República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012026021-9 B1

(22) Data do Depósito: 15/04/2011

(45) Data de Concessão: 03/05/2022

(54) Título: ANTICORPOS, SEUS FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO E SEUS USOS, COMPOSIÇÕES E USO DAS MESMAS, LINHAGEM DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA, KIT, ÁCIDO NUCLEICO, E VETOR DE EXPRESSÃO

(51) Int.Cl.: C07K 16/12; C12N 15/13; A61K 39/395; A61P 31/04.

(30) Prioridade Unionista: 10/09/2010 US 61/381,669; 15/04/2010 US 61/324,503.

(73) Titular(es): PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): DANGSHE MA; KIRSTEN NAGASHIMA; BRIAN KENNEDY; GERALD P. DONOVAN; YUN KANG; WILLIAM C. OLSON; SHANKAR KUMAR; NAOYA TSURUSHITA; ANDRE J. MAROZSAN; ALBERT CUPO.

(86) Pedido PCT: PCT US2011032713 de 15/04/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/130650 de 20/10/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/10/2012

(57) Resumo: ANTICORPOS MONOCLONAIS E BIESPECÍFICO, SEUS FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO E PROTEÍNA DE LIGAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÃO E DOENÇA ASSOCIADAS AO CLOSTRIDIUM DIFFICILE, BEM COMO COMPOSIÇÃO, VACINA OU AGENTE IMUNOGÊNICO, LINHAGEM DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA, ÁCIDO NUCLEICO, PROCESSO DE PRODUÇÃO DOS REFERIDOS ANTICORPOS, KIT, VETOR DE EXPRESSÃO, MÉTODO EX VIVO E USOS. A presente invenção refere-se aqui a reagentes, com posições e terapias para tratar infecção causada por Clostridium difficile e condições de doença e patologias relacionados, tal como diarreia associada a Clostridium difficile, que resulta da infecção pelas bactérias Clostridium difficile e as enterotoxinas produzidas por estas bactérias. Em particular, os anticorpos ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente à toxina A e/ou à toxina B de C. difficile e neutralizam as atividades destas toxinas; composições que compreendem tais anticorpos; e processos de utilização dos anticorpos e das composições são fornecidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPOS, SEUS FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO E SEUS USOS, COMPOSIÇÕES E USO DAS MESMAS, LINHAGEM DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA, KIT, ÁCIDO NUCLEICO, E VETOR DE EXPRESSÃO".**

Pedidos de Patentes Relacionados

[0001] Este pedido de patente reivindica prioridade sob 35 U.S.C. §119 dos Pedidos de Patentes U.S. Provisórios Nºs 61/324503, depositado em 15 de abril de 2010 e 61/381669, depositado em 10 de setembro de 2010, cujo o conteúdo total de cada um é incorporado aqui como referência.

Campo da Invenção

[0002] Esta invenção refere-se de forma geral a composições e terapias que podem ser utilizadas para tratar infecção por *Clostridium difficile* (*C. difficile*) e condições de doença e patologias associadas a *C. difficile*, tal como diarreia associada a *C. difficile* (CDAD), que pode resultar da infecção por bactérias *C. difficile*. A invenção refere-se ainda a anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos que se ligam especificamente a epítopos na toxina A e/ou na toxina B de *C. difficile*, composições que compreendem tais anticorpos, bem como métodos de utilização dos anticorpos ou das composições.

Antecedentes da Invenção

[0003] *C. difficile* (ou *C. diff.*) é uma bactéria anaeróbica formadora de esporos Gram-positiva que representa a causa principal de diarreia nosocomial (adiquirida no hospital) associada a antibióticos e colite pseudomembranosa. É estimada que a infecção por *C. difficile* totalize mais de 750.000 casos por ano nos E.U.A. e seja responsável por mais mortes que todas as outras infecções intestinais combinadas (1). Em muitos hospitais, *C. difficile* constitui um risco maior para pacientes

que *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ou quaisquer outras bactérias (2). Os custos anuais para o controle de doença associada a *Clostridium difficile* (CDAD) são estimados como excedendo 3,2 bilhões de dólares nos E.U.A. (3). Surtos recentes de cepas de *C. difficile* com maior virulência ou resistência a antibióticos levaram a falhas no tratamento, reincidências mais frequentes e maiores taxas de mortalidade (4).

[0004] A CDAD é tipicamente induzida pela perturbação da flora colônica através do uso de antibióticos tais como clindamicina, cefalosporinas e fluoroquinolonas.(3,8) Esta perturbação no microambiente colônico, junto com a exposição aos esporos de *C. difficile*, leva à colonização. Aproximadamente um terço de todos os pacientes que se tornam colonizados desenvolve CDAD(9), que pode resultar em diarreia grave, perfuração do cólon, colectomia e morte (10). A CDAD resulta após a aquisição e a proliferação de *C. difficile* nos intestinos, onde as bactérias *C. difficile* produzem toxina A e toxina B, dois fatores de virulência importantes de CDAD. As toxinas A e B de *C. difficile* exibem homologia de sequência e estrutural considerável. Ambas possuem domínio de ligação ao receptor C-terminal contendo várias sequências de repetição, um domínio hidrofóbico central e um domínio de glucosiltransferase N-terminal. O domínio de ligação ao receptor medeia a ligação das toxinas às células epiteliais intestinais através de receptores hospedeiros que permanecem pouco definidos em humanos. Após a internalização através da via endossomal, o domínio hidrofóbico central se insere dentro da membrana do endossomo. O pH ácido do endossomo ativa a formação de poros e a translocação dos domínios amino-terminais das toxinas para dentro do citosol. A glicosilação do alvo citosólico Rho GTPases leva ao rompimento do citoesqueleto e à morte celular. As toxinas A e B demonstram perfis patológicos diferentes com sinergia potencial na

causa de doença.

[0005] Surtos recentes de uma cepa hipervirulenta de *C. difficile* resultaram em maiores taxas de doença grave, reincidências mais frequentes e maior mortalidade. Uma cepa hipervirulenta, BI/NAP1/027 tipo de toxina III, era historicamente incomum, mas agora é epidêmica. Cepas hipervirulentas, tal como B1/NAP1/027, produzem várias vezes mais toxina A e toxina *B que cepas não hipervirulentas de C. difficile, tornando tais cepas mais formidáveis para tratar a infecção imediata. Uma vez que a resistência de cepas hipervirulentas a antimicrobianos e antibióticos comumente utilizados é um problema crescente que torna estas cepas mais difíceis de tratar e conter, abordagens de tratamentos adicionais e terapias mais potentes são necessários para combater a hipervirulência e a recorrência de doença que é associada a isolados de C. difficile hipervirulentos.*

[0006] *Os tratamentos com antibióticos atuais para infecção causada por C. difficile incluem o uso de vancomicina e/ou metronidazol; entretanto estes antibióticos são limitados por taxas de resposta incompletas e taxas de reinfecção e recorrência crescentes. Desde 2000, taxas de falha substancialmente mais altas foram relatadas para a terapia com metronidazol (23-25). As altas taxas de recorrência após o tratamento com antibiótico podem resultar da interrupção continuada da flora colônica normal, fornecendo ao C. difficile a oportunidade de se recuperar com pouca competição. (26-28) O risco de recorrência é maior em pacientes que já tiveram uma recorrência, ocorrendo desde aproximadamente 20% após um episódio inicial até mais de 60% após duas ou mais recorrências.(29,30) Este maior risco de recorrência foi associada com a falha em montar uma resposta de anticorpos antitoxina adequada. (31) Na verdade, pacientes com os títulos mais altos de antitoxina IgG no soro no final da terapia antimicrobiana tinham um risco menor de*

recorrência.(32) Em um estudo separado, os níveis de anticorpo antitoxina B no soro eram correlacionados com a proteção de CDAD recorrente.(33)

[0007] *A prevalência de infecção causada por C. difficile tem crescido constantemente, particularmente nos idosos, que são frequentemente frágeis. Aproximadamente um terço dos pacientes com infecção causada por C. difficile possui recorrências de sua infecção, geralmente dentro de dois meses da doença inicial. Infecções repetidas tendem a ser mais graves que a doença original; estas são mais frequentemente fatais. Adultos mais velhos e pessoas com sistemas imunológicos mais enfraquecidos são particularmente susceptíveis a infecções recorrentes. Se não tratada imediatamente e apropriadamente, as complicações da infecção causada por C. difficile incluem desidratação, falência renal, perfuração intestinal, megacólon tóxico, que pode levar à ruptura do cólon e à morte.*

[0008] *Embora nos Estados Unidos da América, a infecção causada por C. difficile seja a infecção mais comum adquirida por pacientes hospitalizados, esta também pode ser adquirida fora dos hospitais na comunidade. É estimado que 20.000 infecções com C. difficile ocorrem na comunidade a cada ano nos Estados Unidos da América. Internacionalmente, a incidência é altamente variável e depende de vários fatores, incluindo a frequência com que a endoscopia é utilizada para estabelecer o diagnóstico, os padrões de uso de agentes antimicrobianos e os padrões epidemiológicos.*

[0009] *Assim, é evidente que a doença causada pela infecção causada por C. difficile coloca as vidas das pessoas de todas as idades em risco, tanto em unidades nosocomiais quanto na comunidade em geral. No mundo atual, há um risco sempre presente de infecção causada por C. difficile para aqueles que encaram hospitalização ou que estão em cuidados hospitalares em longo prazo.*

Devido ao fato de que há ainda uma chance de contrair infecção causada por C. difficile fora de um ambiente hospitalar, a possibilidade de crianças jovens e bebês de contrair a doença é enorme. Em adição, há um potencial de que regimes de antibióticos atuais utilizados para tratar C. difficile possam ser menos que otimamente eficientes. Os pacientes que apresentam doença associada a C. difficile requerem cuidado extensivo do paciente internado e uma estadia de longa duração no hospital. Os custos associados com o alto grau de cuidado de apoio do hospital e o tratamento necessário para pacientes com doenças associadas a C. difficile são grandes e envolvem recursos caros, tais como maiores números de equipes de médicos e enfermeiros, testes de laboratório e monitoramento, medicações concomitantes e medidas de suporte adicionais.

[00010] *Consequentemente, há uma necessidade de medicamentos, fármacos e tratamentos mais eficientes que são direcionados para doenças que ameaçam a vida causadas por C. difficile e, em particular as toxinas potentes que são produzidas por C. difficile, para benefício profilático e terapêutico. Há uma necessidade não satisfeita de tratamentos bem sucedidos e duradouros para a doença associada a C. difficile* que ofereçam menor potencial de desenvolvimento de resistência e maior potencial para a resposta do paciente bem sucedida e resolução da doença, levando à erradicação da doença.

Sumário da Invenção

[00011] A invenção fornece, pelo menos em parte, novos reagentes de anticorpo e composições que compreendem anticorpos antitoxina A e/ou antitoxina B de *C. difficile*. Os *reagentes e as composições podem ser benéficos para o tratamento dos números crescentemente prevalecentes de indivíduos afetados com infecção e doença associados com C. difficile, fornecendo melhor qualidade de vida,*

resolvendo CDAD e infecção causada por C. difficile e auxiliando a sobrevivência destes indivíduos infectados.

[00012] *Em um aspecto, um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga especificamente à toxina A de C. difficile e que compete de forma cruzada pela ligação com a toxina A de C. difficile com um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888 é fornecido. Em uma modalidade a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692. Em uma modalidade, a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9694. Em uma modalidade, a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9888. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, está na forma quimérica ou humanizada.*

[00013] *Em outro aspecto, um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a um epítopo da toxina A de C. difficile definido por um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888 é fornecido. Em uma modalidade a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692. Em uma modalidade, a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9694. Em uma modalidade, a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9888. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, está na forma quimérica ou humanizada.*

[00014] *Em outro aspecto, um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno* do mesmo, que se liga especificamente a toxina B de *C. difficile* e que compete de forma cruzada pela ligação à

toxina B de *C. difficile* de um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692 é fornecido. Em uma modalidade a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693. Em uma modalidade a linhagem de célula de hibridoma é *depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, está na forma quimérica ou humanizada.*

[00015] *Em outro aspecto, um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a um epítopo da toxina B de C. difficile definido por um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692 é fornecido. Em uma modalidade a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693. Em uma modalidade a linhagem de célula de hibridoma é depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, está na forma quimérica ou humanizada. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo neutraliza a toxicidade in vivo da toxina B de C. difficile. Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo neutraliza a toxicidade in vivo da toxina B de C. difficile em uma quantidade de 0,1-1000 µg.*

[00016] *Em outro aspecto, o anticorpo monoclonal PA-39 (ATCC Accession No. 9692) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é fornecido. Em outro aspecto, o anticorpo monoclonal PA-50 (No. de Acesso da ATCC PTA-9694) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é fornecido. Em outro aspecto, o anticorpo monoclonal PA-38 (No. de Acesso da ATCC PTA-9888) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é fornecido. Em outro*

aspecto, o anticorpo monoclonal PA-41 (No. de Acesso da ATCC PTA-9693) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é fornecido. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, está na forma quimérica ou humanizada.

[00017] *Ainda em outro aspecto, um vetor de expressão que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico que codifica os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos da mesma como descrito anteriormente e aqui é fornecido. Ainda em outro aspecto, um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada ou uma porção da mesma dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos da mesma como descrito anteriormente ou aqui é fornecido. Ainda em outro aspecto, um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve ou uma parte da mesma, dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos da mesma como descrito anteriormente ou aqui é fornecido. Ainda em outro aspecto adicional um vetor de expressão que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada ou uma porção da mesma e a cadeia leve ou uma porção da mesma, dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos como descrito anteriormente ou aqui é fornecido.*

[00018] *Em outro aspecto, uma célula hospedeira transformada ou transfectada por qualquer um dos vetores de expressão descritos anteriormente e aqui é fornecida. Em outro aspecto, um plasmídeo que codifica qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos como descrito anteriormente e aqui é fornecido.*

[00019] *Em outro aspecto é fornecido um anticorpo antitoxina A de C. difficile isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno como descrito anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de*

ligação ao antígeno neutraliza a toxicidade in vivo da toxina A de C. difficile. Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno neutraliza a toxicidade in vivo da toxina A de C. difficile em uma quantidade de 0,1 μg até 1000 μg ou 1 μg/kg até 100,000 μg/kg. Em outra modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno neutraliza a toxicidade in vivo da toxina A de C. difficile em uma quantidade selecionada de 0,5 μg-1000 μg ou de 5 μg-250 μg ou de 10 mg/kg-50 mg/kg. Em uma modalidade, o anticorpo é o anticorpo monoclonal PA-39 (No. de Acesso da ATCC 9692) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo é o anticorpo monoclonal PA-50 (No. de Acesso da ATCC PTA-9694) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo é o anticorpo monoclonal PA-38 (No. de Acesso da ATCC PTA-9888) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, está na forma quimérica ou humanizada.

[00020] *Em outro aspecto é fornecido um anticorpo antitoxina B de C. difficile isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno como descrito anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno neutraliza a toxicidade in vivo da toxina B de C. difficile. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo neutraliza a toxicidade in vivo da toxina B de C. difficile em uma quantidade selecionada de 0,5 μg-1000 μg, 0,5 μg, 5 μg, 40 μg, 50 μg, 100 μg, 200 μg, 1000 μg ou de 10 mg/kg-50 mg/kg. Em uma modalidade, o anticorpo é o anticorpo monoclonal PA-39 (No. de Acesso da ATCC 9692) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo é o anticorpo monoclonal PA-41 (No. de Acesso da ATCC PTA-9693) ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou o fragmento de ligação ao antígeno do*

mesmo, está na forma quimérica ou humanizada.

[00021] *Outro aspecto fornece um anticorpo antitoxina A de C. difficile isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno como descrito anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno, quando administrado a um indivíduo infectado por C. difficile em combinação com um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga e/ou neutraliza especificamente a toxina B de C. difficile, trata CDAD e/ou aumenta a capacidade de sobrevivência do indivíduo. Em uma modalidade, os anticorpos antitoxina A e antitoxina B ou os fragmentos dos mesmos são administrados simultaneamente. Em uma modalidade, os anticorpos antitoxina A e antitoxina B ou os fragmentos dos mesmos são administrados em momentos diferentes. Em uma modalidade, os anticorpos antitoxina A e antitoxina B ou os fragmentos dos mesmos são administrados sequencialmente. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à toxina A de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente toxina B de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina B.*

[00022] *Outro aspecto fornece um anticorpo antitoxina B de C. difficile isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno como descrito*

anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno, quando administrado a um indivíduo infectado por C. difficile em combinação com um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga e/ou neutraliza especificamente a toxina A de C. difficile, trata CDAD e/ou aumenta a capacidade de sobrevivência do indivíduo. Em uma modalidade os anticorpos antitoxina A e antitoxina B ou os fragmentos dos mesmos são administrados simultaneamente. Em uma modalidade os anticorpos antitoxina A e antitoxina B ou os fragmentos dos mesmos são administrados em momentos diferentes. Em uma modalidade os anticorpos antitoxina A e antitoxina B ou os fragmentos dos mesmos são administrados sequencialmente. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente toxina A de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente toxina B de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina B.

[00023] *Outro aspecto fornece um anticorpo antitoxina A de C. difficile isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno como descrito anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno, quando administrado a um indivíduo infectado por C. difficile em combinação com um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação*

ao antígeno do mesmo que se liga especificamente toxina B de C. difficile, trata CDAD e/ou aprimora a capacidade de sobrevivência do indivíduo. Em uma modalidade, o anticorpo antitoxina A ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado em uma quantidade de 1 µg-1000 µg ou de 1 µg-250 µg ou de 5 µg-100 µg e a dose do anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado em uma quantidade de 0,1 µg-1000 µg ou de 1 µg-250 µg ou de 5 µg-100 µg. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à toxina A de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à toxina B de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina B.

[00024] *Outro aspecto fornece um anticorpo antitoxina A de C. difficile isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno como descrito anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno, quando administrado a um indivíduo infectado por C. difficile em combinação com um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à toxina B de C. difficile, trata CDAD e/ou aprimora a capacidade de sobrevivência do indivíduo. Em uma modalidade, o anticorpo antitoxina A ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado em uma*

quantidade de 50 mg/kg, o anticorpo antitoxina B ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado em uma quantidade de 50 mg/kg. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à toxina A de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à toxina B de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que reage de forma cruzada com o mesmo pela ligação à toxina B.

[00025] *Outro aspecto fornece um anticorpo antitoxina A de C. difficile isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno como descrito anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno, quando administrado a um indivíduo infectado por C. difficile em combinação com um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à toxina B de C. difficile, efetua uma taxa de cura ou de capacidade de sobrevivência de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100%. Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno é administrado q2d x 4 a uma dose de 40-50 mg/kg. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à toxina A de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888, um fragmento de*

ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que compete de forma cruzada pela ligação à toxina A com um ou mais dos anticorpos monoclonais depositados sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888. Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à toxina B de C. difficile é um anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo monoclonal que compete de forma cruzada pela ligação à toxina B com um ou mais dos anticorpos monoclonais depositados sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692 ou PTA-9693.

[00026] *Em outro aspecto é fornecido um anticorpo isolado antitoxina A de C. difficile ou antitoxina B de C. difficile ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como descrito aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno é, está na forma de ou é proveniente de, um ou mais de um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano ou um anticorpo quimérico.*

[00027] *Em outro aspecto é fornecido um anticorpo isolado antitoxina A de C. difficile ou antitoxina B de C. difficile ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como descrito aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é, está na forma de ou fica compreendido em, um anticorpo biespecífico ou bifuncional.*

[00028] *Outro aspecto fornece um anticorpo biespecífico ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende (i) um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma*

versão humanizada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um domínio variável de cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e/ou um domínio variável de cadeia leve do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e (ii) um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma versão humanizada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um domínio variável de cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e/ou um domínio variável de cadeia leve do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[00029] *Outro aspecto fornece um anticorpo biespecífico ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que o anticorpo compreende (i) um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma versão humanizada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um domínio variável de cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e/ou um domínio variável de cadeia leve do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e (ii) um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, uma versão humanizada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um domínio variável de cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e/ou um domínio variável de cadeia leve do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.*

[00030] *Em várias modalidades um anticorpo ou um fragmento de*

ligação ao antígeno do mesmo como descrito anteriormente e aqui, em que o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado de um fragmento Fab, um fragmento F(ab')2 e um fragmento Fv é fornecido. Em outro aspecto um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como descrito anteriormente e aqui, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é ou compreende um anticorpo de cadeia isolada é fornecido.

[00031] *Em outro aspecto uma composição que compreende um ou mais dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos da invenção, como descrito anteriormente e aqui e um carreador, excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável é fornecido. Em uma modalidade, a composição compreende pelo menos um anticorpo antitoxina A da invenção, por exemplo, mAb PTA-9692, mAb PTA-9694, mAb PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e pelo menos um anticorpo antitoxina B da invenção, por exemplo, mAb PTA-9692, mAb PTA-9693, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, a composição compreende um anticorpo antitoxina A da invenção, por exemplo, mAb PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e um anticorpo antitoxina B da invenção, por exemplo, mAb 9693, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, a composição compreende um anticorpo antitoxina A da invenção, por exemplo, mAb PTA-9694, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e um anticorpo antitoxina B da invenção, por exemplo, mAb 9693, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, cada mAb está presente na composição na mesma quantidade. Em uma modalidade, cada*

mAb está presente na composição em uma proporção de 1:1, em peso, em relação um ao outro. Em uma modalidade, cada mAb está presente na composição em quantidades diferentes. Em uma modalidade, cada mAb está presente na composição em proporções sem ser 1:1, em peso, em relação um ao outro, em que as proporções são como fornecido aqui. Em uma modalidade, a composição compreende ainda um agente terapêutico adicional. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional é um antibiótico, agente antibacteriano, bacteriocida, bacteriostático ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional é metronizadol, vancomicina, fidaxomicina ou uma combinação dos mesmos.

