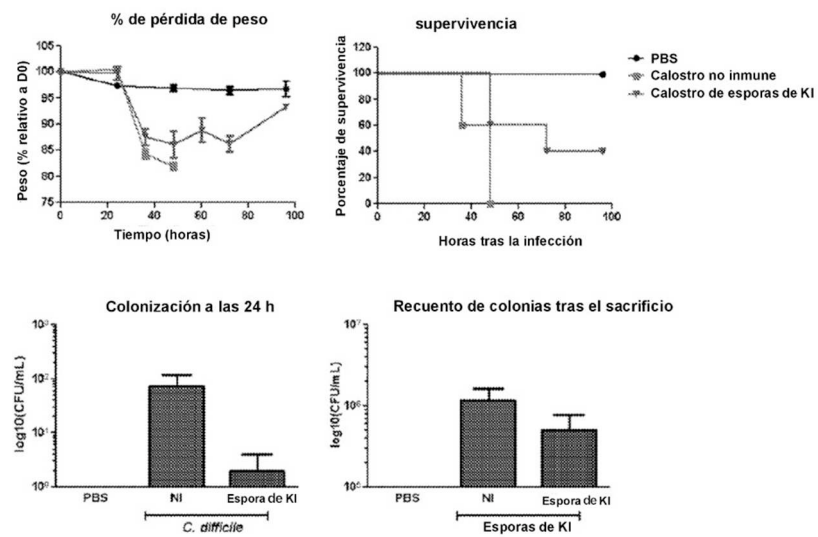


Figura 12

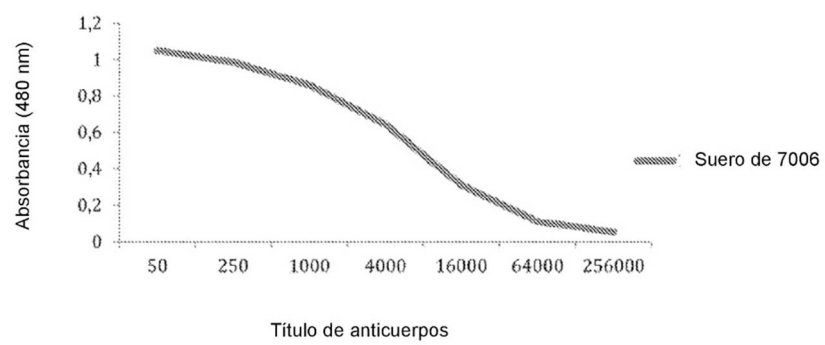
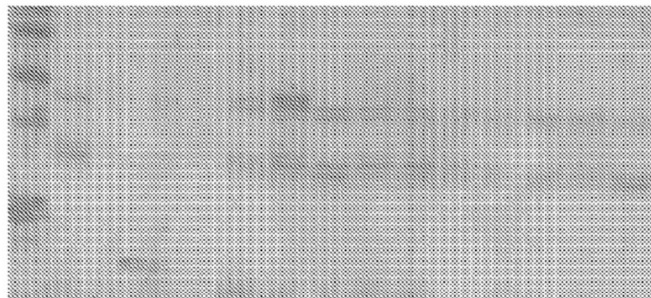


Figura 13

A

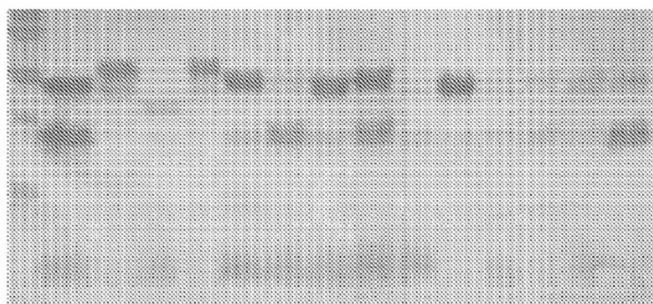
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Presangrado