[00032] *Em outro aspecto uma composição que compreende um vetor de expressão da invenção, como descrito anteriormente e aqui e um carreador, um excipiente, um veículo ou um diluente farmaceuticamente aceitável é fornecida. Em outro aspecto uma composição que compreende uma célula hospedeira que carrega um vetor de expressão da invenção, como descrito anteriormente e aqui e um carreador, um excipiente, um veículo ou um diluente farmaceuticamente aceitável é fornecida. Em outro aspecto uma composição que compreende um plasmídeo da invenção, como descrito anteriormente e aqui e um carreador, um excipiente, um veículo ou um diluente farmaceuticamente aceitável é fornecida.*

[00033] *Outro aspecto fornece uma proteína de ligação que compreende pelo menos duas cadeias polipetídicas que compreendem sítios de ligação para ligação à toxina A e à toxina B de C. difficile, em que pelo menos uma cadeia polipeptídica compreende um primeiro domínio variável de cadeia pesada, um segundo domínio variável de cadeia pesada e um domínio constante de cadeia pesada ou uma porção do mesmo; e pelo menos uma cadeia polipeptídica*

compreende um primeiro domínio variável de cadeia leve, um segundo domínio variável de cadeia leve e um domínio constante de cadeia leve uma porção do mesmo, em que os domínios variáveis que compreendem as cadeias polipetídicas formam sítios de ligação funcionais para toxina A e toxina B de C. difficile. Em uma modalidade, o primeiro domínio variável de cadeia pesada e o primeiro domínio variável de cadeia leve da proteína de ligação formam um sítio de ligação funcional para toxina A de C. difficile e o segundo domínio variável de cadeia pesada e o segundo domínio variável de cadeia leve da proteína de ligação formam um sítio de ligação funcional para toxina B de C. difficile. Em uma modalidade, o primeiro domínio variável de cadeia pesada e o primeiro domínio variável de cadeia leve da proteína de ligação formam um sítio de ligação funcional para toxina B de C. difficile e o segundo domínio variável de cadeia pesada e o segundo domínio variável de cadeia leve da proteína de ligação formam um sítio de ligação funcional para toxina A de C. difficile. Em uma modalidade, a proteína de ligação compreende uma região Fc. Em uma modalidade, a proteína de ligação neutraliza a toxicidade da toxina A e da toxina B de C. difficile. Em várias modalidades, a proteína de ligação possui uma constante de velocidade on (Kon) à toxina A ou à toxina B selecionada de pelo menos 102M-1s-1; pelo menos 103M-1s-1; pelo menos 104M-1s-1; pelo menos 105M-1s-1; pelo menos 106M-1s-1; ou pelo menos 107M-1s-1, que é medida por ressonância de plasmon de superfície. Em várias modalidades, a proteína de ligação possui uma constante de velocidade off (Koff) à toxina A ou à toxina B selecionada de no máximo 10-3s-1; no máximo 10-4s-1; no máximo 10-5s-1; ou no máximo 10-6s-1, que é medida por ressonância de plasmon de superfície. Em várias modalidades, a proteína de ligação possui uma constante de dissociação (KD) à toxina A ou à toxina B selecionada de no máximo 10-7 M; no máximo 10-8 M;

no máximo 10-9 M; no máximo 10-10 M; no máximo 10-11 M; no máximo 10-12 M; ou no máximo 10-13 M.

[00034] *Em outro aspecto uma composição que compreende a proteína de ligação como descrito anteriormente e aqui e um carreador, um excipiente, um veículo ou um diluente farmaceuticamente aceitável é fornecida. Em uma modalidade, a composição compreende ainda um agente terapêutico adicional. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional da composição é um antibiótico, agente antibacteriano, bacteriocida, bacteriostático ou combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional da composição é metronizadol, vancomicina, fidaxomicina, nitazoxanida, rifaximina ramoplanina ou uma combinação dos mesmos.*

[00035] *Em outro aspecto a linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9693, PTA-9494 ou PTA-9888 é fornecida.*

[00036] *Outro aspecto fornece um método de tratamento de um indivíduo com infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile, que compreende a administração ao indivíduo de pelo menos uma composição como descrito aqui. Em uma modalidade as composições incluem um ou mais dos anticorpos da invenção, preferencialmente na forma humanizada. Em uma modalidade as composições contêm pelo menos um anticorpo antitoxina A fornecido aqui na forma humanizada ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e pelo menos um anticorpo antitoxina B da invenção na forma humanizada ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em várias modalidades, um ou mais reagentes, fármacos, compostos ou ingredientes terapêuticos adicionais podem ser incluídos nas composições. Em uma modalidade as composições incluem ainda um carreador, um diluente, um veículo ou um excipiente*

farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade as composições são administradas em uma quantidade eficiente para tratar a infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile, por exemplo, diarreia associada a C. difficile (CDAD). Em uma modalidade, duas composições são administradas ao indivíduo em uma quantidade eficiente para tratar a infecção causada por C. difficile ou a doença associada a C. difficile. Em uma modalidade, as duas composições são administradas ao mesmo tempo. Em uma modalidade, as duas composições são administradas em momentos diferentes.

[00037] *Outro aspecto fornece um método de inibição ou neutralização da toxicidade a uma célula pela toxina A e pela toxina B C. difficile, que compreende submeter a célula a uma dose de inibição ou neutralização de toxina A de C. difficile eficiente de um anticorpo monoclonal antitoxina A da invenção ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e uma dose de inibição ou neutralização de toxina B de C. difficile eficiente de um anticorpo monoclonal antitoxina B da invenção ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo antitoxina A e o anticorpo antitoxina B estão na forma humanizada. Em uma modalidade, o anticorpo antitoxina A e o anticorpo antitoxina B estão na forma quimérica. Em uma modalidade, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos são administrados ao mesmo tempo. Em uma modalidade, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos são administrados em momentos diferentes. Em uma modalidade de the método, a célula está presente em um indivíduo e os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos são administrados ao indivíduo em quantidade eficiente para inibir ou para neutralizar a toxina A e a toxina B de C. difficile.*

[00038] *Outro aspecto fornece um método de inibição ou*

neutralização da toxicidade de uma célula por uma toxina de C. difficile que compreende submeter a célula a uma dose de inibição ou neutralização de toxina de C. difficile eficiente de pelo menos uma das composições da invenção como descrito aqui. Em uma modalidade do método, a célula é submetida a uma dose de inibição ou neutralização de toxina de C. difficile eficiente de duas composições, das quais uma compreende um anticorpo antitoxina A ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e das quais uma compreende um anticorpo antitoxina B ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, os anticorpos são humanizados. Em uma modalidade, os anticorpos são quiméricos. Em modalidades, as duas composições são administradas ao mesmo tempo ou em momentos diferentes. Em uma modalidade, a célula está presente em um indivíduo e a pelo menos uma composição é administrada ao indivíduo em quantidade eficiente para inibir ou para neutralizar a toxina de C. difficile.

[00039] *Outro aspecto fornece um método de neutralização de toxinas produzidas por uma cepa hipervirulenta de C. difficile, que compreende a administração a um indivíduo que necessita do mesmo de (i) um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção, em que o anticorpo se liga e neutraliza a toxina A de C. difficile e (ii) um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção, em que o anticorpo se liga e neutraliza a toxina B de C. difficile, em uma quantidade eficiente para neutralizar as toxinas produzidas pela cepa hipervirulenta. Em uma modalidade, os anticorpos de (i) e (ii) são anticorpos humanizados. Em uma modalidade, os anticorpos de (i) e (ii) são anticorpos quiméricos. Em modalidades, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos são administrados ao mesmo tempo ou em momentos diferentes. Em uma modalidade, as toxinas da cepa*

hipervirulenta são toxina A e toxina B. Em uma modalidade, a cepa hipervirulenta de C. difficile é uma ou mais de BI/NAP1/027, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, montreal 5 ou montreal 7.1. Em uma modalidade, o anticorpo antitoxina A ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo possui uma atividade de neutralização contra a toxina A produzida pelas cepas hipervirulentas de C. difficile que é determinada por um valor de EC50 de 2,6-12M até 7,7-11M ou de 7,7-12M até 4,8-8M. Em uma modalidade, o anticorpo antitoxina B ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo possui uma atividade de neutralização contra a toxina B produzida pelas cepas hipervirulentas de C. difficile que é determinada por um valor de EC50 de 1,1-11M até 6,5-10M.

[00040] *Em outro aspecto um kit que compreende um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção e como descrito aqui, particularmente na forma humanizada e instruções para uso é fornecido. Em uma modalidade, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos estão contidos no mesmo recipiente no kit. Em uma modalidade, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos estão contidos em recipientes separados no kit. Em uma modalidade, o kit compreende um ligante para a conjugação dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos. Em uma modalidade, o kit compreende um agente terapêutico adicional, que pode ser um antibiótico, agente antibacteriano, bacteriocida ou bacteriostático. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional é metronizadol, vancomicina, fidaxomicina, nitazoxanida, rifaximina ramoplanina ou uma combinação dos mesmos.*

[00041] *Em outro aspecto um anticorpo monoclonal ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, particularmente na forma humanizada, que neutraliza a toxina A ou a toxina B de uma cepa*

hipervirulenta de C. difficile é fornecido. Em uma modalidade o anticorpo monoclonal é denominado pelo número de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888 ou PTA-9693 e é produzido por uma linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888 ou PTA-9693, respectivamente. Em uma modalidade, o anticorpo produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888, PTA-9693 ou PTA-9692 foi humanizado ou está na forma quimérica. Em uma modalidade, a cepa hipervirulenta de C. difficile é uma ou mais de BI/NAP1/027, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, montreal 5 e montreal 7.1.

[00042] *Em outro aspecto um método de tratamento de um indivíduo que é assintomático, mas que é suscetível a ou está em risco de, contrair infecção causada por C. difficile, que compreende: a administração ao indivíduo de (i) um anticorpo antitoxina A de C. difficile ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido e como descrito aqui e (ii) um anticorpo antitoxina B de C. difficile ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido e como descrito aqui, em uma quantidade eficiente para tratar o indivíduo é fornecido. Em uma modalidade do método, o indivíduo está hospitalizado.*

[00043] *Em outro aspecto um anticorpo monoclonal humanizado gerado contra a toxina A de C. difficile é fornecido. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina A de C. difficile é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:1 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:3 e uma região CL humana. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina A de C. difficile é composto de*

dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:2 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:3 e uma região CL humana. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina A de C. difficile é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:1 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:4 e uma região CL humana. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina A de C. difficile é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:2 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:4 e uma região CL humana. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina A de C. difficile é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:5 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:7 e uma região CL humana. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina A de C. difficile é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos

que é apresentada na SEQ ID NO:6 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:7 e uma região CL humana.

[00044] *Em outro aspecto um anticorpo monoclonal humanizado gerado contra a toxina B de C. difficile é fornecido. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina B de C. difficile é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:8 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:10 e uma região CL humana. Em uma modalidade, tal anticorpo antitoxina B de C. difficile é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia pesada contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:9 e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, em que cada cadeia leve contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:10 e uma região CL humana.*

[00045] *Em outro aspecto um anticorpo monoclonal ou um fragmento do mesmo, gerado contra a toxina A de C. difficile, em que o anticorpo é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana é fornecido. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo do anticorpo cadeia pesada da SEQ ID NO: 14 é apresentada na SEQ ID NO:15 (Fig. 38B); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do*

polipeptídeo do anticorpo cadeia leve da SEQ ID NO:16 é apresentada na SEQ ID NO:17 (Fig. 38A).

[00046] *Em outro aspecto um anticorpo monoclonal ou um fragmento do mesmo, gerado contra a toxina A de C. difficile, em que o anticorpo é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana é fornecido. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo do anticorpo cadeia pesada da SEQ ID NO: 18 é apresentada na SEQ ID NO:19 (Fig. 39B); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo do anticorpo cadeia leve da SEQ ID NO:20 é apresentada na SEQ ID NO:21 (Fig. 39A).*

[00047] *Em outro aspecto um anticorpo monoclonal ou um fragmento do mesmo, gerado contra a toxina B de C. difficile, em que o anticorpo é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana é fornecido. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo do anticorpo cadeia pesada da SEQ ID NO:22 é apresentada na SEQ ID NO:23 (Fig. 40B); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo do anticorpo cadeia leve da SEQ ID NO:24 é apresentada na SEQ ID NO:25 (Fig. 40A).*

[00048] *Em várias modalidades direcionadas a qualquer um dos anticorpos monoclonais humanizados da invenção anteriores, a região CH do anticorpo monoclonal é selecionada de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE ou IgM. Em uma modalidade, a região CH é IgG1.*

Em uma modalidade, a região CL é selecionada do isotipo κ ou λ. Em uma modalidade, a região CL é do isotipo κ. Em outras modalidades, as CDRs, isto é, CDR1, CDR2 e/ou CDR3, dos anticorpos humanizados ou fragmentos que se ligam a antígenos do mesmo, como descrito aqui, são adotadas para ligação e/ou neutralização da toxina A e/ou da toxina B de C. difficile em produtos e métodos de acordo com a invenção.

[00049] *Em outro aspecto um anticorpo antitoxina A de C. difficile ou um fragmento do mesmo, em que a região V da cadeia L compreende uma sequência selecionada de uma ou mais das SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:7 é fornecido. É também fornecido um anticorpo antitoxina B de C. difficile ou um fragmento do mesmo, em que a região V da cadeia L compreende uma sequência que é apresentada na SEQ ID NO:10. É também fornecido um anticorpo antitoxina A de C. difficile ou um fragmento do mesmo, em que a região V da cadeia H compreende uma sequência selecionada de uma ou mais das SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:6. É também fornecido um anticorpo antitoxina B de C. difficile ou um fragmento do mesmo, em que a região V da cadeia H compreende uma sequência selecionada de uma ou mais das SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:9.*

[00050] *Em outro aspecto um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que (i) se liga especificamente à toxina A de C. difficile e que compete de forma cruzada pela ligação à toxina A de C. difficile com um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692 ou que (ii) se liga especificamente a um epítopo da toxina A de C. difficile definido por um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, em que o epítopo definido para o anticorpo*

monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692 compreende uma região fora do domínio de ligação ao receptor, por exemplo, o domínio de translocação, da toxina de C. difficile A é fornecido. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma humanizada. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma quimérica.

[00051] *Em outro aspecto um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que (i) se liga especificamente à toxina A de C. difficile e que compete de forma cruzada pela ligação à toxina A de C. difficile com um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9694 ou que (ii) se liga especificamente a um epítopo da toxina A de C. difficile definido por um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9694, em que o epítopo definido para o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9694 compreende pelo menos dois sítios no domínio de ligação ao receptor, por exemplo, epítopos de ligação ao receptor C-terminal, da toxina de C. difficile A é fornecido. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma humanizada. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma quimérica.*

[00052] *Em outro aspecto um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que (i) se liga especificamente à toxina A de C. difficile e que compete de forma cruzada pela ligação à toxina A de C. difficile com um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9888 ou que (ii) se liga especificamente a um epítopo da toxina A de C. difficile definido por um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso*

da ATCC PTA-9888, em que o epítopo definido para o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9888 compreende epítopos de ligação ao receptor C-terminal da toxina A de C. difficile é fornecido. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma humanizada. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma quimérica.

[00053] *Em outro aspecto um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que (i) se liga especificamente à toxina B de C. difficile e que compete de forma cruzada pela ligação à toxina B de C. difficile com um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou que (ii) se liga especificamente a um epítopo da toxina B de C. difficile definido por um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693, em que o epítopo definido para o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 compreende odomínio de enzima N-terminal da toxina B de C. difficile é fornecido. Em uma modalidade, o epítopo definido para o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 compreende um fragmento de 63 kDa gerado pelo tratamento com caspase 1 da toxina B que compreende o domínio de enzima N-terminal da toxina B de C. difficile. Em uma modalidade, o epítopo definido para o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692 compreende o domínio de translocação da toxina B de C. difficile.*

[00054] *Em uma modalidade, o epítopo definido para o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma*

depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692 compreende um fragmento de 167 kDa gerado pelo tratamento com caspase 1 da toxina B e uma proteína de 63 kDa que compreende a toxina B não tratada. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma humanizada. Em uma modalidade, o anticorpo está na forma quimérica.

[00055] *Em outro aspecto um método de produção de um anticorpo monoclonal que se liga e neutraliza toxina A ou toxina B de C. difficile, que envolve a imunização de um ou mais animais receptores com toxoide A inativo em intervalos periódicos; o reforço dos animais com quantidades crescentes de toxina A ativa ou toxina B ativa em intervalos periódicos; a obtenção de células de hibridoma partindo de células imunes do animal imunizado e que sofreu reforço fundidas com uma linhagem de célula imortalizada adequada, em que as células de hibridoma produzem e secretam anticorpos antitoxina A que se ligam e neutralizam a toxina A de C. difficile ou anticorpos antitoxina B que se ligam e neutralizam a toxina B de C. difficile é fornecido. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais de neutralização antitoxina A de C. difficile e/ou os anticorpos monoclonais de neutralização antitoxina B de C. difficile são isolados. Em modalidades do método, as etapas de imunização e reforço incluem um adjuvante. Em uma modalidade, o adjuvante é Quil A. Em outras modalidades do método, as etapas de imunização e reforço são realizadas em intervalos periódicos de cada três semanas. Em outras modalidades, os animais receptores são imunizados com duas ou três doses de toxoide A, seguidas por três até cinco reforços de doses crescentes da toxina A ativa ou da toxina B ativa.*

[00056] *Em outro aspecto, um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que inibe, bloqueia ou previne a toxicidade da toxina A de C. difficile através da inibição, do bloqueio ou da prevenção da internalização da toxina A e da toxicidade citocelular*

é fornecido. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo humanizado ou quimérico. Em uma modalidade o anticorpo é PA-39 (No. de Acesso da ATCC PTA-9692) ou PA-39 humanizado. Em uma modalidade, o anticorpo é PA-50 (No. de Acesso da ATCC PTA-964) ou PA-50 humanizado. Em outras modalidades, o anticorpo compete com PA-39, PA-39 humanizado, PA-50 ou PA-50 humanizado pela ligação à toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo se liga a um sítio isolado em uma região da toxina A fora do domínio de ligação ao receptor de toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo compete com PA-39 ou uma forma humanizada do mesmo pela ligação a um sítio isolado em uma região da toxina A fora do domínio de ligação ao receptor de toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo se liga a pelo menos dois sítios no domínio de ligação ao receptor da toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo compete com PA-50 ou uma forma humanizada do mesmo através da ligação a pelo menos dois sítios no domínio de ligação ao receptor de toxina A. Em uma modalidade, o anticorpo inibe a toxicidade da toxina A através de um mecanismo de ação competitivo misto. Em uma modalidade, o anticorpo inibe a toxicidade da toxina A através de um mecanismo de ação competitivo. Entende-se que todas as modalidades anteriores abrangem o fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo.

[00057] *Em outro aspecto, um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que inibe, bloqueia ou previne a toxicidade da toxina B de C. difficile através da ligação a um sítio epitópico na região enzimática N-terminal da toxina B é fornecido. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo humanizado ou quimérico. Em uma modalidade o anticorpo é PA-41 (No. de Acesso da ATCC PTA-9693) ou uma forma humanizada de PA-41. Em uma modalidade, o*

anticorpo compete com PA-41 ou PA-41 humanizado pela ligação com a região enzimática N-terminal da toxina B de C. difficile. Em uma modalidade, o anticorpo compete com PA-41 ou PA-41 humanizado pela ligação a um sítio isolado na região enzimática N-terminal da toxina B de C. difficile. Em uma modalidade, o anticorpo inibe a toxicidade da toxina B através de um mecanismo de ação competitivo misto.

[00058] *Outro aspecto fornece uma vacina ou um agente imunogênico que compreende porções, fragmentos ou peptídeos da toxina A e/ou da toxina B de C. difficile contendo as regiões epitópicas reconhecidas e/ou ligadas por um ou mais de anticorpo monoclonal PA-39 (No. de Acesso da ATCC PTA-9692), uma forma humanizada de PA-39, o anticorpo monoclonal PA-50 (No. de Acesso da ATCC PTA-9694), uma forma humanizada de PA-51, o anticorpo monoclonal PA-41 (No. de Acesso da ATCC PTA-9693), uma forma humanizada de PA-41, um anticorpo que compete pela ligação da toxina A com o anticorpo monoclonal PA-39 ou uma forma humanizada do mesmo, um anticorpo que compete pela ligação de toxina A com anticorpo monoclonal PA-50 ou uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo que compete pela ligação de toxina B com anticorpo monoclonal PA-41 ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, a vacina ou o agente imunogênico compreende porções, fragmentos ou peptídeos da toxina A e da toxina B de C. difficile contendo as regiões epitópicas reconhecidas e/ou ligadas por um ou mais de anticorpo monoclonal PA-39 (No. de Acesso da ATCC PTA-9692), uma forma humanizada de PA-39 ou um anticorpo que compete pela ligação de toxina A e toxina B com o anticorpo monoclonal PA-39 ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, as porções, os fragmentos ou os peptídeos que contêm epítopo da toxina A e/ou da toxina B da vacina ou do agente imunogênico são derivados*

da proteína da toxina A ou da toxina B por clivagem proteolítica. Em uma modalidade, os fragmentos, as porções ou os peptídeos da toxina A da vacina ou do agente imunogênico são produzidos através de clivagem proteolítica pela enteroquinase. Em uma modalidade, os fragmentos, as porções ou os peptídeos da toxina B da vacina ou do agente imunogênico são produzidos através de clivagem proteolítica pela caspase (caspase 1). Em uma modalidade, as porções ou os fragmentos que contêm epítopo da vacina ou do agente imunogênico são peptídeos qumicamente ou recombinantemente sintetizados da proteína da toxina A ou da toxina B. Em uma modalidade, os fragmentos, as porções ou os peptídeos da vacina ou do agente imunogênico contendo uma ou mais regiões epitópicas da toxina A e/ou da toxina B que são reconhecidas e ligadas pelo anticorpo são derivados de um ou mais dos terminais aminos da toxina A; dos terminais aminos de toxina B; dos terminais carbóxi da toxina A; dos terminais carbóxi da toxina B; do domínio de ligação ao receptor da toxina A; uma região fora do domínio de ligação ao receptor da toxina A; o domínio de ligação ao receptor da toxina B; a região enzimática N-terminal da toxina B; o domínio de glicosiltransferase da toxina A; o domínio de glicosiltransferase da toxina B; o domínio proteolítico da toxina A; o domínio proteolítico da toxina B; o domínio formador de poros hidrofóbicos da toxina A; ou o domínio formador de poros hidrofóbicos da toxina B. Em uma modalidade, os fragmentos ou as porções que contêm epítopo da toxina A ou da toxina B possuem <300 kDa, ~158-160 kDa, ~100-105 kDa, por exemplo, 103 kDa, ~90-95 kDa, por exemplo, 91 kDa e/ou ~63-68 kDa, por exemplo, 63 kDa ou 68 kDa de tamanho. Em uma modalidade, os fragmentos ou as porções que contêm epítopo da toxina A possuem ~158-160 kDa; ~90-95 kDa, por exemplo, 91 kDa e/ou ~63-68 kDa, por exemplo, 68 kDa de tamanho. Em uma modalidade, os fragmentos ou as porções que

contêm epítopo da toxina B possuem ~100-105 kDa, por exemplo, 103 kDa e/ou ~63-68 kDa, por exemplo, 63 kDa de tamanho. Em qualquer uma das modalidades da vacina ou do agente imunogênico, a toxina A ou a toxina B ou fragmento, porção ou peptídeo das mesmas, é aquele das cepas fornecidas aqui.

[00059] *Outro aspecto fornece um método de neutralização, inibição, bloqueio, redução, melhora, cura ou tratamento de infecção causada por C. difficile ou uma doença associada a C. difficile em um indivíduo que necessita do mesmo, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficiente da vacina ou do agente imunogênico descrito anteriormente. Em uma modalidade do método, uma resposta humoral à toxina A e/ou à toxina B de C. difficile após a administração da vacina ou do agente imunogênico é ativada no indivíduo, produzindo assim anticorpos antitoxina A e/ou antitoxina B que podem especificamente neutralizar, inibir, bloquear, reduzir, melhorar, curar ou tratar doença associada a C. difficile ou CDAD, incluindo diarreia suave a grave e em alguns casos associada a complicações graves que ameaçam a vida, tais como colite pseudomembranosa, megacólon tóxico, perfuração intestinal, septicemia e morte, no indivíduo. Em uma modalidade do método, os anticorpos que são ativados através da resposta humoral do indivíduo incluem anticorpos que possuem especificidades e mecanismos de ação similares ou idênticos aos mAbs da invenção ou anticorpos que competem com os mAbs da invenção na neutralização da toxina A e/ou da toxina B de C. difficile ou que competem com os mAbs da invenção no mecanismo de ação envolvido na neutralização da toxina A e/ou da toxina B de C. difficile.*

[00060] *Em outro aspecto, um método de neutralização, inibição ou bloqueio da na atividade da toxina A e/ou da toxina B dentro ou contra uma célula suscetível à infecção causada por C. difficile, que*

compreende o contato da célula com um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, neutraliza, inibe ou bloqueia a atividade da toxina A e/ou da toxina B dentro ou contra a célula através de um mecanismo de ação competitivo ou competitivo misto é fornecido. Em uma modalidade do método, o anticorpo é um ou mais de um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico. Em uma modalidade do método, a célula, por exemplo, uma célula epitelial intestinal, está em um indivíduo e o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é administrado em uma quantidade eficiente ao indivíduo. Em uma modalidade do método, a toxina é toxina A. Em uma modalidade do método, a toxina é toxina B. Em uma modalidade do método, a toxina é toxina A e o mecanismo de ação é um mecanismo ação de inibição competitiva. Em uma modalidade do método, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é PA-50 (No. de Acesso da ATCC PTA-9694), uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo ou fragmento do mesmo, que compete com PA-50 para a neutralização da atividade da toxina A. Em uma modalidade do método, a toxina é toxina A e o mecanismo de ação é um mecanismo de ação de inibição competitiva mista. Em uma modalidade do método, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é PA-39 (No. de Acesso da ATCC PTA-9692), uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo ou fragmento do mesmo, que compete com PA-39 para a neutralização da atividade da toxina A. Em uma modalidade do método, a toxina é toxina B e o mecanismo de ação é a mecanismo de ação de inibição competitiva mista. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é PA-41 (No. de Acesso da ATCC PTA-9693), uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo ou fragmento do

mesmo, que compete com PA-41 para a neutralização da atividade da toxina B.

[00061] *Estes e outros aspectos da invenção serão descritos em detalhes adicionais em* associação com a descrição detalhada da invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

[00062] As **Figs. 1A-1C** demonstram a especificidade de mAbs da invenção antitoxina de *C. difficile* para toxina A e/ou toxina B através de ELISA. As placas de *ELISA foram revestidas com toxina A (círculos preenchidos) ou toxina B (quadrados* vazios) durante a noite a 4ºC. Após as placas serem lavadas e bloqueadas, mAb PA-38 (A), PA-39 (B) ou PA-41 (C) murino foi titulado e adicionado nas placas. A ligação do anticorpo monoclonal foi detectada com IgG-Fc anti camundongo de caprino conjugado com HRP. A DO foi medida em uma Leitora de Placas SpectraMax M5 (Molecular Devices).

[00063] As **Figs. 2A-2D** fornecem resultados de ensaios de caracterização de ligação com Biacore utilizando mAbs PA-38, PA-39, PA-41 e PA-50 murinos. A especificidade de ligação foi determinada utilizando um instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare). Os mAbs (PA-38 (**2A**), PA-39 (**2B**), PA-50 (**2C**), PA-41 (**2D**) ou mAb não específico como controle foram imobilizados covalentemente sobre a superfície do chip sensor CM5 (GE Healthcare) a aproximadamente 10.000 unidades de ressonância (UR) de acordo com as instruções do fabricante para acoplamento de amina. Os experimentos de ligação foram realizados a 25□C em PBS. A toxina A ou a toxina B purificada (List Biological Laboratories) a 30 nM foi passada pelo controle (mAb não específico) e células de fluxo de teste a uma vazão de 5 µL/min com uma fase de associação (600s para PA-38, PA-39 e PA-41; e 300s para PA-50) e uma fase de dissociação (300s para PA-38, PA-39 e PA-41; e 600s para PA-50). Os gráficos são apresentados em UR ao

longo do tempo.

[00064] As **Figs. 3A-3E e 3F-3H** mostram os resultados da cinética de ligação toxina-anticorpo como determinado por Biacore. Para as **Figs. 3A-3E**, mAbs murinos foram capturados utilizando um chip sensor CM5 preparado com o kit de captura de anticorpo de camundongo da Biacore. A toxina foi então passada ao longo das células de fluxo em concentrações variáveis (0,4 -100 nM, aumento de duas vezes) a uma vazão de 30 µL/min. Todas as concentrações de mAb foram testadas em duplicata e a superfície do chip foi regenerada após cada corrida utilizando as condições especificadas no kit. As alterações em UR foram registradas e analisadas *utilizando* o modelo de ligação 1:1 do Software de Avaliação Bia (Langmuir) que calculava a K_D do mAb para a toxina. **Fig. 3A**: ligação de PA-38 à toxina A; **Fig. 3B**: ligação de PA-50 à toxina A; **Fig. 3C**: ligação de PA-39 à toxina A; **Fig. 3D**: ligação de PA-39 à toxina B; e **Fig. 3E**: ligação de PA-41 à toxina B. Para as **Figs. 3F-3H**, como anteriormente, os mAbs murinos, isto é, mPA-50, mPA-41 ou mPA-39, foram ligados covalentemente a um chip sensor CM5 através do método de acoplamento com amina. A toxina A (linha denominada "(vermelho)") ou toxina B (linha denominada "(azul)") a 30 nM foi passada ao longo das células de fluxo de teste (mPA-50, mPA-41 ou mPA-39) a uma vazão de 5 µL/min. Os resultados mostram que mPA-50 se liga seletivamente à toxina A (**Fig. 3F**) e mPA-41 se liga seletivamente à toxina B (**Fig. 3G**). mPA-39 se liga preferencialmente à toxina A, mas também demonstra reatividade cruzada à toxina B (**Fig. 3H**).

[00065] A **Fig. 4** demonstra a atividade de neutralização *in vitro* da atividade da toxina A utilizando mAb murino purificado PA-39 sobre células CHO-K1. Para as medidas de citotoxicidade, a toxina A foi incubada com concentrações variáveis de PA-39 durante 1 hora a 37°C (Exemplo 3A). As misturas de mAb-toxina foram então

adicionadas nas células CHO-K1 plaqueadas em placas de 96 poços a 2.000 células/poço e incubadas durante 72 horas. A sobrevivência celular foi comparada em culturas tratadas e não tratadas e a concentração de mAbs necessária para 50% de neutralização da citotoxicidade (EC_{50}) foi calculada. A viabilidade celular foi determinada através de CellTiter-Blue; os dados brutos foram normalizados para os poços de controle não tratados. Os valores foram representados graficamente utilizando Prism e as curvas foram calculadas utilizando um modelo de resposta à dose sigmoidal (inclinação da reta variável). A curva foi então utilizada para determinar EC_{50} de mAb. Os pontos de dados representam a média de três poços na mesma placa.

[00066] A **Fig. 5** demonstra a atividade de neutralização *in vitro* da atividade da toxina B utilizando mAb murino purificado PA-41 em células CHO-K1. Para as medidas de citotoxicidade, a toxina B foi incubada com concentrações variáveis de PA-41 durante 1 hora a 37°C (Exemplo 3B). As misturas de mAb-toxina foram então adicionadas nas células CHO-K1 plaqueadas em placas de 96 poços a 2.000 células/poço e incubadas durante 72 horas. A sobrevivência das células foi comparada em culturas tratadas e não tratadas e a concentração de mAbs necessária para 50% de neutralização de citotoxicidade (EC_{50}) foi calculada. A viabilidade celular foi determinada através de CellTiter-Blue; os dados brutos foram normalizados para os poços de controle não tratados. Os valores foram representados graficamente utilizando Prism e as curvas foram calculadas utilizando um modelo de resposta à dose sigmoidal (inclinação da reta variável). A curva foi então utilizada para determinar EC_{50} de mAB. Os pontos de dados representam a média de três poços na mesma placa.

[00067] A **Fig. 6** demonstra a atividade de neutralização *in vitro* da atividade da toxina A utilizando mAbs murinos purificados PA-38 e PA-50 em células T-84. (Exemplo 3C). As células T-84 foram semeadas

(15.000 células/poço) em placas de 96 poços e tratadas com uma combinação de mAb titulado (PA-38 (■) ou PA-50 (▲)) e toxina A (60 ng/mL). Após a incubação (72 horas), a sobrevivência das células foi comparada em culturas tratadas e não tratadas e a concentração de mAbs necessária para 50% de neutralização de citotoxicidade (EC_{50}) foi calculada. A viabilidade celular foi determinada através de CellTiter-Blue; os dados brutos foram normalizados para os poços de controle não tratados. Os valores foram representados graficamente utilizando Prism e as curvas foram calculadas utilizando um modelo de resposta à dose sigmoidal (inclinação da reta variável). A curva foi então utilizada para determinar EC_{50} de mAb. Os pontos de dados representam a média de três poços na mesma placa.

[00068] A **Fig. 7** demonstra os resultados de teste de mAbs murinos PA-38 (■) ou PA-50 (▲) em relação a sua capacidade de bloquear ou prevenir a hemaglutinação induzida pela toxina A de células sanguíneas vermelhas de coelho (RBCs). A toxina A (2 µg/mL) foi combinada com várias diluições de PA-38 ou PA-50 e a mistura foi adicionada às placas contendo 50 µL de eritrócitos de coelho. As placas foram incubadas a 4ºC durante 4 horas. A hemaglutinação foi quantificada como intensidade de cor utilizando ImageQuant 400 (GE Healthcare) análise de arranjo de dot. Os dados foram transformados em % de controle, com 100% representando nenhuma hemaglutinação. Os pontos de dados representam a média de três poços analisados na mesma placa.

[00069] A **Fig. 8** demonstra a atividade de mAbs antitoxina de *C. difficile* da invenção na prevenção do rompimento de uma monocamada de células Caco-2 pela toxina A. As células Caco-2 foram semeadas (25.000 células/poço) na câmara superior de uma placa de Ensaio de Caco-2 Multiscreen de 96 poços (Millipore). Após uma incubação de 10-14 dias, a formação de uma monocamada

compacta foi confirmada através da medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) utilizando um voltohmômetro epitelial (World Precision Instruments). Após a integridade da monocamada ser estabelecida e determinada, a toxina A (25 ng/mL) e mAbs murinos diluídos em série (PA-38 (■) ou PA-50 (▲)) foram adicionados na câmara superior da placa de ensaio. As placas foram incubadas durante 18-24 horas e o valor de TEER foi medido utilizando o voltohmômetro. A integridade da monocamada foi comparada nos poços não tratados e tratados com toxina. Os dados de inibição foram ajustados a uma curva de resposta à dose sigmoidal com regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism com a finalidade de determinar a concentração de mAb necessária para 50% de inibição da toxina (EC_{50}).

[00070] As **Figs. 9A-9C** demonstram a capacidade dos mAbs antitoxina A PA-38 **(9A)** e PA-50 **(9B)** de neutralizar a atividade da toxina A *in vivo*. Fêmeas de camundongos Swiss Webster (6-8 semanas de idade, 5 camundongos/grupo) receberam injeção (i.p.) de mAb murino PA-38 ou mAb murino PA-50 nas quantidades indicadas ou com PBS (200 µL) no dia 0. A atividade de neutralização de um anticorpo monoclonal antitoxina comparador, referido aqui como CDA-1, foi avaliada nas quantidades de anticorpo indicadas (**9C**). O mAb comparador antitoxina A CDA-1 foi produzido através da síntese (DNA2.0) de ácidos nucleicos que codificam regiões variáveis de cadeia pesada e leve de 3D8 (WO2006/121422 e US2005/0287150), que foram clonados em vetores de expressão de IgG1 humana de comprimento completo (pCON-gama1 e pCON-kappa). O mAb comparador CDA-1 foi expresso e produzido em células CHO-KSV1 e purificado como descrito na seção de Exemplos. Os camundongos receberam então injeção de 100 ng da toxina A (200 µL) no dia 1 e foram monitorados diariamente ao longo das primeiras 72 horas e

semanalmente depois disso. Os resultados mostram que ambos os mAbs PA-38 e PA-50 são capazes de inibir completamente a toxicidade associada à toxina A após uma única dose de 2 µg de mAb/animal, enquanto que o mAb CDA-1 comparador (5 µg/animal) falhou em inibir completamente a toxicidade associada à toxina A de *C. difficile*.

[00071] A **Fig. 10** demonstra a capacidade de mAb PA-41 de neutralizar a atividade da toxina B *in vivo*. Fêmeas de camundongos Swiss Webster (6-8 semanas de idade, 5 camundongos/grupo) receberam injeção (i.p.) de mAb murino PA-41 nas quantidades indicadas ou de PBS (200 µL) no dia 0. Os camundongos receberam então injeção de 100 ng da toxina B (200 µL) no dia 1 e foram monitorados diariamente ao longo das primeiras 72 horas e semanalmente depois disso. Os resultados deste experimento mostram que o mAb PA-41 inibe completamente a toxicidade associada à toxina B de *C. difficile* após uma única dose de 5 µg de mAb/animal. Um *experimento* similar foi realizado utilizando um anticorpo monoclonal comparador antitoxina B, referido como mAb CDB-1 comparador aqui. O mAb CDB-1 comparador antitoxina B was produzido através da síntese de ácidos nucleicos (DNA2.0) que codificam regiões variáveis de cadeia pesada e leve de 124 (WO2006/121422 e US2005/0287150), que foram clonados em vetores de expressão de IgG1 humana de comprimento completo (pCON-gama1 e pCON-kappa). O mAb CDB-1 comparador foi expresso e produzido nas células CHO-KSV1 e purificado como descrito na seção de Exemplos aqui. Os resultados destes experimentos não mostravam atividade de neutralização da toxina B pelo mAb CDB-1 comparador, mesmo em uma quantidade de 250 µg.

[00072] A **Fig. 11** demonstra a capacidade de uma combinação de mAbs murinos PA-38 e PA-41 (PA-38+PA-41) da invenção para

neutralizar a atividade da toxina A e da toxina B *in vivo*. Fêmeas de camundongos Swiss Webster (6-8 semanas de idade, 5 camundongos/grupo) receberam injeção (i.p.) da combinação de mAb PA-38+PA-41 ou de PBS (200 µL) no dia 0. Os camundongos receberam então injeção de 100 ng de uma combinação da toxina A e da toxina B (200 µL) no dia 1 e foram monitorados diariamente ao longo das primeiras 72 horas e semanalmente depois disso. As representações gráficas para toxina, PA-38 isoladamente (círculos vazios) e PA-41 isoladamente (losangos preenchidos) se sobrepõem no gráfico. Os resultados mostram que nem o mAb PA-38 (círculos vazios) nem o mAb PA-41 (losangos preenchidos) isoladamente era suficiente para inibir os efeitos de ambas as toxinas e não protegia os animais contra infecção causada por *C. difficile*. Em contraste, a combinação de PA-38 e PA-41 (PA-38+PA-41) a 50 µg cada (triângulos invertidos vazios) era capaz de proteger os animais infectados e de prevenir a morte relacionada com a toxina em 4 de 5 animais de teste. A combinação de PA-38 e PA-41 (PA-38+PA-41) a 5 µg cada (círculos preenchidos) fornecia alguma proteção contra a toxicidade da toxina A e da toxina B de *C. difficle* nos animais de teste infectados.

[00073] As **Figs. 12A e 12B** demonstram os resultados farmacocinéticos (PK) em hamsters para mAbs murinos PA-38 e PA-41. *Os* hamsters receberam dose i.p. com 2 mg/kg (□) ou 10 mg/kg (■) de mAb PA-38 (**12A**) ou PA41 (**12B**). Foi coletado o sangue dos animais em intervalos regulares e o soro foi analisado utilizando um ELISA com placas revestidas com toxina e IgG anticamundogo de caprino, HRP conjugado para detecção. As curvas resultantes ilustram a resposta dependente da dose nos grupos de 2 mg/kg e 10/mg/kg para cada anticorpo. A análise de WinNonLin foi realizada em cada curva. Ambos os anticorpos monoclonais possuem uma meia-vida

terminal maior que 6 dias.

[00074] A **Fig. 13** ilustra os resultados de sobrevivência do estudo com hamster descrito no Exemplo 5B. Neste estudo, os hamsters foram tratados com clindamicina, inoculados com *C. difficile* (■ controle infectado, Grupo 3) e então tratados com vancomicina (□ 20 mg/kg, Grupo 4), uma combinação de mAbs murinos PA-38 + PA-41 (□ 50, 50 mg/kg, Grupo 6) ou uma combinação de mAbs PA-39 + PA-41(□ 50, 40 mg/kg, Grupo 7). Todos os animais no controle não infectado (Grupo 1) e no controle tratado com Abs *policlonais* de caprino (grupo 5) sobreviveram. Os animais tratados com uma combinação de mAbs antitoxina A e antitoxina B da invenção sobreviveram e estavam protegidos contra a toxicidade de *C. difficile* ao longo da duração do estudo.

[00075] A **Fig. 14** mostra o peso corporal médio (em gramas) de hamsters do estudo descrito no Exemplo 5B. Os grupos de tratamento de animais são como a seguir: controle não infectado (♦, Grupo 1); controle tratado com vancomicina (■, Grupo 4); grupo tratado com a combinação de mAb PA-38 + PA-41 murino (x, Grupo 6) ou grupo tratado com combinação de mAb PA-39 + mAb PA-41 murino (●, Grupo 7). Os animais no grupo de controle infectado (Grupo 3) não sobreviveram durante 5 dias; portanto, uma medida do peso corporal após a infecção não podia ser feita para o Grupo 3.

[00076] As **Figs. 15A-15D** representam os resultados de necrópsia pós-morte do estudo com hamster descrito no Exemplo 5B. Animais representativos de cada um dos grupos relevantes do estudo foram avaliados: (**A**) Grupo 1, controle não infectado; (**B**) Grupo 3, controle infectado; (**C**) Grupo 6, grupo tratado com combinação de mAb PA-38 + PA-41 murino; e (**D**) Grupo 7, grupo tratado com combinação de mAb PA-39 + PA-41 murino. As setas indicam o ceco de cada hamster. O ceco estava notavelmente avermelhado e inflamado no

grupo de controle infectado 3 (**B**). Em contraste, os cecos dos hamsters no Grupo 6 (**C**) e no Grupo 7 (**D**) eram similares aos cecos nos animais não infectados de controle saudáveis do Grupo 1 (**A**).

[00077] **Figs. 16A e 16B-1 e B-2.** A **Fig. 16A** ilustra os resultados de sobrevivência do estudo com hamster descrito no Exemplo 5C. Neste estudo, os hamsters foram tratados com clindamicina, inoculados com *C. difficile* (■ controle infectado, Grupo 1) e então grupos diferentes de animais foram tratados com vancomicina (♦ 20 mg/kg, Grupo 2), a combinação de mAbs murinos PA-39 + PA-41 (▲50 + 50 mg/kg, Grupo 3), mAb murino PA-41 isoladamente (○ 50 mg/kg, Grupo 4), mAb murino PA-38 isoladamente (□ 50 mg/kg, Grupo 5), mAb murino PA-39 isoladamente (□ 50 mg/kg, Grupo 6) ou mAb murino PA-50 isoladamente (□ 50 mg/kg, Grupo 7). Todos os animais no controle não infectado (Grupo 1) sobreviveram durante o curso do estudo. A **Fig. 16B-1** ilustra os resultados de sobrevivência dos animais do estudo com hamster descrito no Exemplo 5E. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier são mostradas para animais tratados com clindamicina e então inoculados com *C. difficile* (■, Controle infectado, Grupo 2); tratados com vancomicina (□, 20 mg/kg, Grupo 3); tratados com uma combinação 1:1 de mAbs PA-50 + PA-41 humanizados ((hPA-50 + hPA-41), □, 50 + 50 mg/kg, Grupo 4); tratados com uma combinação 1:1 *de* mAbs PA-50 + PA-41 humanizados ((hPA-50 + hPA-41), ○, 20 + 20 mg/kg, Grupo 5); tratados com uma combinação 1:1 de mAbs CDA-1 + CDB-1 comparadores ((CDA-1+CDB-1), □, 50 + 50 mg/kg, Grupo 6); ou tratados com uma combinação 1:1 de mAbs CDA-1 + CDB-1 comparadores ((CDA-1+CDB-1), □ 20 + 20 mg/kg, Grupo 7). A **Fig. 16B-2** ilustra os resultados de alteração de peso do estudo com hamster descrito no Exemplo 5E. Os pesos corporais médios (□SD) de animais ao longo do tempo nos grupos de tratamento diferentes

descritos para a **Fig. 16B-1** se comparavam com os animais de controle não infectados.