B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Tercer sangrado

Figura 14

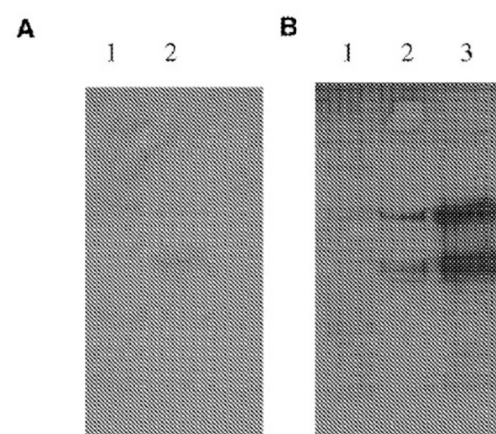


Figura 15

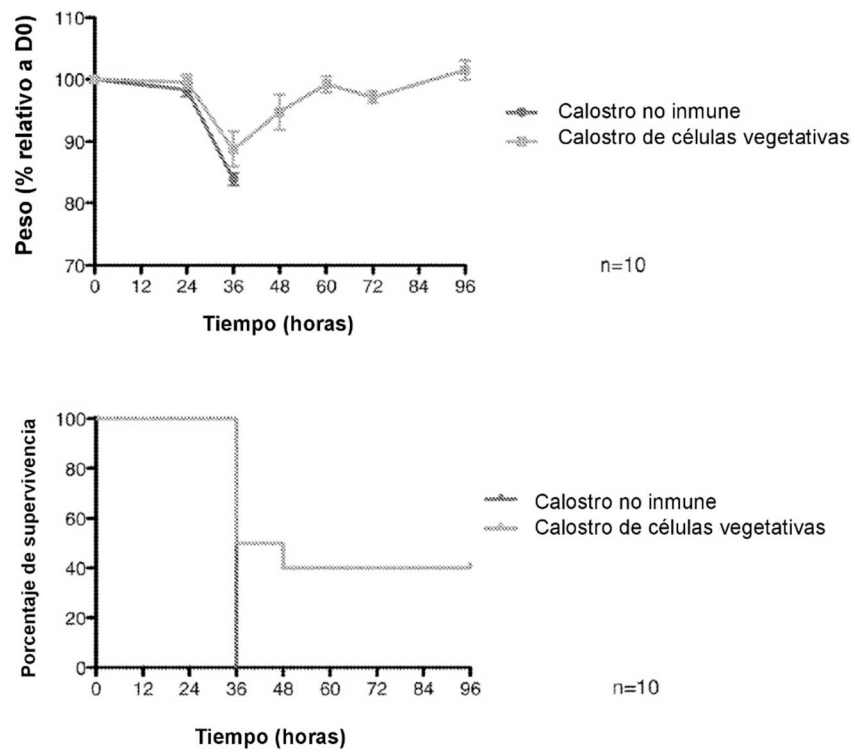


Figura 16

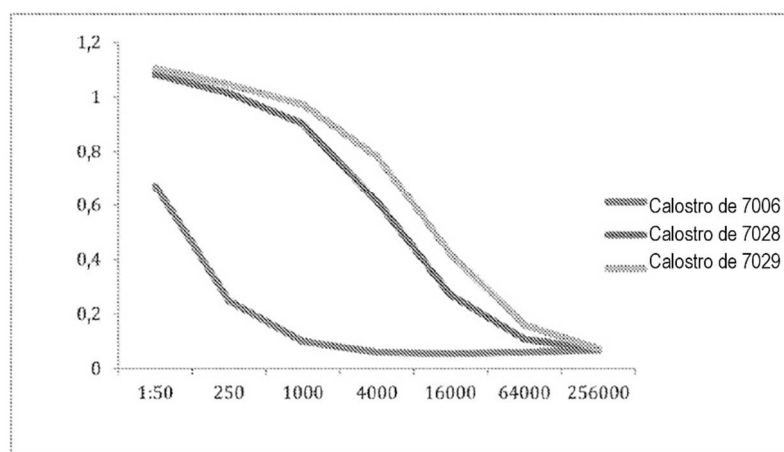


Figura 17

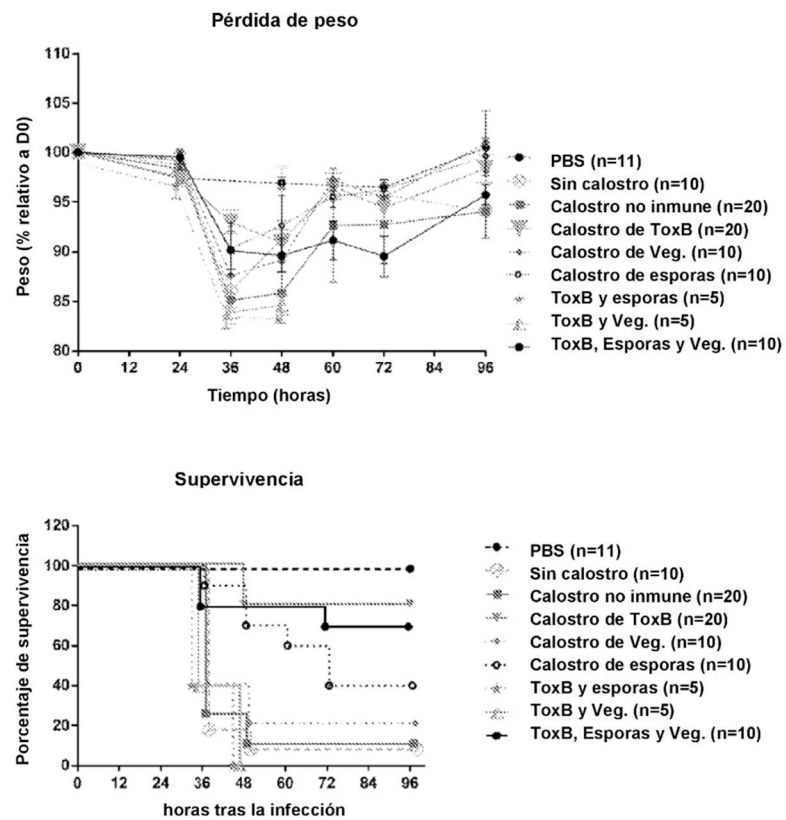


Figura 18

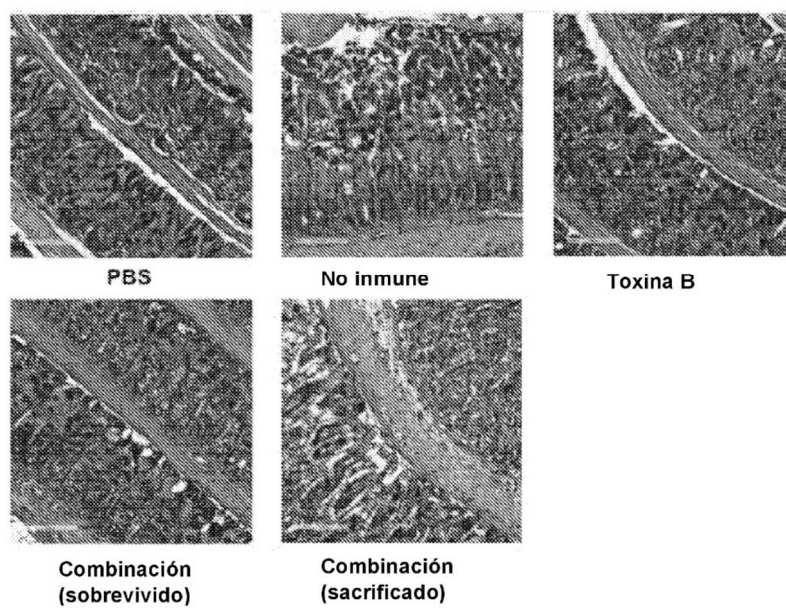
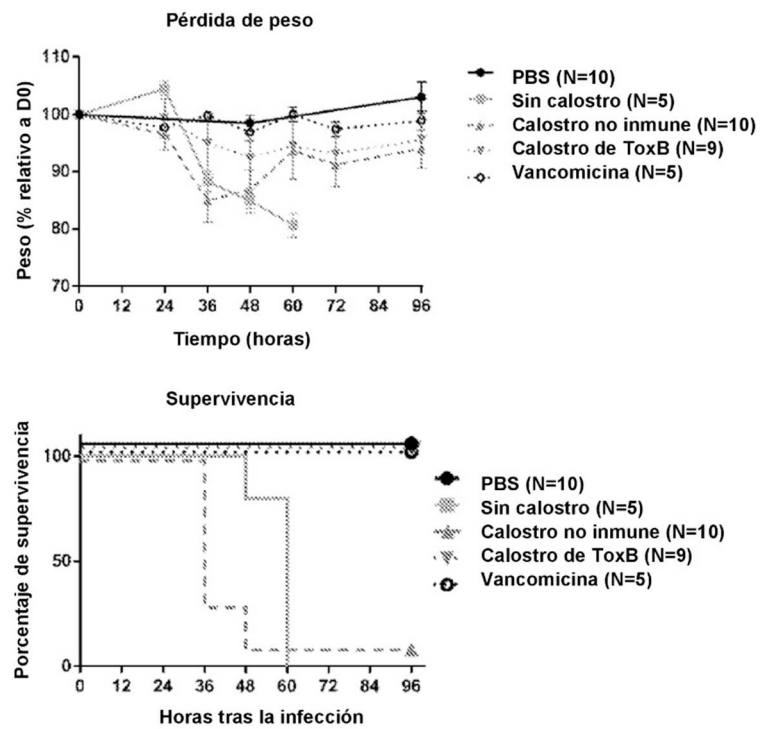


Figura 19



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4550019 A
- US 4748018 A
- US 20040161427 A
- WO 2003080082 A
- WO 2006053383 A
- WO 2004078209 A

Literatura no patente citada en la descripción

- **VAN DISSEL JAAP T et al.** *J. Med. Microbiol.*, 01 February 2005, vol. 54 (2), 197-205
- **MATTILA et al.** *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 08 January 2008, vol. 40 (9), 702-708
- **LYRAS et al.** *Nature*, 30 April 2009, vol. 458, 1176-1179
- **KUEHNE et al.** *Nature*, 07 October 2010, vol. 467, 711-713
- **HOLLIGER, P. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448
- **POLJAK, R. J. et al.** *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123
- **KIPRIYANOV, S. M. et al.** *Human Antibodies and Hybridomas*, 1995, vol. 6, 93-101
- **KIPRIYANOV, S. M. et al.** *Mol. Immunol.*, 1994, vol. 31, 1047-1058
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1990, 1521-1712