[00078] As **Figs. 17A-17C** mostram o tratamento com caspase 1 da toxina B de *C. difficile*. (**A**): Toxina B de *C. difficile* de comprimento completo e seus domínios. (**B**): análise de SDS-PAGE (redutor) com 3-8% de Tris-Acetata da toxina B (TcdB) e *toxina* B tratada com caspase 1. Quatro fragmentos de toxina foram observados: 193, 167, 103 e 63 kDa. (**C**): Os possíveis fragmentos foram gerados após o tratamento com caspase 1 da toxina B.

[00079] As **Figs. 18A-18C** mostram SDS-PAGE (**A**) e Western blot (**B, C**) detecção de fragmentos da toxina B de *C. difficile* utilizando mAbs antitoxina B. (**A**): Análise de SDS-PAGE dos fragmentos de toxina B gerados pelo tratamento com caspase 1 (mesmo que **Fig. 17B**); (**B**): detecção com Western blot dos fragmentos de toxina B utilizando mAb PA-41. (**C**) detecção com de fragmentos de toxina B utilizando mAb murino PA-39.

[00080] As **Figs. 19A-19E** mostram a caracterização de mAbs antitoxina de *C. difficile* murinos por ligação com Biacore. A ligação competitiva dos mAbs antitoxina foi avaliada. (**A**): mAb PA-41 se liga a um único epítopo na toxina B. (**B**): mAb PA-39 se liga a um único epítopo na toxina A. (**C**): mAbs PA-39 e PA-*41* se ligam a epítopos diferentes na toxina B. A ligação de mAb PA-41 à toxina B é epitopicamente diferente da ligação de o anticorpo CDB-1 comparador antitoxina B à toxina B. (**D**) mPA-41 imobilizado sobre o chip CM5 captura a toxina B, mas não é capaz de se ligar a mA-41 adicional, indicando assim que há apenas um epítopo de ligação de mPA-41. A adição do mAb CDB-1 comparador forneceu um sinal aumentado, demonstrando que mPA-41 e mAb CDB-1 comparador se ligam a epítopos diferentes na toxina B. (**E**) análise de Western blot utilizando toxina B, tratada ou não tratada com caspase 1, demonstrando que

mPA-41 e mAb CDB-1 comparador possuem padrões de ligação diferentes e se ligam a epítopos diferentes na toxina B.

[00081] As **Figs. 20A-20C** mostram a clivagem da toxina A de *C. difficile* utilizando enteroquinase (EK). (**A**): Toxina A de *C. difficile* de comprimento completo e *seus* domínios. (**B**): Análise de SDS-PAGE (redutor) com 3-8% de Tris-Acetato da toxina A (TcdA) e toxina A tratada com EK. (**C**): Os possíveis fragmentos gerados após o tratamento com EK da toxina A a 25ºC durante 48 horas.

[00082] As **Figs. 21A-21C** mostram a coloração com Azul de Coomassie (SDS-PAGE), (**A**) e a detecção com Western blot (**B, C**) de fragmentos da toxina A de *C. difficile* utilizando mAbs antitoxina A murinos. (**A**): Análise de SDS-PAGE dos fragmentos da toxina A gerados através do tratamento com EK (mesmo que **Fig. 20B**). (**B**): detecção com Western blot de fragmentos da toxina A utilizando mAb PA-50. (**C**): detecção com Western blot de fragmentos da toxina A utilizando mAb PA-39. Nas **Figs. 21B e 21C**, a banda em kDa é ~158 kDa e pode ser considerada como sendo ~158-160 kDa.

[00083] **Figs. 22A-1 e A-2-22F.** As **Figs. 22A-1 e A-2-22D** mostram a caracterização da ligação do mAb antitoxina A murino à toxina A de *C. difficile* utilizando um ensaio de ligação Biacore. **Fig. 22A-1**: Foi observado que PA-50 mAb se ligava a vários sítios na toxina A. **Fig. 22A-2**: PA-50 mAb foi *imobilizado* sobre o chip sensor e então sequencialmente colocado em contato com a toxina A purificada, PA-50 adicional e mAb CDA-1 comparador (WO/2006/121422; US2005/0287150). **Fig. 22B:** a toxina A capturada pelo mAb CDA-1 comparador no chip Biacore se liga adicionalmente aos mAbs CDA-1 e PA-50 adicionais, mostrando as diferenças nos epítopos da toxina A ligados pelos anticorpos. **Fig. 22C**: o epítopo de ligação com PA-39 mAb na toxina A é diferente do epítopo de ligação do mAb CDA-1 comparador na toxina A. **Fig. 22D:** a ligação competitiva de mAbs

murinos PA-50 e PA-39 à toxina A foi realizada utilizando Biacore. O mAb PA-50 imobilizado sobre o chip CM5 captura a toxina A, que pode se ligar a mPA-50 adicional e ainda mPA-39, demonstrando que há várias cópias do epítopo mPA-50 na toxina A e que mPA-50 e mPA-39 se ligam a epítopos diferentes na toxina A. **Figs. 22E e 22F**: Os resultados de Biacore foram confirmados através da análise de Western blot utilizando a toxina A que foi não tratada ou tratada com a enzima enteroquinase (EK). (**E**): mPA-39 e mAb CDA-1 comparador mostram diferentes padrões de ligação com a toxina A tratada com EK (Faixa: TcdA/EK), indicando assim domínios de ligação e epítopos diferentes na toxina A. (**F**): mPA-50 e mAb CDA-1 comparador se ligam ao mesmo domínio da toxina A, mas a epítopos diferentes.

[00084] As **Figs. 23A e 23B** demonstram a atividade de neutralização de PA-41 *in vitro* contra um conjunto distinto de vinte isolados clínicos toxigênicos de *C. difficile*, including 6 isolados BI/NAP1/027, 3 cepas de referência (VPI 10463, ATCC 43596 e 630), 2 isolados negativos para a toxina A/positivos para a toxina B (toxA-/toxB+), 3 isolados de pacientes de ambulatório e 6 outros isolados clínicos. A **Fig. 23A** mostra a atividade de neutralização de mAb murino PA-41 em células CHO-K1 contra sobrenadantes gerados partindo de culturas de isolados clínicos de *C. difficile* diferentes que são apresentados no Exemplo 8, Tabela 6. O mAb PA-41 purificado foi diluído em série e então misturado com um sobrenadante com fator de diluição pré-definido que pode causar >90% de morte celular. As misturas foram incubadas durante 1 hora a 37ºC e então adicionadas às células CHO-K1. As células foram incubadas durante 72 horas e a viabilidade celular foi medida utilizando Cell-Titer Blue. A **Fig. 23B** ilustra a atividade de neutralização de mAb hPA-41 humanizado bem como aquela de mAb CDB-1 comparador contra as 2 cepas de referência de *C. difficile* (VPI 10463 e ATCC 43596) e 6 cepas

BI/027/027 de *C. difficile* (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 e Montreal 7.1). A atividade de neutralização de mAb hPA-41 (quadrados preenchidos) e mAb CDB-1 comparador (triângulos preenchidos) em células CHO-K1 contra sobrenadantes de cepas de referência (VPI 10483 e ATCC 43596) e cepas BI/NAP1/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 e Montreal 7.1) é mostrada.

[00085] As **Figs. 24A e 24B** demonstram a atividade de neutralização de mAb PA-50 *in vitro* contra os isolados clínicos toxigênicos de *C. difficile* descritos para as Figs. 23A e B. A **Fig. 24A** mostra a atividade de neutralização de mAb murino PA-50 em células T-84 contra sobrenadantes gerados partindo de culturas de isolados clínicos de *C. difficile* diferentes como apresentado no Exemplo 8, Tabela 6. O mAb PA-50 purificado foi diluído em série e então misturado com um sobrenadante com fator de diluição pré-definido que pode causar >90% de morte celular. As misturas foram incubadas durante 1 hora a 37°C e então adicionadas às células T-84. As células foram incubadas durante 72 horas e a viabilidade celular foi medida utilizando Cell-Titer Blue. A **Fig. 24B** mostra os resultados de experimentos similares realizados utilizando mAb hPA-50 humanizado e o mAb CDA-1 comparador nas células T-84. A atividade de neutralização de hPA-50 (quadrados preenchidos) e CDA-1 comparador (triângulos preenchidos) nas células T-84 contra sobrenadantes gerados partindo de seis cepas BI/NAP1/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 e Montreal 7.1) é mostrada. Para a **Fig. 24A**: *: N/A: Não Aplicável; não foi produzida toxina A partindo de cepas toxina A-/toxina B+ F1470, 8864, CCL13820 e CCL14402; ": O título da toxina A era muito baixo; nenhuma citotoxicidade mensurável em T-84 utilizando sobrenadante; ^: Não Aplicável; não foi produzida toxina A partindo de cepas toxina A-/toxina B+ ou a concentração era muito baixa.

[00086] As **Figs. 25A-25D** demonstram a neutralização de toxinas produzidas por cepas diversas de *C. difficile***.** As **Figs. 25A e 25B** mostram atividade de neutralização de mAb murino PA-39 nas células T-84 contra sobrenadantes gerados partindo de culturas de isolados clínicos diferentes de *C. difficile* como apresentado no Exemplo 8, Tabela 6. O mAb PA-39 (sobrenadante de hibridoma) foi diluído em série e o fator de diluição de cada sobrenadante é mostrado. A **Fig. 25B** mostra os resultados de experimentos similares realizados utilizando mAb murino PA-39 e o mAb CDA-1 comparador nas células T-84. A atividade de neutralização de PA-39 (quadrados preenchidos) e do mAb CDA-1 comparador (triângulos preenchidos) nas células T-84 contra sobrenadantes gerados partindo de seis cepas BI/NAP1/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 e Montreal 7.1) é mostrada. Para a **Fig. 25A**: *: N/A: Não Aplicável; não foi produzida toxina A partindo de cepas toxina A-/toxina B+ F1470, 8864, CCL13820 e CCL14402; ": O título de toxina A era muito baixo; nenhuma citotoxicidade mensurável sobre T-84 utilizando o sobrenadante; ^: Não Aplicável; não foi produzida toxina A partindo de cepas toxina A-/toxina B+ ou a concentração era muito baixa. Na **Fig. 25C**, o mAb antitoxina A humanizado PA-50 e o mAb CDA-1 comparador antitoxina A foram testados em relação à neutralização da citoxicidade de sobrenadantes de culturas de *C. difficile* contra células T-84. (Exemplo 8, Tabela 7). Na **Fig. 25D**, o mAb antitoxina B humanizado PA-41 e o mAb comparador antitoxina A CDB-1 foram testados em relação à neutralização da citoxicidade de sobrenadantes de culturas de *C. difficile* contra células T-84. (Exemplo 8, Tabela 7).

[00087] A **Fig. 26** mostra que o mAb PA-41 quimérico (cPA-41 mAb) neutraliza eficientemente a toxicidade da toxina B de *C. difficile* em CHO-K1 comparado com o correspondente mAb murino PA-41. Dois mAbs PA-41 quiméricos foram gerados; um que tinha um sítio de

glicosilação removido na região VL, denominado de cPA-41(NG) e um que não tinha remoção do sítio de glicosilação, denominado de cPA-41(G) na figura. Tanto cPA-41(NG) quanto cPA-41(G) mostravam níveis de neutralização similares para a toxina B (2 pg/mL, TechLab) em células CHO-K1 e ambos os mAbs quiméricos neutralizavam a toxina B em um nível similar aquele do mAb murino parental (mPA-41).

[00088] A **Fig. 27** mostra que mAb PA-39 quimérico (cPA-39) neutraliza eficientemente a toxicidade da toxina A de *C. difficile* (1 µg/mL, Listlab) em células CHO-K1 comparado com o mAb PA-39 murino parental (mPA-39).

[00089] A **Fig. 28** mostra que mAb PA-50 quimérico (cPA-50) neutraliza eficientemente a toxicidade da toxina A de *C. difficile* (60 ng/mL, TechLab) em células T-84 comparado com o mAb PA-50 murino parental (mPA-50).

[00090] A **Fig. 29** mostra a atividade de neutralização *in vitro* de mAbs PA-41 murino (mPA-41) e PA-41 humanizado (hPA-41) contra a toxina B de *C. difficile*. A porcentagem de sobrevivência das células comparada com os controles foi medida utilizando CellTiter Blue. O mAb hPA-41 neutraliza eficientemente a toxicidade da toxina B (2 pg/mL, Techlab) em células CHO-K1 com uma EC_{50} de 6 pM e era virtualmente equipotente ao anticorpo monoclonal murino parental (mPA-41).

[00091] A **Fig. 30** mostra a atividade de neutralização *in vitro* de mAbs PA-39 murino (mPA-39) e PA-39 humanizado (hPA-39) contra a toxina A de *C. difficile*. O mAb hPA-39 neutraliza eficientemente a toxicidade da toxina A (20 ng/mL, TechLab) em células CHO-K1 com uma EC_{50} de 50 pM e era virtualmente equipotente ao anticorpo monoclonal murino parental (mPA-39).

[00092] As **Figs. 31A-31H** mostram os resultados da atividade de neutralização *in vitro* e dos estudos de mecanismo de ação (MOA)

utilizando os mAbs descritos. Os ensaios com base em células utilizando células CHO-K1 e células T-84 foram realizados como descrito nos Exemplos 1, 3 e 7. A **Fig. 31A** mostra que o mAb PA-50 humanizado (hPA-50) neutralizava eficientemente a toxicidade da toxina A (60 ng/mL, TechLab) nas células T-84 comparado com o mAb PA-50 murino parental (mPA-50). As **Figs. 31B-D** mostram as atividades de neutralização de mAbs antitoxina A PA-39 e PA-50 comparados com aquelas do mAb CDA-1 comparador antitoxina A. Os valores de EC_{50} e de inibição percentual máxima são como apresentados na Tabela A do Exemplo 7C. As **Figs. 31E e F** mostram a atividade de neutralização de mAb PA-41 antitoxina B comparada com aquela do mAb CDB-1 comparador antitoxina B. Os valores de EC_{50} e de inibição percentual máxima são como apresentados na Tabela B do Exemplo 7C. As **Figs. 31G e H** mostram um método de ELISA e resultados para a avaliação da capacidade dos mAbs antitoxina A de bloquear a internalização da toxina A nas células e para a avaliação das atividades destes mAbs na prevenção da internalização da toxina A em relação ao controle de anticorpo antitoxina A de caprino policlonal control e sem controle de anticorpo.

[00093] As **Figs. 32A e 32B** representam a sequência de aminoácidos das regiões VH do PA-39 humanizado (hPA-39), SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2. Os resíduos de aminoácidos são mostrados no código de uma única letra. Os números acima das sequências indicam as localizações de acordo com Kabat e outros. As localizações das CDRs estão sublinhadas.

[00094] As **Figs. 33A e 33B** representam a sequência de aminoácidos das regiões VL do PA-39 humanizado (hPA-39), SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4. Os resíduos de aminoácidos são mostrados no código de uma única letra. Os números acima das sequências indicam as localizações de acordo com Kabat e outros. As localizações das

CDRs estão sublinhadas.

[00095] As **Figs. 34A e 34B** representam a sequência de aminoácidos das regiões VH do PA-50 (hPA-50) humanizado, SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:6. Os resíduos de aminoácidos são mostrados no código de uma única letra. Os números acima das sequências indicam as localizações de acordo com Kabat e outros. As localizações das CDRs estão sublinhadas.

[00096] A **Fig. 35** representa a sequência de aminoácidos da região VL do PA-50 humanizado. SEQ ID NO:7. Os resíduos de aminoácidos são mostrados no código de uma única letra. Os números acima das sequências indicam as localizações de acordo com Kabat e outros. As localizações das CDRs estão sublinhadas.

[00097] As **Figs. 36A e 36B** representam a sequência de aminoácidos das regiões VH do PA-41 humanizado (hPA-41), SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:9. Os resíduos de aminoácidos são mostrados no código de uma única letra. Os números acima das sequências indicam as localizações de acordo com Kabat e outros. As localizações das CDRs estão sublinhadas.

[00098] A **Fig. 37** representa a sequência de aminoácidos da região VL do PA-41 humanizado, SEQ ID NO:10. Os resíduos de aminoácidos são mostrados no código de uma única letra. Os números acima das sequências indicam as localizações de acordo com Kabat e outros. As localizações das CDRs estão sublinhadas.

[00099] As **Figs. 38A e 38B** mostram a sequência de ácido nucleico e a sequência de aminoácidos codificada de um anticorpo monoclonal antitoxina A de *C. difficile* humanizado. A **Fig. 38A** representa a sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo monoclonal antitoxina A humanizado que é apresentada na SEQ ID NO:16, que é codificado pela sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO:17. A **Fig. 38B** representa a sequência de aminoácidos da

cadeia pesada do anticorpo monoclonal humanizado que é apresentada na SEQ ID NO:14, que é codificado pela sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO:15.

[000100] As **Figs. 39A e 39B** mostram a sequência de ácido nucleico e a sequência de aminoácidos codificada de um anticorpo monoclonal antitoxina A de *C. difficile* humanizado. A **Fig. 39A** representa a sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo monoclonal antitoxina A humanizado que é apresentada na SEQ ID NO:20, que é codificado pela sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO:21. A **Fig. 39B** representa a sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo monoclonal antitoxina A humanizado que é apresentada na SEQ ID NO:18, que é codificado pela sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO:19.

[000101] As **Figs. 40A e 40B** mostram a sequência de ácido nucleico e a sequência de aminoácidos codificada de um anticorpo monoclonal antitoxina B de *C. difficile* humanizado. A **Fig. 40A** representa a sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo monoclonal humanizado antitoxina B que é apresentada na SEQ ID NO:24, que é codificado pela sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO:25. A **Fig. 40B** representa a sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo monoclonal humanizado antitoxina B que é apresentada na SEQ ID NO:22, que é codificado pela sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO:23.

[000102] As **Figs. 41A-41C** demonstram a atividade de neutralização *in vitro* contra a toxina A ou a toxina B de *C. difficile* de fragmentos Fab de mAbs murinos comparada com a potência dos anticorpos inteiros correspondentes. (**A**): atividade de neutralização de mAb PA-39 murino e Fab PA-39 em células CHO-K1; toxina A (Techlab, 60 ng/mL); (**B**): atividade de neutralização de mAb PA-41 murino e Fab PA-41 em células CHO-K1; toxina B (Techlab, 2 pg/mL); (**C**): atividade

de neutralização de mAb PA-50 murino e Fab PA-50 em células T-84; toxina A (Techlab, 60 ng/mL).

[000103] As **Figs. 42A e 42B** mostram os perfis de concentração de anticorpo resultantes do estudo de farmacocinética (PK) descrito no Exemplo 13 aqui. A **Fig. 42A** representa os resultados de PK (concentração de anticorpo no soro em µg/mL) ao longo de 29 dias de animais que recebem uma única dose de mAb PA-50 antitoxina A humanizado purificado a uma concentração de 1 mg/kg (▲) ou 5 mg/kg (■) no dia 0. A **Fig. 42B** representa os resultados de PK (concentração de anticorpo no soro em µg/mL) ao longo de 29 dias de animais que recebem uma única dose de mAb PA-41 antitoxina B humanizado purificado a uma concentração de 1 mg/kg (▲) ou 5 mg/kg (■) no dia 0.

Descrição Detalhada da Invenção

[000104] A presente invenção abrangem anticorpos e fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos que fornecem terapias e tratamentos sem antibióticos que bloqueiam os efeitos patogênicos da infecção causada por *C.* difficile e, preferencialmente, fornecem tempo para que o cólon cicatrize e/ou a microflora normal do trato gastrointestinal, por exemplo, cólon, vísceras, intestino etc., seja estabelecida. Os anticorpos monoclonais como descrito aqui, fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos, tais como formas humanizadas ou quiméricas dos mesmos, fornecem agentes terapêuticos e medicamentos que não são antibióticos tanto para tratar doença ativa quanto para prevenir doença recorrente de forma a permitir que pacientes sofrendo de infecção causada por *C. difficile* e CDAD resolvam sua doença sem reincidência em doença adicional ou doença ou sintomas mais graves. Em uma modalidade, os anticorpos da invenção possuem atividade terapêutica contra doença ativa causada por ou associada com, infecção de indivíduos por *C. difficile*.

Em uma modalidade, os anticorpos da invenção resolvem a doença ativa causada por ou associada com, infecção de indivíduos por *C. difficile*. Em uma modalidade, os anticorpos da invenção possuem efeitos terapêuticos na diminuição da duração e/ou da gravidade de doença ativa causada por ou associada com, infecção por *C. difficile* em um indivíduo. Em uma modalidade, os anticorpos da invenção ou porções ou fragmentos dos mesmos podem ser fornecidos em combinação com agentes terapêuticos antibióticos.

[000105] Os anticorpos monoclonais (mAbs) contra toxinas A e B de *C. difficile* foram gerados como descrito aqui. Os mAbs antitoxina exibem atividade potente tanto em ensaios *in vitro* quanto em modelos de animais pré-clínicos de infecção causada por *C. difficile in vivo*. Mais especificamente, os mAbs da invenção protegem potencialmente e de forma durável hamsters de mortalidade em um modelo de hasmter mais relevante e rígido de infecção causada por *C. difficile*.

[000106] Os anticorpos fornecem abordagens sem ser com antibióticos para o tratamento de CDAD e podem permitir a descontinuação de antibióticos e bloquear os efeitos patogênicos das toxinas de *C. difficile*, fornecendo assim tempo para que o cólon cicatrize e a microflora intestinal normal se reestabeleça. Os mAbs como descrito aqui podem fornecer benefício terapêutico através de sua capacidade de neutralizar as toxinas de *C. difficile* e podem ser empregados em estratégias passivas ou ativas para tratar pacientes com várias recorrências de *C. difficile.* Em particular, os mAbs podem ser utilizados para prevenir a recorrência de infecção, para tratamento de formas ativas graves de doença e para tratamento de pacientes com várias reincidências de doenças associadas a *C. difficile*. Os mAbs como descrito aqui podem fornecer um meio eficiente de neutralizar as toxinas A e B de *C. difficile* de forma a prevenir, bloquear ou inibir a recorrência de infecção e/ou formas graves e ativas da

doença e várias reincidências.

[000107] Como utilizado aqui, "toxina A" e "toxina B" referem-se as enterotoxinas citotóxicas produzidas pelo microorganismo *C. difficile*. As toxinas A e B são os determinantes de virulência principais de *C. difficile* e cepas negativas para toxina são não patogênicas. As toxinas A e B são transcritas partindo de um lócus de patogenicidade que inclui os genes de toxina, *tcdA* (toxina A) e *tcdB* (toxina B) e três genes reguladores, dos quais um (*tcdC*) codifica um suposto regulador negativo de transcrição de toxina. A proteína *TcdC* parece inibir a transcrição de toxina durante a fase de crescimento exponencial inicial do ciclo de vida bacteriano. Para toxina a B, um sítio de clivagem autocatalítico entre $leucina_{543}$ e $glicina_{544}$ foi descrito. A clivagem resulta da ativação de um domínio de aspartil protease por inositol fosfato citosólico do hospedeiro e libera o domínio glicosiltransferase ativo.

[000108] São fornecidos aqui anticorpos e fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos que se ligam especificamente à toxina A e/ou à toxina B de *C. difficile*, composições contendo um ou mais de tais anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos, vetores que contêm sequências de ácido nucleico que codificam os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos, linhagens de célula de hibridoma que produzem os anticorpos e métodos de utilização dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos para o tratamento ou para a prevenção da infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile*.

[000109] Deve ser entendido que quando o termo "anticorpos" ou "imunoglobulinas" é referido aqui na descrição da presente invenção e seus vários aspectos e modalidades, é entendido ainda de forma geral que este termo abrange fragmentos que se ligam a antígenos de tais anticorpos ou imunoglobulinas, de forma a evitar a repetição excessiva

da expressão associada "fragmentos que se ligam a antígenos" sempre que o termo "anticorpos" ou "imunoglobulinas" for mencionado. Assim, a presente invenção abrange não somente anticorpos direcionados contra a toxina A e a toxina B de *C. difficile*, isto é, antígenos da toxina A e da toxina B, mas também fragmentos de tais anticorpos que se ligam aos antígenos da toxina A e da toxina B de *C. difficile*, como descrito adicionalmente aqui. Em modalidades, tais fragmentos que se ligam a antígenos são capazes de neutralizar a toxicidade da toxina A e/ou da toxina B de uma maneira similar àquela do anticorpo intacto.

[000110] Os anticorpos abrangidos pela invenção incluem anticorpos isolados que se ligam especificamente à toxina A de *C. difficile* e que inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação específica à toxina A de *C. difficile* de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888. Os anticorpos also incluem anticorpos isolados que se ligam especificamente à toxina A de *C. difficile* e que se ligam especificamente a um epítopo na toxina A de *C. difficile* definidos pela ligação de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888. Em algumas modalidades, o epítopo reside no domínio de ligação C-terminal ao receptor de tcdA. Em algumas destas modalidades, os anticorpos inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação de PA-50 com tcdA. Em outras modalidades, o epítopo reside no domínio de translocação de tcdA. Em algumas destas modalidades, os anticorpos inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação de PA-39 com tcdA. Tais anticorpos isolados podem compreender anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos quiméricos,

anticorpos humanos, anticorpos humanizados e fragmentos de ligação ao antígeno ou porções dos mesmos.

[000111] Os experimentos que empregam a proteólise enzimática (enteroquinase) da toxina A para avaliar a especificidade de anticorpos monoclonais antitoxina A de *C. difficile* da invenção foram realizados como descrito no Exemplo 6. O epítopo na toxina A que é reconhecido e ligado por mAb PA-39 fica dentro de uma região que é distinta do domínio de ligação ao receptor da toxina A, isto é, fora do domínio de ligação ao receptor da toxina A e que é distinto de um epítopo ligado por uma anticorpo antitoxina A humano relatado como se ligando a um domínio C-terminal de ligação ao receptor da toxina A (7). Como descrito nos Exemplos 6 e 7 aqui e mostrado nas **Figs. 22 e 31**, ensaios Biacore sustentam um único sítio de ligação na toxina A para PA-39. A detecção com Western blot de toxina A digerida enzimaticamente demonstra que PA-39 se liga à região na toxina A que é separada das regiões ligadas por PA-50 e o mAb comparador CDA-1. A atividade *in vitro* de PA-39 no ensaio de potência de toxina mostra alterações tanto na EC_{50} quanto na inibição percentual máxima quanto mais toxina A for adicionada na cultura, indicando um mecanismo de inibição competitivo misto para PA-39. A detecção com ELISA da toxina A após a proteção através de um excesso de 100 vezes de PA-39 confirmou que a inibição da toxina por PA-39 ocorre através da prevenção da internalização da toxina e efeitos da toxina extracelular adversos, por exemplo, citoxicidade.

[000112] Adicionalmente, como descrito nos Exemplos 6 e 7 aqui e mostrado nas **Figs. 22 e 31**, os ensaios Biacore sustentam pelo menos dois sítios de ligação na toxina A para PA-50. A detecção com Western blot de toxina A digerida enzimaticamente demonstra que PA-50 se liga a uma região na toxina A similar àquela ligada pelo mAb CDA-1 comparador. A atividade *in vitro* de PA-50 no ensaio de

potência de toxina mostra uma alteração na EC50 à medida que mais toxina A é adicionada na cultura, indicando um mecanismo de inibição competitivo para PA-50. A detecção por ELISA da toxina A após proteção por excesso de 100 vezes de PA-50 confirmou que a inibição da toxina por PA-50 ocorre através da prevenção da internalização da toxina e citotoxicidade subsequente.

[000113] Os anticorpos da invenção incluem ainda anticorpos isolados que se ligam especificamente à toxina B de *C. difficile* e que inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação específica à toxina B de *C. difficile* de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692. Os anticorpos incluem ainda anticorpos isolados que se ligam especificamente à toxina B de *C. difficile* e que se ligam especificamente a um epítopo on toxina B de *C. difficile* definido pela ligação de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692. Em algumas modalidades, o epítopo reside no domínio de enzima N-terminal de tcdB. Em algumas destas modalidades, os anticorpos inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação de PA-41 com tcdB. Em outras modalidades, o epítopo reside no domínio de translocação, por exemplo, aminoácidos 850-1330 de tcdB. Em algumas destas modalidades, os anticorpos inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação de PA-39 com tcdB.

[000114] Os experimentos que empregam proteólise enzimática (caspase 1) da toxina B para avaliar a especificidade de anticorpos monoclonais antitoxina B de *C.* difficile da invenção foram realizados como descrito no Exemplo 6. Foi mostrado que mAb PA-41 (PTA-9693) reconhece fragmentos de aproximadamente 103 kDa e 63 kDa, que derivam do domínio enzimático N-terminal da toxina B. A análise

da sequência N-terminal dos fragmentos de digestão principais confirmava esta análise. Foi demonstrado que o mAb PA-41 se liga a um único epítopo dentro do domínio enzimático N-terminal da toxina B, distinto de um domínio C-terminal de ligação ao receptor da toxina B ligado por um anticorpo antitoxina B humano (7). Como descrito nos Exemplos 6 e 7 aqui e mostrado nas **Figs. 19 e 31E e F**, os ensaios Biacore sustentam um único sítio de ligação na toxina B para PA-41. A detecção com Western blot da toxina B digerida enzimaticamente mostra que PA-41 se liga a uma região diferente na toxina B que é diferente daquela ligada por mAb CDB-1 comparador. A atividade *in vitro* de PA-41 no ensaio de potência de toxina mostra alterações tanto na EC_{50} e quanto na inibição percentual máxima à medida que mais toxina B é adicionada na cultura, indicando um mecanismo de inibição competitivo misto de PA-41.

[000115] Os anticorpos fornecidos aqui incluem anticorpos monoclonais produzidos por hibridomas que foram depositados e receberam as Designações de Depósito de Patente a seguir: PTA-9692 (para PA-39), PTA-9693 (para PA-41), PTA-9694 (para PA-50) e PTA-9888 (para PA-38). Estes hibridomas foram depositados de acordo com e em satisfação dos requerimentos do Tratado de Budapeste no Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para as Finalidades de Procedimento de Patente na American Type Culture Collection ("ATCC"), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, como uma Autoridade de Depósito Internacional, em 6 de janeiro de 2009 (para PTA-9692, PTA-9693, PTA-9694) e em 24 de março de 2009 (para PTA-9888) e receberam as Designações de Depósito de Patente mencionadas anteriormente. Como utilizado aqui, tanto os hibridomas depositados quanto os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas podem ser referidos pelas mesmas Designações de Depósito da ATCC ou pelos

números encontrados dentro das Designações de Depósito da ATCC. Por exemplo, PTA-9888 ou 9888 pode ser utilizado para se referir ao hibridoma depositado ou ao anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma. Consequentemente, os nomes dos anticorpos monoclonais descritos aqui podem ser utilizados de forma intercambiável com os nomes dos hibridomas que produzem os mesmos. Será evidente para um perito na arte quando o name for pretendido para se referir ao anticorpo ou ao hibridoma que produz o anticorpo. Os fragmentos que se ligam a antígenos fornecidos aqui incluem os fragmentos que se ligam a antígenos dos anticorpos depositados mencionados anteriormente.

[000116] Os anticorpos da invenção exibem um número de características benéficas. Por exemplo, os anticorpos antitoxina A neutralizam ou inibem a toxicidade da toxina A tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nos estudos de neutralização *in vitro* utilizando células IMR-90, PA-39 humanizado e PA-41 humanizado demonstravam potências de neutralização (isto é, valores de EC_{50}) de 46 pM contra a toxina A nas células e 5 pM contra a toxina B, respectivamente, nestas células. Quando comparado com valores relatados na literatura para a neutralização por anticorpos monoclonais antitoxina A e antitoxina B humanos (WO/2006/121422; US2005/0287150; Babcock e outros., *Infect. Immun*., 2006), (7), o valor de neutralização de EC_{50} de 46 pM de hPA-39 parecia ser maior que aquele relatado para mAb antitoxina A humano e o valor de neutralização de EC_{50} de 5 pM de hPA-41 parecia ser maior que aquele relatado para mAb antitoxina B humano. Consequentemente, nos estudos descritos aqui, anticorpos monoclonais antitoxina A de *C. difficile* e antitoxina B de *C. difficile* humanizados da invenção, em particular, forma humanizadas destes anticorpos monoclonais, mostram características de neutralização antitoxina melhoradas comparadas com aquelas de outros anticorpos

antitoxina que foram relatados.

[000117] Em uma modalidade, um anticorpo antitoxina A da invenção neutraliza ou inibe a toxicidade *in vivo* da toxina A de *C. difficile* em uma dose eficiente. Em outra modalidade, os anticorpos antitoxina B neutralizam ou inibem a toxicidade *in vivo* da toxina B. Em uma modalidade, uma dose eficiente de um ou mais anticorpos antitoxina A da invenção é fornecida a um indivíduo infectado por *C. difficile*. Em uma modalidade, uma dose eficiente de um ou mais anticorpos antitoxina A da invenção é fornecida em combinação com uma dose eficiente de um ou mais anticorpos antitoxina B da invenção a um indivíduo infectado por *C. difficile*. Em uma modalidade, um anticorpo antitoxina A da invenção em uma combinação 1:1 com um anticorpo antitoxina B da invenção é fornecido como uma dose eficiente a um indivíduo infectado por *C. difficile*. Em uma modalidade, uma dose eficiente de um anticorpo antitoxina A e um anticorpo antitoxina B da invenção pode ser, por exemplo, uma combinação de ½:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 etc. dos anticorpos fornecidos a um indivíduo infectado por *C. difficile*. Em uma modalidade, os anticorpos são humanizados. Em uma modalidade, os anticorpos são incluídos em uma composição. De maneira ilustrada, uma dose eficiente dos anticorpos antitoxina A e/ou antitoxina B pode variar de 0,1 µg até 1000 miligramas (mg). Os anticorpos antitoxina A e os anticorpos antitoxina B ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos podem ser administrados a um indivíduo em uma quantidade de, por exemplo, 0,1 mg/kg-150 mg/kg; em uma quantidade de 0,5 mg/kg-75 mg/kg; em uma quantidade de 1 mg/kg-100 mg/kg; em uma quantidade de 1 mg/kg-50 mg/kg; em uma quantidade de 2 mg/kg-40 mg/kg; em uma quantidade de 2 mg/kg-50 mg/kg; em uma quantidade de 5 mg/kg -50 mg/kg; em uma quantidade de 5 mg/kg-25 mg/kg; em uma quantidade de 10 mg/kg-40 mg/kg; em uma quantidade de 10 mg/kg-50 mg/kg; em uma quantidade de 10

mg/kg-25 mg/kg; ou em uma quantidade de 15 mg/kg-50 mg/kg. Em uma modalidade, as quantidades mencionadas anteriormente podem compreender as proporções variáveis de anticorpo antitoxina A e anticorpo antitoxina B fornecidos em combinação.

[000118] Como utilizado aqui, "neutralizar" refere-se à redução, inibição, bloqueio, melhora ou eliminação de efeito(s) adverso(s) da(s) toxina(s) com a(s) qual(is) o(s) anticorpo(s) especificamente se liga(m). A neutralização de efeito(s) adverso(s) da(s) toxina(s) inclui 1) retardo, redução, inibição ou prevenção do início ou da progressão de infecção causada por *C. difficile* ou diarreia ou doença associada a *C. difficile*, 2) aumento da sobrevivência de um indivíduo quando comparada com a sobrevivência média de indivíduos que não foram tratados com o(s) anticorpo(s) e que têm infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile*, 3) eliminação de um ou mais sintomas ou efeitos adversos ou redução da gravidade de um ou mais sintomas ou efeitos adversos associados com infecção causada por *C. difficile* ou diarreia ou doença associada a *C. difficile*, 4) permitindo a repopulação da microflora normal do trato gastrointestinal de indivíduos que estão ou foram infectados com *C. difficile,* 5) prevenção da recorrência de infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile* em indivíduos que foram afligidos com infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile*, 6) efetuando uma taxa de cura de pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% em indivíduos que têm infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile* e/ou 7) prevenção da morte causada por CDAD ou outros eventos adversos associados com a infecção causada por *C. difficile*.

[000119] Os anticorpos antitoxina A e toxina B de *C. difficile* da invenção podem ser utilizados para tratar um número de espécies de indivíduos, incluindo humanos e outros animais não humanos

(mamíferos). Os indivíduos que podem ser tratados de acordo com a invenção incluem seres humanos, primatas não humanos, cães, gatos, camundongos, ratos, hamsters, porquinhos da Índia, bovinos, caprinos, ovinos, suínos, cavalos e similares. Os indivíduos humanos também podem ser referidos como pacientes ou indivíduos aqui. Em particular, os indivíduos incluem um paciente humano que tem uma infecção causada por *C. difficile* ou uma doença associada a *C. difficile*. Tais pacientes humanos incluem aqueles que são idosos ou imunologicamente comprometidos.

[000120] De acordo com a invenção, os anticorpos antitoxina A e toxina B de *C. difficile* podem resolver a doença causada por *C. difficile* e aumentam a sobrevivência de um indivíduo. Em uma modalidade, um ou mais anticorpos antitoxina A e/ou um ou mais anticorpos antitoxina B, quando administrados a um indivíduo, melhoram a sobrevivência do indivíduo comparada com a sobrevivência média de indivíduos que não foram tratados com o(s) anticorpo(s) e que têm infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile*.

[000121] Em algumas modalidades, a dose ou a quantidade do um ou mais anticorpos antitoxina A ou antitoxina B pode variar, por exemplo, de 0,2 µg-250 µg ou de 2 µg-50 µg ou de 5 µg -50 µg, por exemplo, com base nos estudos com camundongos *in vivo*. Em algumas modalidades, a dose ou a quantidade de um ou mais anticorpos antitoxina A ou antitoxina B e em particular uma combinação de um anticorpo antitoxina A e um anticorpo antitoxina B, pode variar por exemplo de 2 mg/kg-40 mg/kg, 2 mg/kg-50 mg/kg, 5 mg/kg-40 mg/kg, 5 mg/kg-50 mg/kg, 10 mg/kg-40 mg/kg ou 10 mg/kg-50 mg/kg, por exemplo, com base em estudos com hamster *in vivo*.

[000122] Como outro exemplo, os anticorpos da invenção podem efetuar uma taxa de cura ou de sobrevivência de pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99%.

Como outro exemplo, os anticorpos podem efetuar uma taxa de cura ou de sobrevivência de 100%. Em uma modalidade, um ou mais anticorpos antitoxina A, quando administrados a um indivíduo, junto com um ou mais anticorpos antitoxina B, efetuam uma taxa de cura ou de sobrevivência de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% ou 100%. Como utilizado aqui, "taxa de cura" refere-se à porcentagem de indivíduos que um médico poderia determinar que não tem mais a infecção ou a doença de uma população de indivíduos com a infecção ou a doença que recebeu a administração de um ou mais anticorpos ou uma ou mais composições dos mesmos, da invenção. "Taxa de sobrevivência", como utilizado aqui, refere-se à porcentagem de indivíduos que sobrevive durante um período desejado de tempo de uma população de indivíduos que recebeu a administração de um ou mais anticorpos ou uma ou mais composições dos mesmos, da invenção. Os exemplos de tais períodos de tempo desejados são fornecidos em outro lugar aqui.

[000123] Os anticorpos antitoxina A e antitoxina B fornecidos pela invenção podem permitir a restauração da flora intestinal normal em um indivíduo infectado com *C. difficile*. Desta maneira, tais anticorpos podem resolver doença em pacientes sofrendo tratamento. Os anticorpos antitoxina A e antitoxina B da invenção também podem demonstrar benefícios na farmacocinética *in vivo*. Os anticorpos antitoxina A e antitoxina B da invenção também podem fornecer terapia prolongada ou de longa duração para um indivíduo que foi infectado com *C. difficile*. Como utilizado aqui, "longa duração" refere-se à terapia que resulta em uma ausência de infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile* um mês ou mais após cessar o tratamento. Preferencialmente, a terapia resulta em uma ausência de infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile* durante dois ou mais meses. Em algumas modalidades, a terapia com

mAbs da invenção resulta no tratamento ou no enfraquecimento da infecção ativa causada por *C. difficile* e na redução ou na diminuição da força da infecção. Em outras modalidades, a terapia fornecida pela invenção resulta em uma ausência de infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile* em um indivíduo durante 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 meses. Em outras modalidades, a terapia fornecida pela invenção resulta em uma ausência de infecção causada por *C. difficile* ou doença associada a *C. difficile* em um indivíduo por mais de 6 meses. Os anticorpos antitoxina A e antitoxina B da invenção podem prevenir a recorrência de infecção causada por *C. difficile* e/ou doença associada a *C. difficile*.

[000124] A natureza recorrente de CDAD é exacerbada pela emergência de cepas hipervirulentas BI/NAP1/027 que foram observadas como sendo resistentes a dois dos antibióticos mais novos de último caso, levofloxacina e moxifloxacina. Tais cepas ativaram surtos de aumento de frequência ao longo dos U.S., Canadá e Europa Ocidental. As cepas hipervirulentas compreendem um grupo de isolados intimamente relacionados caracterizados como North American Pulsed Field Type 1 (NAP1), análise de enzima de restrição do tipo "BI" e PCR Ribotype 027 conhecido coletivamente como BI/NAP1/027 (5). A hipervirulência das cepas BI/NAP1/027 foi atribuído pelo menos em parte a maior produção de toxinas A e B, dois fatores de virulência de CDAD (6). Isolados de BI/NAP1/027 produzem níveis 16-23 vezes mais altos de toxinas A e B do que outras cepas (6). A aptidão aparente destas cepas cria a ameaça de espalhamento em todo o mundo comprementendo o potencial do tratamento com antibióticos para outras doenças, bem como aumento das taxas de recorrência e a gravidade de CDAD. Embora existam antibióticos em desenvolvimento para o tratamento de CDAD, tais como nitazoxanida, rifaximina, ramoplanina e fidaxomicina, isolados clínicos de *C. difficile*

que são resistentes à rifaximina foram relatados. Em um teste em fase 3 completado recentemente (91), a fidaxomicina reduzia significativamente a taxa geral de recorrência de CDAD comparada com a vancomicina, mas não para as cepas BI/NAP1/027. Surtos de cepas BI/NAP1/027 hipervirulentas levaram ao aumento de permanências em hospitais, falhas no tratamento, frequências de reincidência e taxas de mortalidade (3). Os novos mAbs desenvolvidos e descritos aqui fornecem novas terapias para combater o crescimento da incidência e da gravidade de CDAD.

[000125] Em uma modalidade, os mAbs da invenção são empregados no tratamento de infecção causada por várias cepas de *C. difficile*. Em uma modalidade, as cepas de *C. difficile* são altamente infecciosas e suas toxinas são neutralizadas pelos mAbs da invenção. Em uma modalidade, as toxinas de cepas hipervirulentas de *C. difficile*, incluindo BI/NAP1/027, são neutralizadas pelos mAbs da invenção. Em uma modalidade, os mAbs da invenção fornecem efeitos terapêuticos na neutralização de toxinas de uma faixa ampla de isolados clínicos toxigênicos, incluindo cepas de isolados de pacientes de ambulatório. Preferencialmente, os mAbs neutralizam as toxinas de isolados hipervirulentos, tal como BI/NAP1/027 e pelo menos 90% ou mais de outros isolados clinicamente relevantes de *C. difficile*. Em particular e como ilustrado no Exemplo 8 aqui, foi mostrado que os mAbs da invenção neutralizam significativamente a toxicidade/atividade de dezenove isolados clínicos diferentes de *C. difficile*, incluindo BI/NAP1/027 e outras cepas hipervirulentas de *C. difficile*, por exemplo, CCL676, HMC553, Pitt45, CD196, montreal 5 e Montreal 7.1. De acordo com a invenção, são fornecidos anticorpos que neutralizam a toxina A e a toxina B de cepas hipervirulentas de *C. difficile*, por exemplo, sem limitação, que são determinados por um valor de EC_{50} variando de $7,7^{-12}$M até $4,8^{-8}$M para mAbs antitoxina A e

um valor de EC_{50} variando de $1,1^{-11}$M até $6,5^{-10}$M para um mAb antitoxina B. Em adição, os mAbs da invenção são fornecidos para uso na neutralização de cepas hipervirulentas de *C. difficile*, incluindo isolados derivados de hospitais e sem ser de hospitais, como tratamento para infecção causada por *C. difficile* e doenças relacionadas ao mesmo.

[000126] Em outras modalidades e como exemplo não limitante, os mAbs da invenção exibem um valor de neutralização de EC_{50} na faixa de 93 pM-30 nM ou uma EC_{50} de 46 pM, para a neutralização da toxina A e um valor de EC50 na faixa de 4 pM-9,5 pM ou uma EC_{50} de 5 pM, para a neutralização toxina B dependendo do ensaio à base de células *in vitro* empregado. Como descrito no Exemplo 3 aqui, em um ensaio que compreende células CHO-K1 em que 8 µg/mL da toxina A foram utilizados, os mAbs antitoxina A da invenção exibiam um valor de EC50 de 93 pM. Em um ensaio que compreende células CHO-K1 em que 8 pg/mL da toxina B foram utilizados, o mAb antitoxina B da invenção exibiam um valor de EC50 de 9,2 pM. Em um ensaio que compreende células T-84 em que 240 ng/mL da toxina A foram utilizados, os mAbs antitoxina A da invenção exibiam valores de EC_{50} de 146 pM e 175 pM. Em um ensaio à base de células Caco-2, os mAbs antitoxina A da invenção neutralizavam a toxicidade da toxina A em níveis de EC_{50} de 196 pM e 485 pM. No ensaio de hemaglutinação de células sanguíneas vermelhas em que 8 µg/mL da toxina A foram utilizados, os mAbs antitoxina A da invenção tinham um valor de neutralização de EC50 de 1,8 nM e 30 nM para prevenir a hemaglutinação de RBC.

[000127] Os anticorpos da invenção podem ter qualquer uma de, uma combinação de ou todas, as características mencionadas anteriormente.

[000128] Como descrito nos Exemplos aqui, os mAbs da invenção

demonstram potência de neutralização de toxina superior tanto *in vitro* quanto *in vivo* nos melhores modelos pré-clínicos disponíveis de CDAD. Em adição, os mAbs da invenção demonstram neutralização exclusivamente ampla e potente de toxinas de várias cepas BI/NAP1/027. Além disso, tais mAbs demonstraram proteção completa e durável da mortalidade em um modelo de CDAD de hamster altamente rigoroso. Estes resultados sustentam a capacidade de mAbs da invenção de bloquear eficientemente e efetivamente os efeitos patogênicos da toxina de *C. difficile*s de uma maneira que possibilita que o cólon cicatrize, que a microflora intestinal normal se reestabeleça e a doença de CDAD e/ou a infecção causada por *C. difficile* seja resolvida.

[000129] Em uma modalidade, os anticorpos para a toxina A incluem aqueles que inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação específica à toxina A de *C. difficile* de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob os Nos. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888. Os anticorpos preferidos para a toxina B incluem aqueles que inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação específica à toxina B de *C. difficile* de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692. Em algumas modalidades, os anticorpos incluem aqueles que inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação específica à toxina A de *C. difficile* de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888 e inibem competitivamente ou competem de forma cruzada pela ligação específica à toxina B de *C. difficile* de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No.

de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692. Todas as modalidades abrangem ainda formas humanizadas dos anticorpos descritos anteriormente sob os Nos. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694, PTA-9888 ou PTA-9693.

[000130] Para determinar a inibição competitiva ou a competição cruzada de ligação, uma variedade de ensaios conhecidos por um perito comum na arte pode ser empregada. Por exemplo, ensaios de competição cruzada podem ser utilizados para determinar se um anticorpo inibe de forma competitiva a ligação à toxina A e/ou à toxina B por outro anticorpo. Tais métodos podem ser métodos à base de células que empregam citometria de fluxo ou análise de ligação em fase sólida. Outros ensaios que avaliam a capacidade dos anticorpos de competir de forma cruzada pela ligação à toxina A e/ou à toxina B em fase sólida ou em fase de solução, também podem ser utilizados. Os exemplos de anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos abrangidos pela invenção incluem aqueles que inibem competitivamente a ligação específica em pelo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99%. A inibição pode ser avaliada em várias proporções molares ou proporções de massa; por exemplo, experimentos de ligação competitiva podem ser realizados com um excesso molar de 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 7 vezes, 10 vezes ou mais do primeiro anticorpo em relação ao segundo anticorpo.

[000131] Outros anticorpos abrangidos pela invenção incluem aqueles que se ligam especificamente a um epítopo na toxina A de *C. difficile* definido pela ligação de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888. Ainda outros anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos abrangidos pela invenção incluem aqueles que se ligam especificamente a um epítopo

na toxina B de *C. difficile* definido pela ligação de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692. Ainda outros anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos abrangidos pela invenção incluem aqueles que se ligam especificamente a um epítopo na toxina A de *C. difficile* definido pela ligação de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9692, PTA-9694 ou PTA-9888 e se ligam especificamente a um epítopo na toxina B de *C. difficile* definido pela ligação de um anticorpo monoclonal isolado produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada sob o No. de Acesso da ATCC PTA-9693 ou PTA-9692.

[000132] Para determinar um epítopo, podem ser utilizados métodos de mapeamento de epítopos padronizados conhecidos na arte. Por exemplo, fragmentos (peptídeos) da toxina (preferencialmente peptídeos sintéticos) que se ligam um anticorpo podem ser utilizados para determinar se um anticorpo candidado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga ao mesmo epítopo. Para epítopos lineares, peptídeos sobrepostos de um comprimento definido (por exemplo, 8 ou mais aminoácidos) são sintetizados. Os peptídeos preferencialmente são compensados por 1 aminoácido, de forma que uma série de peptídeos que cobre cada fragmento de 8 aminoácidos da sequência de toxina é preparada. Menos peptídeos podem ser preparados utilizando compensações maiores, por exemplo, 2 ou 3 aminoácidos. Em adição, peptídeos mais longos (por exemplo, 9-, 10- ou 11-mers) podem ser sintetizados. A ligação de peptídeos aos anticorpos pode ser determinada utilizando metodologias padronizadas incluindo ressonância de plasmon de superfície (por exemplo, Biacore) e ensaios de ELISA. Para a verificação dos epítopos conformacionais, aos quais os anticorpos fornecidos aqui

podem, em algumas modalidades, se ligar, podem ser utilizados fragmentos peptídicos maiores. Outros métodos que utilizam espectrometria de massa para definir epítopos conformacionais foram descritos e podem ser utilizados (ver, por exemplo, Baerga-Ortiz e outros., *Protein Science* 11:1300-1308, 2002 e referências citadas aqui). Ainda outros métodos para a determinação de epítopos são fornecidos em trabalhos de referência em laboratório padronizados, tais como Unit 6.8 ("Phage Display Selection and Analysis of B-cell Epitopes") e Unit 9.8 ("Identification of Antigenic Determinants Using Synthetic Peptide Combinatorial Libraries") de *Current Protocols in Immunology*, Coligan e outros., eds., John Wiley & Sons. Os epítopos podem ser confirmados através da introdução de uma ou mais mutações ou deleções pontuais dentro de um epítopo conhecido e então de teste da ligação com um ou mais anticorpos para determinar que mutações reduzem a ligação dos anticorpos.

[000133] Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos fornecidos pela invenção podem se ligar especificamente à toxina A e/ou à toxina B com afinidade subnanomolar. Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam aos antígenos podem ter afinidades de ligação de aproximadamente 1 x 10^{-9}M ou menos, aproximadamente 1 x 10^{-10}M ou menos ou aproximadamente 1 x 10^{-11}M ou menos. Em uma modalidade particular, a afinidade de ligação é menor que aproximadamente 5 x 10^{-10}M.

[000134] Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos podem ter uma constante de velocidade on (Kon) à toxina A ou à toxina B de pelo menos $10^{2}M^{-1}s^{-1}$; pelo menos $10^{3}M^{-1}s^{-1}$; pelo menos $10^{4}M^{-1}s^{-1}$; pelo menos $10^{5}M^{-1}s^{-1}$; pelo menos $10^{6}M^{-1}s^{-1}$; ou pelo menos $10^{7}M^{-1}s^{-1}$, que é medida por ressonância de plasmon de superfície. Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos podem ter uma constante de velocidade de velocidade off (Koff) à toxina A ou à toxina

B de no máximo $10^{-3}s^{-1}$; no máximo $10^{-4}s^{-1}$; no máximo $10^{-5}s^{-1}$; ou no máximo $10^{-6}s^{-1}$, que é medida por ressonância de plasmon de superfície. Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos podem ter uma constante de dissociação (K_D) à toxina A ou à toxina B de no máximo 10^{-7} M; no máximo 10^{-8} M; no máximo 10^{-9} M; no máximo 10^{-10} M; no máximo 10^{-11} M; no máximo 10^{-12} M; ou no máximo 10^{-13}M.

[000135] Como utilizado aqui, os termos "anticorpo" ou "imunoglobulina" incluem glicoproteínas que compreendem pelo menos duas cadeias de polipeptídeos pesadas (H) e cadeias de polipeptídeos leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como HCVR ou V_H) e uma região constante de cadeia pesada (C_H). A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como LCVR ou V_L) e uma região constante de cadeia leve (C_L). A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, C_L. As regiões V_H e VL podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FRs). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino para o terminal carbóxi na ordem a seguir: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Juntas, as regiões variáveis dos polipeptídeos de cadeia pesada e leve contêm ou formam um domínio de ligação que interage com/se liga a um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina com tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (C1q) do

sistema do complemento clássico.

[000136] A invenção fornece ainda outras formas de anticorpos, tais como anticorpos de cadeia isolada, anticorpos produzidos de forma recombinante, anticorpos biespecíficos, heteroespecíficos ou multiméricos, dianticorpo etc., como descrito adicionalmente aqui.

[000137] O termo "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo como utilizado aqui, refere-se a uma ou mais porções de um anticorpo que mantêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, toxina A, toxina B, toxina A e toxina B etc.) ou a regiões epitópicas de um antígeno. Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento completo. Em uma modalidade, os fragmentos de anticorpo monoclonal funcionam de uma maneira similar aos anticorpos monoclonais correspondentes intactos. Em uma modalidade, os fragmentos de anticorpo monoclonal reagem de forma cruzada com os anticorpos monoclonais correspondentes intactos. Em uma modalidade, os fragmentos de anticorpo monoclonal podem ser utilizados de forma intercambiável com os anticorpos monoclonais correspondentes intactos. Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste dos domínios V_L, V_H, C_L e C_H1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobra; (iii) um fragmento Fd que consiste dos domínios V_H e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste dos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward e outros., (1989) *Nature* 341:544-546) que consiste de um domínio V_H; e (vi) uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H, sejam

codificados por genes separados, estes podem se ligar, utilizando métodos recombinantes, através de um ligante sintético que possibilita que estes sejam feitos na forma de uma única cadeia de proteína em que o par de regiões V_L e VH forme moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia isolada (scFv); ver, por exemplo, Bird e outros. (1988) *Science* 242:423-426; e Huston e outros. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). É também pretendido que tais anticorpos de cadeia isolada sejam abrangidos dentro do termo "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando procedimentos convencionais, tais como procedimentos de fragmentação proteolítica, como descrito em J. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 98-118 (N.Y. Academic Press 1983), que é incorporado aqui como referência, bem como através de outras técnicas conhecidas pelos peritos na arte. Os fragmentos são verificados em relação à atividade ou à utilidade da mesma maneira que os anticorpos intactos.

[000138] Em uma modalidade, os fragmentos Fab de mAbs da invenção foram gerados e testados em relação a sua atividade de neutralização em ensaios à base de células, como descrito no Exemplo 10 aqui**.** Assim, fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab, dos mAbs da invenção também podem ser utilizados para se ligar e neutralizar a toxina A e/ou a toxina B de *C. difficile*.

[000139] É pretendido que um "anticorpo isolado", como utilizado aqui, se refira a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos que possuem especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente à toxina A é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a antígenos sem ser a toxina A). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a um epítopo, isoforma ou variante da toxina A ou da toxina B, entretanto, possui geralmente reatividade cruzada com

outros antígenos relacionados, por exemplo, de outras cepas de *C. difficile*. Em adição, um anticorpo isolado que se liga especificamente a um epítopo, isoforma ou variante da toxina A também pode se ligar especificamente à toxina B e um anticorpo isolado que se liga especificamente a um epítopo, isoforma ou variante da toxina B também pode se ligar especificamente à toxina A. Em algumas modalidades, entretanto, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a um epítopo, isoforma ou variante da toxina A também não se liga especificamente à toxina B. Ainda em outras modalidades, o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a um epítopo, isoforma ou variante da toxina B também não se liga especificamente à toxina A. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou agentes químicos. Os anticorpos que são substancialmente livres de outros anticorpos que possuem especificidades antigênicas diferentes ou outros materiais e/ou agentes químicos e/ou proteínas podem ser anticorpos isolados e/ou purificados. Os anticorpos podem ser purificados através de métodos comumente realizados pelos peritos na arte, por exemplo, cromatografia por afinidade, cromatografia com Proteína A e similares. Como utilizado aqui, "ligação específica" refere-se à ligação do anticorpo a um antígeno pré-determinado ou cognato. Tipicamente, o anticorpo se liga com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior que sua afinidade pela ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) sem ser o antígeno pré-determinado ou um antígeno relacionado intimamente. Em uma modalidade, um anticorpo da invenção pode se ligar a um epítopo linear do antígeno alvo, por exemplo, toxina A e/ou toxina B. Em uma modalidade, um anticorpo da invenção pode se ligar a um epítopo conformacional do

antígeno alvo, por exemplo, toxina A e/ou toxina B.

[000140] Os anticorpos isolados da invenção abrangem vários isotipos de cadeia pesada e leve de anticorpo (imunoglobulina), tais como as classes de cadeia pesada ou isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE e subtipos das mesmas, por exemplo, IgG2a, IgG2b; e os isotipos de cadeia leve κ e λ e subtipos da mesma. Em uma modalidade, os anticorpos isolados são do isotipo IgG2a ou IgG1 κ. Como utilizado aqui, "isotipo" refere-se à classe do anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1 ou λ1) que é codificada pelos genes de região constante de cadeia pesada e leve. Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam aos antígenos dos mesmos podem ser de comprimento completo ou podem incluir apenas um fragmento de ligação ao antígeno, tal como o domínio constante e/ou variável do anticorpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD ou IgE ou podem consistir de um fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$ e um fragmento Fv.

[000141] Os anticorpos da presente invenção podem ser policlonais, monoclonais ou uma mistura de anticorpos policlonais e monoclonais. Os anticorpos podem ser produzidos por uma variedade de técnicas bem conhecidas na arte. Os procedimentos para produção de anticorpos policlonais são bem conhecidos. Como um exemplo não limitante, os anticorpos policlonais são produzidos através da administração da proteína da toxina A e/ou da toxina B de forma subcutânea a coelhos brancos New Zealand que primeiro tiveram o sangue extraído para a obtenção do soro pré-imune. A toxina A e/ou a toxina B pode ser injectada em um volume total de 100 µL por sítio em seis sítios diferentes, tipicamente com um ou mais adjuvantes. Foi então tirado o sangue dos coelhos duas semanas após a primeira injeção e receberam periodicamente reforço com o mesmo antígeno três vezes a cada seis semanas. Uma amostra de soro é coletada 10

dias após cada reforço. Os anticorpos policlonais são recuperados do soro, preferencialmente por cromatografia por afinidade utilizando toxina A e/ou toxina B para capturar o anticorpo. Este e outros procedimentos para a produção de anticorpos policlonais são descritos em Harlow, E. e Lane, D., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, cujo conteúdo é incorporado aqui como referência.

[000142] A produção do anticorpo monoclonal pode ser realizada através de técnicas que também são bem conhecidas na arte. O termo "anticorpo monoclonal", como utilizado aqui, refere-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de uma única composição molecular. Um anticorpo monoclonal exibe uma única especificidade de ligação e afinidade para um epítopo particular de certo antígeno ou agente imunogênico. O processo de produção de anticorpo monoclonal envolve a obtenção de células somáticas imunológicas com o potencial de produzir anticorpo, em particular linfócitos B, que foram previamente imunizadas com o antígeno de interesse *in vivo* ou *in vitro* ou ambos e que são adequadas para fusão com uma linhagem de mieloma de célula B. Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando células imunológicas e células de mieloma de espécies diferentes, tais como células e linhagens de células murinas e humanas ou por exemplo, em cepas de camundongos que foram geneticamente engenheiradas para carregarem um sistema imunológico humano, como descrito adicionalmente abaixo.

[000143] Embora os anticorpos monoclonais direcionados contra a toxina A e a toxina B tenham sido tipicamente produzidos através da imunização de animais com toxoides (formas inativas da toxina A e da toxina B) e/ou com fragmentos inativos destas toxinas, os mAbs da presente invenção foram gerados através do planejamento e do emprego de uma nova estratégia de imunização. De acordo com a

invenção, os mAbs descritos aqui e depositados foram produzidos através da imunização de animais com toxoide, seguida pelo reforço dos animais com a forma ativa (não toxoide) da toxina A e/ou da toxina B (ver o Exemplo 1 aqui). O reforço com a forma ativa da toxina A ou toxina B serviu para identificar tais animais imunizados que tinham desenvolvidos anticorpos protetores exclusivamente em virtude do novo esquema de imunização. Sem desejar ficar ligado à teoria, o regime de reforço com a toxina A e/ou a toxina B ativa era mais altamente imunogênico nos animais receptores. Tais animais que toleravam as doses crescentes de reforço da toxina A ativa ou toxina B, que são tipicamente letais para os animais naïve, produziram anticorpos de neutralização altamente eficientes, que protegeram estes animais e contribuíram para sua sobrevivência apesar de terem recebido toxina ativa. A produção de hibridomas partindo dos animais que montaram uma resposta imunológica eficiente contra a toxina A ou a toxina B forneceu anticorpos monoclonais antitoxina A e antitoxina B altamente potentes, que fornecem um alto nível de proteção tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Na produção de anticorpos, incluindo anticorpos policlonais e monoclonais, podem ser empregados adjuvantes. Os exemplos não limitantes de adjuvantes que são adequados para uso incluem adjuvante incompleto de Freund, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, Ribi (isto é, monofosforil lipídeo A, dimicolato de trealose, esqueleto de parede celular de Micobactéria e Tween® 80, com 2% de esqualeno), saponinas, Quil A ou alume. Uma resposta de linfócito T citotóxico (CTL) pode ser iniciada através da conjugação de toxinas (ou fragmentos, derivados inativos ou análogos das mesmas) com lipídeos, tal como, por exemplo, tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina.

[000144] Em outras modalidades, métodos de imunização adicionais podem ser utilizados para gerar anticorpos monoclonais direcionados

contra a toxina A e/ou a toxina B. Por exemplo, a imunização *in vivo* de animais (por exemplo, camundongos) pode ser realizada com o tipo desejado e a quantidade de proteína ou polipeptídeo, por exemplo, toxoide ou toxina. Tais imunizações são repetidas quando necessário em intervalos de até várias semanas para a obtenção de um título suficiente de anticorpos. Uma vez imunizados, os animais podem ser utilizados como uma fonte de linfócitos produtores de anticorpos. Após o último reforço com antígeno, os animais foram sacrificados e as células do baço foram removidas. Os linfócitos de camundongo fornecem uma porcentagem maior de fusões adequadas com as linhagens de mieloma de camundongos descritas aqui. Destas, a cepa de camundongo BALB/c é adequada. Entretanto, outras cepas de camundongo, coelho, hamster, ovino, caprino e sapo também podem ser utilizadas como hospedeiros para a preparação de células produtoras de anticorpos. Ver; Goding (em Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª ed., pp. 60-61, Orlando, Fla., Academic Press, 1986). Em particular, cepas de camundongos que possuem genes de imunoglobulina humana inseridos no genoma (e que não podem produzir imunoglobulinas de camundongos) podem ser utilizadas. Os exemplos incluem as cepas de camundongos HumAb produzidas pela Medarex (agora Bristol Myers Squibb)/GenPharm International e as XenoStrains de camundongos produzidas pela Abgenix. Tais camundongos produzem moléculas de imunoglobulina completamente humanas em resposta à imunização.

[000145] Tais células produtoras de anticorpo que estão no estágio de plasmablasto em divisão se fundem preferencialmente. As células somáticas podem ser obtidas, por exemplo, os nodos linfáticos, os baços e o sangue periférico de animais iniciados com antígeno e as células linfáticas de escolha dependem até uma grande extensão de sua utilidade empírica em um sistema de fusão particular. Os linfócitos

que secretam anticorpo são então fundidos com células de mieloma de células B (camundongo) ou células transformadas, que são capazes de se replicar indefinidamente em cultura de células, produzindo assim uma linhagem de células que secreta imunoglobulina imortal. As células ou os hibridomas fundidos resultantes, são cultivados e as colônias resultantes são verificadas em relação à produção dos anticorpos monoclonais desejados. As colônias que produzem tais anticorpos são clonadas, subclonadas e crescidas *in vivo* (na forma de ascitos) ou *in vitro* para produzir grandes quantidades de anticorpo. Descrições de metodologia e tecnologia de hibridoma podem ser encontradas em Kohler e Milstein, *Nature* 256:495 (1975) ou Harlow, E. e Lane, D., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, que são incorporados aqui como referência.

[000146] Alternativamente, células somáticas humanas capazes de produzir anticorpo, especificamente linfócitos B, são adequadas para fusão com linhagens de célula de mieloma. Embora linfócitos B de baços, amígdalas ou nodos linfáticos submetidos à biópsia de um indivíduo possam ser utilizados, os linfócitos B do sangue periférico mais facilmente acessíveis (PBLs) são preferidos. Em adição, células B humanas podem ser diretamente imortalizadas pelo vírus Epstein-Barr (Cole e outros., 1995, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Embora procedimentos de hibridização de células somáticas sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produção de anticorpos monoclonais podem ser empregadas, tal como transformação de linfócitos B virais ou oncogênicas.

[000147] As linhagens de célula de mieloma adequadas para uso em procedimentos de fusão que produzem hibridomas preferencialmente são não produtores de anticorpos, possuem alta eficiência de fusão e

deficiências enzimáticas que as tornam incapazes de crescer em certos meios seletivos que sustentam o crescimento dos hibridomas desejados. Os exemplos de tais linhagens de célula de mieloma que podem ser utilizados para a produção de linhagens de células fundidas incluem P3-X63/Ag8, X63-Ag8,653, NS1/1.Ag 4,1, Sp2/0-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1,7, S194/5XX0 Bul, derivadas de camundongos; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F e 4B210 derivadas de ratos; e U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, derivadas de humanos (Goding, em Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª ed., pp. 65-66, Orlando, Fla., Academic Press, 1986; Campbell, em Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden e Von Knippenberg, eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elseview, 1984).

[000148] A fusão com células de mieloma de mamífero ou outros parceiros de fusão capazes de replicar de forma indefinida em cultura de células e é realizada através de técnicas padronizadas e bem conhecidas, por exemplo, através da utilização de polietileno glicol ("PEG") ou outros agentes de fusão (Ver Milstein e Kohler, *Eur. J. Immunol*. 6:511 (1976), que é incorporado aqui como referência).

[000149] Em outras modalidades, os anticorpos podem ser anticorpos recombinantes. É pretendido que o termo "anticorpo recombinante", como utilizado aqui, inclua anticorpos que são preparados, expressos, criados ou isolados através de meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina de outras espécies, anticorpos expressos utilizando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira, anticorpos isolados de uma biblioteca de ancorpos combinatória recombinante ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolve o

processamento das sequências gênicas de imunoglobulina em outras sequências de DNA.

[000150] Ainda em outras modalidades, os anticorpos podem ser anticorpos quiméricos ou humanizados. Como utilizado aqui, o termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo que combina uma variável de imunoglobulina (Ig) murina ou regiões hipervariáveis com uma região constante de Ig humana ou regiões variáveis constantes e estruturais. Em algumas modalidades, o anticorpo quimérico compreende a região variável de qualquer um dos anticorpos depositados fornecidos aqui e uma região constante humana. Em algumas modalidades, a região constante humana é uma região constante de IgG humana, tal como uma região constante de IgG1 humana. Os anticorpos quiméricos podem ser produzidos através do método fornecido abaixo nos Exemplos **ou** através de qualquer método conhecido pelos peritos na arte. Como utilizado aqui, o termo "anticorpo humanizado" refere-se a um anticorpo que mantém substancialmente apenas as CDRs de ligação ao antígeno do anticorpo parental, por exemplo, anticorpo monoclonal murino, em associação com regiões estruturais humanas (ver, por exemplo, Waldmann, 1991, *Science* 252:1657). É esperado que tais anticorpos quiméricos ou humanizados, que mantêm a especificidade de ligação do anticorpo murino, mas possuem regiões constante/estruturais de Ig humana, tenham imunogenicidade reduzida quando administrados *in vivo*. Portanto, os anticorpos quiméricos e humanizados preferencialmente mantêm as atividades de neutralização de toxinas dos anticorpos monoclonais fornecidos e são adequados para dosagem repetida (por exemplo, em humanos). Um perito comum na arte pode utilizar métodos conhecidos (por exemplo, ensaios *in vitro* à base de células) para a comparação da atividade dos anticorpos humanizados aos anticorpos monoclonais depositados fornecidos aqui

e para determinar se ou não os anticorpos humanizados tratam e/ou previnem reincidência de uma infecção estabelecida causada por *C. difficile*. Um perito comum na arte também pode utilizar os métodos descritos aqui incluindo o model de hamster de infecção causada por *C. difficile* descrito abaixo.

[000151] As sequências dos mAbs humanizados podem ser planejadas através de método não limitante ilustrativo a seguir. Primeiramente, os resíduos de aminoácidos estruturais importantes para a estrutura da CDR são identificados. Em paralelo, sequências VH e VL humanas que possuem alta homologia com VH e VL murinas, respectivamente, são selecionadas dentre sequências de imunoglobulina (linhagem germinativa) humana conhecidas. As sequências de CDR do mAb murino, junto com resíduos de aminoácidos estruturais importantes para a manutenção da estrutura das CDRs, são enxertadas dentro das sequências estruturais humanas selecionadas. Em adição, resíduos de aminoácidos estruturais humanos que são observados como sendo atípicos no subgrupo da região V correspondente são substituídos por resíduos típicos para reduzir a imunogenicidade potencial do mAb humanizado resultante. Estas regiões VH e VL humanas são clonadas nos vetores de expressão, por exemplo, pCON Gama1 e pCON kappa (Lonza Biologics, Berkshire, UK), respectivamente. Estes vetores codificam a(s) região(ões) constante(s) dos genes de cadeias pesada e leve da imunoglobulina humana. As células 293T podem ser transfectadas de forma transitória com estes vetores de expressão utilizando o sistema Effectene (Qiagen, Valencia, CA). Os sobrenadantes de células contendo mAb quimérico secretado podem ser coletados após a transfecção, por exemplo, após três dias e purificados utilizando cromatografia com Proteína A. Outros vetores de expressão e células hospedeiras podem ser utilizados para produzir de forma

recombinante os anticorpos descritos, como é entendido pelos peritos na arte.

[000152] Outros métodos para a humanização de anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos são bem conhecidos na arte e incluem os métodos fornecidos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e 6.180.370. Os métodos para a realização da humanização fornecidos nestas patentes são incorporados aqui como referência em sua totalidade. Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos humanizados de acordo com os métodos fornecidos nestas patentes também são fornecidos aqui.

[000153] Em uma modalidade, um mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado (hmAb) da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina ou um fragmento da mesma, que é composta de (i) duas de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:1 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:3 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C de cadeia κ. Em uma modalidade, um mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina ou um fragmento da mesma, que é composta de (i) duas de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:2 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:3 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C

de cadeia κ. Em uma modalidade, um mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina que é composta de (i) duas de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:1 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:4 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C de cadeia κ. Em uma modalidade, um mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina que é composta de (i) duas de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:2 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:4 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C de cadeia κ. Tais mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados contêm um mAb hPA-39 da invenção.

[000154] Em uma modalidade, um mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina que é composta de (i) duas cadeias de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:5 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:7 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C de cadeia κ. Em uma modalidade, um mAb antitoxina A de *C. difficile*

humanizado da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina que é composta de (i) duas de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:6 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:7 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C de cadeia κ. Tais mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados contêm um mAb hPA-50 da invenção.

[000155] Em uma modalidade, um mAb antitoxina B de *C. difficile* humanizado da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina que é composta de (i) duas de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:8 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:10 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C de cadeia κ. Em uma modalidade, um mAb antitoxina B de *C. difficile* humanizado da invenção abrange uma proteína de imunoglobulina que é composta de (i) duas cadeias de polipeptídeos pesadas (H), em que cada cadeia H contém uma região VH que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:9 e uma região CH humana, por exemplo, uma região C de IgG1 e (ii) cadeias de polipeptídeos leves (L), em que cada cadeia L contém uma região VL que compreende a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID NO:10 e uma região CL humana, por exemplo, uma região C de cadeia κ. Tais mAbs antitoxina B de *C. difficile* humanizados contêm um mAb hPA-41 da invenção.

[000156] As regiões C de cadeia L e de cadeia H dos anticorpos descritos anteriormente humanizados da invenção podem compreender a região C de cadeia L de κ humano (C_L) e a região C de cadeia H de IgG1 humana (C_H) que possui sequências contidas no No. de Acesso do Genbank NW_001838785 e no No. de Acesso do Genbank MW_001838121, respectivamente. Em outras modalidades, os anticorpos humanizados compreendem uma região C de cadeia H humana selecionada dos isotipos IgG2a, IgG2b, IgG3 ou IgG4.

[000157] Em uma modalidade ilustrativa, a invenção contém um anticorpo monoclonal ou um fragmento do mesmo, gerado contra a toxina A de *C. difficile*, em que o anticorpo é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a seguência de aminoácidos consecutiva da cadeia pesada polipeptídeo da SEQ ID NO: 14 é apresentada na SEQ ID NO:15, (**Fig. 38B**); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a seguência de aminoácidos consecutiva da cadeia leve polipeptídeo da SEQ ID NO:16 é apresentada na SEQ ID NO:17 (**Fig. 38A**).

[000158] Em uma modalidade ilustrativa, a invenção contém um anticorpo monoclonal ou um fragmento do mesmo, gerado contra a toxina A de *C. difficile*, em que o anticorpo é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a seguência de aminoácidos consecutiva da cadeia pesada polipeptídeo da SEQ ID NO: 18 é apresentada na SEQ ID NO:19, (**Fig. 39B**); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a seguência de

aminoácidos consecutiva da cadeia leve polipeptídeo da SEQ ID NO:20 é apresentada na SEQ ID NO:21 (**Fig. 39A**).

[000159] Em uma modalidade ilustrativa, a invenção contém um anticorpo monoclonal ou um fragmento do mesmo, gerado contra a toxina B de *C. difficile*, em que o anticorpo é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a seguência de aminoácidos consecutiva da cadeia pesada polipeptídeo da SEQ ID NO:22 é apresentada na SEQ ID NO:23 (**Fig. 40B**); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a seguência de aminoácidos consecutiva da cadeia leve polipeptídeo da SEQ ID NO:24 é apresentada na SEQ ID NO:25 (**Fig. 40A**).

[000160] São também abrangidas pela invenção porções ou fragmentos dos anticorpos antitoxina A e antitoxina B de *C. difficile* humanizados descritos anteriormente. Tais porções ou fragmentos incluem as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de as regiões V de ambas as cadeias H e L de polipeptídeos, que podem ser convencionalmente determinadas pelos peritos na arte; fragmentos F(ab), fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')2, fragmentos Fc, fragmentos Fd e similares. Em uma modalidade porções ou fragmentos dos anticorpos humanizados contendo regiões V ou porções funcionais das mesmas, irão se ligar de maneira ótima à respectiva toxina e neutralizar a atividade da toxina. Em uma modalidade tais porções funcionais ou fragmentos dos anticorpos humanizados neutralizam de maneira ótima a atividade da toxina em um nível similar a, se não melhor que, aquele do anticorpo humanizado completo.

[000161] De acordo com a invenção mAbs humanizados clonados

molecularmente direcionados contra as toxinas A ou B de *C. difficile* são fornecidos. Tais mAbs humanizados foram isolados e caracterizados como descrito no Exemplo 9, Seções D e E aqui abaixo. Em uma modalidade, a região constante de cadeia leve (CL) de cada um dos anticorpos humanizados é da classe kappa (κ). Em uma modalidade, a região constante da cadeia pesada (CH) de cada um dos anticorpos humanizados é do isotipo IgG1. Em outras modalidades, a região CH dos anticorpos humanizados é do isotipo IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgA ou IgM. Foi observado que os mAbs humanizados contendo regiões variáveis (V) únicas se ligam e neutralizam a atividade de da toxina A ou da toxina B de *C. difficile.* As regiões VL e VH dos mAbs humanizados podem fazer parte de uma imunoglobulina (Ig) completa ou uma molécula de anticorpo ou podem ser utilizados como porções ou fragmentos do anticorpo, em particular, porções ou fragmentos que possuem atividade de ligação e/ou de neutralização. Os exemplos não limitantes de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, $F(ab)_2$ e F(ab') ou $F(ab')_2$. As modalidades da invenção são direcionadas para mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados ou fragmentos dos mesmos, que possuem atividade contra a toxina A de *C. difficile*, em que a região V da cadeia L é selecionada de uma ou mais das SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:7. Em uma modalidade, a invenção é direcionada para as CDRs, a saber, CDR1, CDR2 e/ou CDR3, nas regiões VH ou VL dos anticorpos descritos. As modalidades da invenção são direcionadas para mAbs antitoxina B de *C. difficile* humanizados ou fragmentos dos mesmos, que possuem atividade contra a toxina B de *C. difficile*, em que a região V da cadeia L é apresentada na SEQ ID NO:10. As modalidades da invenção são direcionadas para mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados ou fragmentos dos mesmos, que possuem atividade contra a toxina A de *C. difficile*, em que a região V da cadeia

H é selecionada de uma ou mais das SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:6. As modalidades da invenção são direcionadas para mAbs antitoxina B de *C. difficile* humanizados ou fragmentos dos mesmos, que possuem atividade contra a toxina B de *C. difficile*, em que a região V da cadeia H é selecionada de uma ou mais das SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:9. Em uma modalidade, a invenção é direcionada para as CDRs, a saber, CDR1, CDR2 e/ou CDR3, nas regiões VH ou VL dos anticorpos descritos.

[000162] Em outras modalidades, a invenção abrange ácidos nucleicos que codificam porções de ligação ao antígeno, CDRs ou regiões variáveis (V) dos anticorpos antitoxina A e/ou antitoxina B de *C. difficile* da invenção. Em várias modalidades, as porções, as CDRs ou as regiões V são derivadas de PA-38, PA-39, PA-41 ou PA-50 ou versões humanizadas dos mesmos, como descrito aqui. Em modalidades adicionais, a invenção abrange a sequência de aminoácidos das porções de ligação ao antígeno, das CDRs ou das regiões V que são codificadas pelos respectivos ácidos nucleicos.

[000163] De acordo com outra modalidade, os anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser modificados para estar na forma de um anticorpo biespecífico, um anticorpo bifuncional, um anticorpo multiespecífico ou um anticorpo heterofuncional. Os exemplos não limitantes de anticorpos biespecíficos e heteroespecíficos e procedimentos para a produção de tais anticorpos podem ser encontrados em um número de publicações ilustrativas, por exemplo, UA20090060910, WO2009/058383, WO2009/030734, WO2007/093630, USP 6.071.517, WO2008/024188, UA20070071675, USP 7.442.778, USP 7.235.641, USP 5.932.448 e USP 5.292.668. É pretendido que o termo "anticorpo biespecífico" é inclua qualquer agente, por exemplo, uma proteína, um peptídeo ou um complexo de proteína ou peptídeo, que possui duas especificidades de ligação

diferentes e que se liga a ou interage com (a) a toxina A de *C. difficile* e (b) a toxina B de *C. difficile*. Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende PA-39 ou PA-50 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e PA-41 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma forma quimérica ou humanizada de PA-39 ou PA-50 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e PA-41 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Consequentemente, um anticorpo biespecífico que compreende PA-39 e PA-41 ou formas quiméricas ou humanizadas do mesmo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se ligaria tanto à toxina A quanto à toxina B de *C. difficile*. Similarmente, um anticorpo biespecífico que compreende PA-50 e PA-41 ou formas quiméricas ou humanizadas do mesmo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se ligariam tanto à toxina A quanto à toxina B de *C. difficile*. É pretendido que o termo "anticorpo multiespecífico" inclua qualquer agente, por exemplo, uma proteína, um peptídeo ou um complexo de proteína ou peptídeo, que possui mais de duas especificidades de ligação diferentes e que se liga a ou interage com (a) a toxina A de *C. difficile*, (b) a toxina B de *C. difficile* e (c) pelo menos um outro componente. Consequentemente, a invenção inclui, mas não está limitada a, anticorpos biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos e outros multiespecíficos. Em uma modalidade, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos são humanizados.

[000164] O termo "anticorpos biespecíficos" inclui ainda dianticorpo. O dianticorpo fornece anticorpos terapêuticos que possuem especificidade dual e que são capazes de se direcionar a vários epítopos diferentes com uma única molécula. Os dianticorpos são anticorpos biespecífico bivalentes em que os domínios VH e VL são expressos em uma cadeia polipeptídica isolada, mas utilizando um

ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando assim os domínios a se parearem com domínios complementares de outra cadeia e criando dois sítios de ligação ao antígeno (ver, por exemplo, Holliger, P., e outros. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poijak, R.J., e outros. (1994) *Structure* 2:1121-1123). As duas regiões de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico são quimicamente ligadas ou expressas por uma célula engenheirada geneticamente para produzir o anticorpo biespecífico. (Ver geralmente, Fanger e outros., 1995 *Drug News & Perspec*. 8(3):133-137). Em uma modalidade uma quantidade eficiente de um anticorpo biespecífico pode ser administrada a um indivíduo com infecção causada por *C. difficile* e/ou uma doença associada a *C. difficile* e o anticorpo biespecífico neutraliza a toxicidade da toxina A e da toxina B no indivíduo.

[000165] Em certas modalidades, os anticorpos podem ser anticorpos humanos. É pretendido que o termo "anticorpo humano", como utilizado aqui, inclua anticorpos que possuem regiões de Ig variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados pelas sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa human (por exemplo, mutações introduzidas através de mutagênese aleatória ou específica ao sítio *in vitro ou* através de mutação somática *in vivo).* Entretanto, não é pretendido que o termo "anticorpo humano", como utilizado aqui, inclua anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamífero, tal como um camundongo, foram enxertadas sobre as sequências estruturais humanas (referidas aqui como "anticorpos humanizados"). Os anticorpos humanos direcionados contra a toxina A e/ou toxina B podem ser gerados utilizando camundongos transgênicos

geneticamente modificados e criados para expressar componentes do sistema imunológico humano ao invés do sistema de camundongo.

[000166] Anticorpos humanos monoclonais completos também podem ser preparados através da imunização de camundongos transgênicos para porções grandes de loci de cadeias pesadas e leves da imunoglobulina humana. Ver, por exemplo, Patentes U.S. 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584 e referências citadas aqui, cujos conteúdos são incorporados aqui como referência. Estes animais foram modificados geneticamente de forma que haja uma deleção funcional na produção de anticorpos endógenos (por exemplo, murinos). Os animais são adicionalmente modificados para conter todo ou uma parte do lócus do gene de imunoglobulina da linhagem germinativa humana de forma que a imunização destes animais resulte na produção de anticorpos humanos completos para o antígeno de interesse. Após a imunização destes camundongos (por exemplo, XenoMouse (Abgenix), camundongos HumAb (Medarex/GenPharm)), anticorpos monoclonais são preparados de acordo com a tecnologia de hibridoma padronizada. Estes anticorpos monoclonais possuem sequências de aminoácidos de imunoglobulina humana e, portanto, não provocarão respostas humanas antianticorpo de camundongo (HAMA) responses quando administrados a humanos.

[000167] Os peritos na arte considerarão que são também fornecidos aqui os ácidos nucleicos e os polinucleotídeos que codificam os anticorpos descritos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos. Será também considerado que são fornecidos aqui os ácidos nucleicos e os polinucleotídeos que compreendem uma sequência que codifica os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos. Os vetores e os plasmídeos engenheirados para conterem e/ou expressarem os ácidos nucleicos e os polinucleotídeos que codificam anticorpo são, portanto, fornecidos pela invenção. Como

utilizado aqui, uma "região codificadora" refere-se a uma região de uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de polipeptídeo; a região codificadora pode incluir uma região que codifica uma porção de uma proteína que é posteriormente clivada, tal como um peptídeo sinal. Em alguns casos, as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos podem incluir sequências que codificam ou que são peptídeos sinais. A invenção contém cada uma destas sequências com ou sem, a porção da sequência que codifica ou é um peptídeo sinal.

[000168] Os anticorpos fornecidos aqui podem ser clonados utilizando o método a seguir, bem como outros métodos conhecidos pelos peritos comuns na arte. Como um exemplo não limitante, o RNA total é gerado partindo de células de hibridoma e o cDNA é transcrito de forma inversa utilizando um iniciador oligo-dT. A RNase H pode ser utilizada para remover o RNA para tornar o cDNA de filamento simples. A purificação com coluna com centrifugação pode ser utilizada para remover nucleotídeos livres. Então, uma cauda 3' poli-dG pode ser adicionada com transferase terminal. A amplificação por PCR pode ser realizada utilizando um iniciador de oligo-dC mais um iniciador degenerado para a região constante. Aproximadamente, 40 ciclos podem ser realizados para uma amplificação robusta da cadeia pesada. O sequenciamento direto dos produtos da PCR pode ser então realizado.

[000169] Em certas modalidades, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é codificado por uma molécula de ácido nucleico que é altamente homóloga às moléculas de ácido nucleico anteriores. A molécula de ácido nucleico homóloga pode compreender uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos aproximadamente 90% idêntica à sequência de nucleotídeos fornecida aqui. A molécula de ácido nucleico homóloga pode compreender uma sequência de

nucleotídeos que é pelo menos aproximadamente 95% idêntica, pelo menos aproximadamente 97% idêntica, pelo menos aproximadamente 98% idêntica ou pelo menos aproximadamente 99% idêntica à sequência de nucleotídeos fornecida aqui. A homologia pode ser calculada utilizando várias ferramentas de software disponíveis publicamente bem conhecidas por um perito comum na arte. Os exemplos de ferramentas incluem o sistema BLAST disponível no website do Centro Nacional para Informação de Biotecnologia (NCBI) nos Institutos Nacionais de Saúde.

[000170] Um método de identificação de sequências de nucleotídeos altamente homólogas é através da hibridização de ácidos nucleicos. São também fornecidos aqui anticorpos que possuem propriedades de ligação com a toxina A e/ou a toxina B e outras propriedades funcionais descritas aqui, que são codificados por moléculas de ácido nucleico que se hibridizam sob condições rigorosas com as moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção. A identificação de sequências relacionadas também pode ser conseguida utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e outras técnicas de amplificação adequadas para a clonagem sequências de ácido nucleico relacionadas. Para tais técnicas, os iniciadores da PCR são tipicamente selecoinados para as porções de amplificação de uma sequência de ácido nucleico de interesse, tal como uma CDR.

[000171] O termo "condições de alta estringência" como utilizado aqui se refere a parâmetros aos quais a arte é familiar. Os parâmetros de hibridização de ácidos nucleicos podem ser encontrados em referências que compilam tais métodos, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, e outros., eds., Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ou *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M.

Ausubel, e outros., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Um exemplo não limitante de condições de alta estringência é a hibridização a 65ºC em tampão de hibridização (3,5X SSC, 0,02% de Ficoll, 0,02% de polivinil pirrolidona, 0,02% de Albumina de Soro Bovino, 2,5 mM de NaH_2PO_4(pH7), 0,5% de SDS, 2 mM de EDTA). SSC é 0,15M de cloreto de sódio/0,015 M de citrato de sódio, pH7; SDS é dodecil sulfato de sódio; e EDTA é ácido etilenodiaminetetracético. Após a hibridização, uma membrana para a qual o ácido nucleico é transferido é lavada, por exemplo, em 2X SSC à temperatura ambiente e então a 0,1 - 0,5X SSC/0,1X SDS a temperaturas até 68ºC.

[000172] São fornecidos aqui vetores (por exemplo, vetores de expressão) ou plasmídeos que compreendem as moléculas de ácido nucleico descritas, em adição a outras sequências de ácido nucleico, por exemplo, sequências ORI, promotoras, intensificadoras, de término, necessárias para expressão de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos. Os vetores podem ser utilizados para transformar ou transfectar células hospedeiras para a produção dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos com a especificidade de ligação e/ou características dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos descritos aqui. Em uma modalidade, os vetores podem compreender uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma porção da mesma dos anticorpos e fragmentos que se ligam a antígenos fornecidos. Em outra modalidade, os vetores podem compreender as sequências de ácido nucleico que codificam a cadeia leve ou uma parte da mesma. Em uma modalidade adicional, os vetores da invenção podem compreender uma sequência para uma cadeia pesada ou uma porção do mesmo e uma sequência de uma cadeia leve ou uma porção da mesma. Em uma modalidade adicional, são

fornecidos plasmídeos que produzem os anticorpos ou os fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui.

[000173] Versões modificadas dos anticorpos da invenção também são fornecidas. As modificações em um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo são tipicamente produzidas no ácido nucleico que codifica o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e podem incluir deleções, mutações pontuais, truncamentos, substituições de aminoácidos e adições de aminoácidos ou grupamentos sem ser aminoácidos. Alternativamente, as modificações podem ser feitas diretamente no polipeptídeo, tal como através de clivagem, adição de uma molécula ligante, adição de um grupamento detectável, tal como biotina, adição de um ácido graxo e similar. As modificações também podem conter proteínas de fusão que compreendem todo ou parte do anticorpo ou do fragmento de ligação à sequência de aminoácidos do antígeno. As modificações abrangem adicionalmente o acoplamento ou a ligação do anticorpo com outro agente, tal como um agente citotóxico, um fármaco ou um agente terapêutico.

[000174] Os polipeptídeos modificados incluem polipeptídeos que são modificados especificamente para alterar uma característica do polipeptídeo não relacionada com sua atividade fisiológica. Por exemplo, os resíduos de cisteína podem ser substituídos ou deletados para prevenir ligações dissulfeto indesejadas. Similarmente, certos aminoácidos podem ser alterados para aumentar a expressão de um polipeptídeo através da eliminação de proteólise por proteases em um sistema de expressão (por exemplo, resíduos de aminoácidos dibásicos em sistemas de expressão de levedura em que a atividade de KEX2 protease está presente). Adicionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser alterados, particularmente na região constante de Ig, para prevenir a degradação proteolítica do anticorpo por

enzimas após certas rotas de administração, por exemplo, administração oral, como descrito, por exemplo, na WO2006/071877, publicada em 6 de julho de 2006.

[000175] As modificações são convenientemente preparadas através da alteração de uma molécula de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo. As mutações de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo preferencialmente preservam o quadro de leitura de aminoácidos da sequência codificadora e preferencialmente não criam regiões no ácido nucleico que provavelmente se hibridizarão para formar estruturas secundárias, tais com grampos de cabelo ou alças, que podem ser deletérias à expressão do polipeptídeo modificado.

[000176] As modificações podem ser feitas em qualquer um dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos através da seleção de uma substituição de aminoácido ou através de mutagênese aleatória de um sítio selecionado em um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo. Os polipeptídeos modificados então podem ser expressos e testados em relação a uma ou mais atividades para determinar que mutação fornece um polipeptídeo modificado com propriedades desejadas. As mutações adicionais podem ser produzidas em polipeptídeos modificados (ou em polipeptídeos não modificados) que são silenciosas como uma sequência de aminoácidos do polipeptídeo, mas que fornecem códons preferidos para tradução em um hospedeiro particular. Os códons preferidos para tradução de um ácido nucleico, por exemplo, em *E. coli*, são bem conhecidos pelos peritos comuns na arte. Ainda outras mutações podem ser feitas nas sequências não codificadoras de uma sequência ou um clone de cDNA para aumentar a expressão do polipeptídeo. A atividade de polipeptídeos modificados pode ser testada através da clonagem do gene que codifica o polipeptídeo modificado em um vetor de expressão, da introdução do vetor dentro de uma célula hospedeira

apropriada, da expressão do polipeptídeo modificado e do teste em relação a uma capacidade funcional dos polipeptídeos que são divulgados aqui. Os procedimentos anteriores são bem conhecidos por um perito comum na arte.

[000177] O perito na arte também realizará que substituições de aminoácidos conservativas podem ser feitas nos polipeptídeos para fornecer polipeptídeos funcionalmente equivalentes. Como utilizado aqui, uma "substituição de aminoácido conservativa" refere-se a uma substituição de aminoácido que não altera a carga relativa ou as características de tamanho da proteína em que a substituição de aminoácido é feita. Os polipeptídeos modificados podem ser preparados de acordo com os métodos para alteração de uma sequência de polipeptídeo que são conhecidos por um perito comum na arte, tais como que podem ser encontrados em referências que compilam tais métodos, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, e outros., eds., Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ou *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, e outros., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. As substituições de aminoácidos conservativas incluem substituições feitas entre os aminoácidos dentro dos exemplos de grupos a seguir: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; e (g) E, D.

[000178] As substituições de aminoácidos conservativas nos polipeptídeos são tipicamente realizadas através da alteração de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo. Tais substituições podem ser feitas através de uma variedade de métodos conhecidos por um perito comum na arte. Por exemplo, as substituições de aminoácidos podem ser feitas através da mutação direcionada por PCR, da mutagênese direcionada ao sítio ou através da síntese química de um gene que codifica um polipeptídeo. Quando as substituições de

aminoácidos são feitas em um fragmento pequeno de um polipeptídeo, as substituições podem ser feitas através da síntese direta do peptídeo. A atividade de fragmentos funcionalmente equivalentes de polipeptídeos pode ser testada através da clonagem do gene que codifica o polipeptídeo alterado dentro de um vetor de expressão bacteriano ou de mamífero, da introdução dentro de uma célula hospedeira apropriada, da expressão do polipeptídeo alterado e do teste em relação a uma capacidade funcional dos polipeptídeos que são divulgados aqui.

[000179] Um anticorpo antitoxina ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, da invenção pode ser derivatizada ou ligada a outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína. Adicionalmente, um anticorpo ou uma porção de anticorpo pode ser ligada funcionalmente, por exemplo, através do acoplamento químico, da fusão genética, da associação não covalente etc., a um ou mais outras entidades moleculares, tais como outro anticorpo, um agente detectável, um agente citotóxico, um agente terapêutico, um agente farmacêutico e/ou uma proteína ou um peptídeo que pode mediar a associação com outra molécula, por exemplo, uma região central de estreptavidina ou um tag de polihistidina.

[000180] Uma proteína ou um anticorpo derivatizado pode ser produzido através da ligação cruzada ou do acoplamento de duas ou mais proteínas ou anticorpos dos mesmos tipos ou diferentes. Os agentes de reticulação ou os agentes de ligação adequados incluem aqueles que são heterobifuncionais, que possuem dois grupos de reação distintos separados por um espaçador apropriado (por exemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncionais (por exemplo, suberato de dissuccinimidila) e disponíveis comercialmente (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Um anticorpo antitoxina ou um fragmento de ligação ao antígeno do

mesmo da invenção pode ser conjugado com outra entidade molecular, tal como uma marcação. Os agentes ou as marcações detectáveis com as quais uma proteína pode ser derivatizada ou marcada incluem compostos fluorescentes, enzimas, grupos prostéticos (por exemplo, estreptavidina/biotina e avidina/biotina), materiais quimioluminescentes, materiais bioluminescentes, entidades químicas e materiais radioativos. Os exemplos de compostos fluorescentes detectáveis incluem fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina e ficoeritrina. Uma proteína ou um anticorpo também pode ser derivatizado com enzimas detectáveis, tais como fosfatase alcalina (AP), peroxidase de raiz forte, beta-galactosidase, acetilcolinesterase, glicose oxidase etc. Tais proteínas ou anticorpos derivatizados enzimaticamente se tornam detectáveis após a adição de um substrato específico da enzima de forma a produzir um produto de reação detectável. As proteínas derivatizadas com um grupo prostético, tal como biotina, podem ser detectadas através da medida indireta de ligação com avidina ou estreptavidina.

[000181] As proteínas e os anticorpos marcados podem ser utilizados como agentes ou reagentes para diagnósticos e/ou experimentos para isolar um antígeno conhecido ou pré-determinado através de técnicas padronizadas, tal como cromatografia por afinidade ou imunoprecipitação ou para detectar um antígeno conhecido ou pré-determinado de forma a determinar níveis de proteína no tecido como parte de um procedimento de teste clínico, por exemplo, para monitorar a eficácia de certo regime de tratamento. Em uma modalidade, o antígeno que será detectado pode ser uma toxina em um lisado celular ou em uma amostra do paciente.

[000182] Em uma modalidade particular, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos da invenção são utilizados em combinação, por exemplo, como uma composição farmacêutica que

compreende dois ou mais anticorpos ou fragmentos diferentes que se ligam a antígenos dos mesmos (por exemplo, um ou mais direcionados contra a toxina A e um ou mais direcionados contra a toxina B, dois ou mais direcionados contra a toxina A ou dois ou mais direcionados contra a toxina B etc.). As combinações de anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos podem ser combinadas em uma única terapia (isto é, administradas simultaneamente) para atingir um efeito terapêutico desejado. Alternativamente, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos podem ser administrados separadamente (isto é, em momentos diferentes). Consequentemente, portanto, os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos podem ser armazenados juntos ou separadamente. Os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos podem ser armazenados em um meio aquoso ou em uma forma liofilizada, que pode ser reconstituída antes do uso.

[000183] Em outra modalidade, as composições que compreendem um ou mais anticorpos isolados ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos são fornecidas. São também fornecidas as composições que compreendem uma combinação de um ou mais dos anticorpos mencionados anteriormente ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos. São também fornecidas as composições, cada uma contendo um ou mais dos anticorpos mencionados anteriormente ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos, cujas composições são pretendidas para uso em combinação. Tais composições podem incluir um carreador, um excipiente, um veículo ou um diluente fisiologicamente ou farmaceuticamente aceitável. O carreador, o excipiente, o veículo ou o diluente fisiologicamente ou farmaceuticamente aceitável pode ser misturado com o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma

modalidade, as composições incluem uma combinação de vários (por exemplo, dois ou mais) anticorpos ou fragmentos isolados que se ligam a antígenos dos mesmos. Em uma modalidade, um ou mais dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos da composição se ligam especificamente à toxina A de C. difficile e neutralizam seus efeitos tóxicos, enquanto que um ou mais dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos se ligam especificamente à toxina B de C. difficile e neutralizam seus efeitos tóxicos. Em uma modalidade, tanto um ou mais dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos que se ligam especificamente à toxina A de C. difficile e neutralizam seus efeitos tóxicos quanto um ou mais que se ligam especificamente à toxina B de C. difficile e neutralizam seus efeitos tóxicos são humanizados.

[000184] Em uma modalidade particular, a composição compreende uma combinação de um anticorpo antitoxina A ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como descrito aqui e um anticorpo antitoxina B ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como descrito aqui. Em tal composição, o anticorpo antitoxina A e o anticorpo antitoxina B podem estar presentes em quantidades ou proporções equivalentes, por exemplo, 1:1. Alternativamente, em tal composição, o anticorpo antitoxina A e o anticorpo antitoxina B podem estar presentes em quantidades ou proporções diferentes, tais como 1/2:1; 2:1; 3:1; 4:1 etc. Em uma modalidade, os anticorpos da composição são humanizados. Em uma modalidade, a composição compreende uma combinação de mAb PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e mAb 9693, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, a composição compreende uma combinação de mAb PTA-9694, um fragmento de

ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e mAb 9693, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, a composição compreende uma combinação de qualquer um dos seguintes: Mab PTA-9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e mAb 9693, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo; ou mAb PTA-9888, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e mAb 9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo; ou mAb PTA-9694, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo e mAb 9692, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma forma humanizada do mesmo.

[000185] As composições farmacêuticas também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes terapêuticos. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição que compreende um ou mais anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos como fornecido aqui com pelo menos uma outra terapia convencional. Tais agentes terapêuticos adicionais incluem agentes terapêuticos antibióticos e agentes terapêuticos sem ser antibióticos. Os agentes terapêuticos adicionais incluem vacina com toxoide de C. difficile, ampicilina/amoxicilina, vancomicina, metronidazol, fidaxomicina, linezolida, nitazoxanida, rifaximina, ramoplanina, difimicina (também chamada de PAR-101 ou OPT-80), clindamicina, cefalosporinas (tais como cefalosporinas de segunda e terceira gerações), fluoroquinolonas (tal como gatifloxacina ou moxifloxacina), macrolidas (por exemplo, eritromicina, claritromicina, azitromicina), penicilinas, aminoglicosídeos, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclina, imipenem e meropenem. Agentes terapêuticos adicionais

incluem ainda antibióticos, agentes antibacterianos, bacteriocidas ou bacteriostáticos. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional pode ser uma molécula pequena ou um composto químico de baixo peso molecular, que se direciona para C. difficile e/ou suas toxinas. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional é OPT-80. Os agentes terapêuticos que não são antibióticos incluem tolevamer, um polímero aniônico de alto peso molecular que se liga às toxinas A e B através de mecanismos de carga não específicos.

[000186] Como uma alternativa, é previsto que os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos da invenção podem ser utilizados em combinação com outros anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos. Outros agentes terapêuticos adicionais incluem imunoglobulina agrupada normal, imunoglobulina intravenosa ou imunoglobulinas antitoxina A e antitoxina B policlonais no soro. Outros anticorpos incluem mAbs humanos direcionados contra a toxina A ou a toxina B de C. difficile, como descrito e relatado na literatura publicada (por exemplo, WO/2006/121422; US2005/0287150).

[000187] Também é abrangido aqui um método que envolve a utilização dos anticorpos ou dos fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos da invenção para o tratamento ou para a profilaxia, isto é, para tratar, resolver, melhorar, erradicar, prevenir ou retardar a infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile, patologia ou desenvolvimento ou progressão da mesma. A CDAD tipicamente é precipitatada pela perturbação da flora colônica através do uso de antibióticos tais como clindamicina, cefalosporinas e fluoroquinolonas. Esta perturbação no microambiente colônico, junto com a exposição a esporos de C. difficile, leva à colonização em indivíduos afligidos. Aproximadamente um terço de todos os pacientes que ficam colonizados desenvolve CDAD, que pode resultar em

diarreia grave, perfuração do cólon, colectomia e morte. São, portanto, fornecidos métodos em que um indivíduo recebe a administração de um ou mais anticorpos da invenção ou uma composição que é descrita aqui para tratar infecção causada por C. difficile ou CDAD.

[000188] Como utilizado aqui, "tratar" refere-se a qualquer benefício a um indivíduo com infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile conferido através da administração dos anticorpos ou uma composição ou combinação de composições fornecidas aqui. Por exemplo, e sem limitação, tal benefício pode ser a eliminação de um ou mais sintomas ou efeitos adversos ou a redução em ou a melhora da gravidade de um ou mais sintomas ou efeitos adversos que resultam da infecção ou da doença; um retardo, uma interrupção ou uma reversão na progressão da infecção ou da doença; uma recolonização, uma ressurgência ou uma repopulação da microflora normal e natural do trato gastrointestinal, cólon, intestino etc. ou a cura da infecção ou da doença (isto é, um médico avaliaria o indivíduo e determinaria que o indivíduo não possui mais a infecção ou a doença). Os sintomas ou os efeitos adversos associados com infecção causada por C. difficile incluem desidratação, diarreia, cãibras, falência renal, perfuração intestinal, megacólon tóxico, que podem levar à ruptura do cólon e à morte. As composições fornecidas podem ser utilizadas para reduzir, diminuir, melhorar ou eliminar qualquer um ou todos os sintomas ou os efeitos adversos fornecidos aqui.

[000189] Como utilizado aqui, uma "infecção causada por C. difficile" refere-se a uma infecção que resulta da presença de C. difficile na flora intestinal onde não estava previamente presente ou a uma alteração na presença de C. difficile na flora intestinal (por exemplo, um aumento na quantidade total de C. difficile em relação a uma ou mais outras bactérias etc.), que dá origem ou pode dar origem a

efeito(s) adverso(s) e/ou um aumento no nível de toxinas A e/ou B no intestino ou outros órgãos e tecidos que compreendem o trato gastrointestinal. Tipicamente, a CDAD resulta da aquisição e da proliferação de C. difficile nos intestinos. In vivo, as toxinas A e B demonstram perfis patológicos diferentes com sinergia potential na causa de doença. Em coelhos e camundongos, por exemplo, a toxina A é uma enterotoxina que induz diarreia, enquanto que a toxina B não ativa uma resposta fluida nestas espécies. Entretanto, a toxina B é mais potentemente citotóxica in vitro. Cepas negativas para a toxina A positivas para a toxina B (A- B+) de C. difficile têm sido crescentemente relatadas. As cepas A-/B+ falham em produzir toxina A devido à deleção do domínio repetitivo do gene tcdA e ainda são capazes de causar doença clínica. Em contraste, não há até agora relatos das cepas positivas para toxina A e negativas para toxina B (A+/B-) em humanos.

[000190] A infecção por C. difficile comumente se manifesta na forma de diarreia suave a moderada, ocasionalmente com cãibras abdominais. Pseudomembranas, que são placas brancas amareladas aderentes sobre a mucosa intestinal, são ocasionalmente observadas. Em casos raros, os pacientes com infecção causada por C. difficile podem apresentar uma colite abdominal aguda e que ameaça a vida fulminante, que resulta de uma perturbação da flora bacteriana normal do cólon, da colonização com C. difficile e da liberação de toxinas que causam inflamação e danos na mucoas. A terapia com antibióticos é o fator chave que altera a flora colônica. Embora a flora intestinal resista à colonização e ao supercrescimento com C. difficile, o uso de antibióticos, que suprime a flora normal, permite que a bactéria C. difficile se prolifere. C. difficile está presente em 2-3% de adultos saudáveis e em tanto quanto 70% de bebês saudáveis. Em um de seus aspectos, os mAbs da presente invenção são utilizados para o

tratamento de indivíduos que são assintomáticos, mas que são suscetíveis a ou estão em risco de contrair infecção causada por C. difficile e se tornar afetados com suas doenças associadas. Tais indivíduos podem ser hospitalizados ou podem estar fora de uma instalação de hospital.

[000191] O fator de risco principal para a doença relacionada com C. difficile é a exposição prévia a antibióticos. Os antibióticos mais comuns implicados na colite causada por C. difficile incluem cefalosporinas (especialmente segunda e terceira gerações), ampicilina/amoxicilina e clindamicina. Os antibióticos menos comumente implicados são as macrolidas (isto é, eritromicina, claritromicina, azitromicina) e outras penicilinas. Os compostos ou outros agentes que são ocasionalmente relatados como causadores da doença incluem aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol, metronidazol, cloranfenicol, tetraciclina, imipenem e meropenem. Mesmo uma breve exposição a um único antibiótico pode causar colite por C difficile, particularmente se a flora intestinal normal for adversamente afetada ou morta. Um curso prolongado de antibiótico ou o uso de dois ou mais antibióticos, aumenta o risco de doença. Os antibióticos tradicionalmente utilizados para tratar colite causada por C. difficile demonstraram causar doença. Outros fatores de risco associados com infecção por C. difficile incluem idade avançada (>65 anos); sistema imunológico enfraquecido; hospitalização recente (particularmente compartilhando um quarto de hospital com um paciente infectado, permanências em unidades de cuidado intensivo e permanências prolongadas no hospital); viver em uma casa de repouso, hospício ou outra unidade de cuidado em longo prazo; cirurgia abdominal; doença colônica crônica, (por exemplo, doença intestinal inflamatória (IBD) ou câncer colorretal); tomar antiácidos prescritos ou vendidos à vontade em farmácias que podem

reduzir o ácido estomacal e permitir que C. difficile passe mais facilmente para dentro do intestino; e uma infecção prévia causada por C. difficile. Mais fatores associados com a doença causada por C. difficile incluem agentes antineoplásicos, principalmente metotrexato, síndrome hemolítica-urêmica, malignidades, isquemia intestinal, falência renal, enterocolite necrozante, doença de Hirschsprung, IBD e procedimentos gastrointestinais não cirúrgicos, incluindo tubos nasogástricos. Os indivíduos que podem receber administração das composições fornecidas aqui incluem qualquer um dos indivíduos descritos que estão em risco de infecção causada por C. difficile.

[000192] Embora a maioria dos pacientes com colite causada por C. difficile se recupere sem terapia específica, os sintomas podem ser prolongados e debilitantes. A diarreia associada a C. difficile pode ser um estado de saúde grave com uma taxa de mortalidade de até 25% em pacientes idosos que são frágeis. Relatórios que se concentram em pacientes mais gravemente doentes indicam taxas de mortalidade de 10-30%. A infecção causada por C. difficile é mais comum em pessoas idosas e a idade avançada pode promover suscetibilidade à colonização e doença. Embora bebês e crianças jovens frequentemente carreguem C. difficile e suas toxinas, a infecção clínica é incomum. A infecção cruzada por C. difficile é comum em unidades neonatais, mas recém-nascidos não parecem desenvolver diarreia associada a C. difficile.

[000193] É fornecido aqui um número de métodos que utilizam os anticorpos humanizados da invenção e/ou as composições fornecidas aqui. Por exemplo, um método para o tratamento de um indivíduo que possui infecção ou doença causada por C. difficile, exibe qualquer um dos sintomas ou dos efeitos adversos fornecidos aqui ou possui qualquer uma das doenças fornecidas aqui é fornecido. Em uma modalidade, o método reduz, diminui ou melhora a gravidade de

doença associada à infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile em um indivíduo. Como outro exemplo, um método de tratamento de um indivíduo que é afligido com diarreia associada a C. difficile é fornecido.

[000194] É também fornecido um método de neutralização da toxina A e/ou da toxina B de C. difficile em um indivíduo. Como um exemplo, um método de neutralização da toxina A e da toxina B sistêmicas combinadas de C. difficile é fornecido. Em uma modalidade, a toxina A e a toxina B sistêmicas combinadas de C. difficile são neutralizadas através da administração de tanto um anticorpo humanizado antitoxina A ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo quanto um anticorpo humanizado antitoxina B ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma composição que compreende estes anticorpos. Em outro aspecto, a toxina A e a toxina B sistêmicas combinadas de C. difficile são neutralizadas através da administração de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente tanto à toxina A quanto à toxina B ou uma composição que compreende o anticorpo (por exemplo, na forma humanizada). Em algumas modalidades, os anticorpos humanizados ou as composições são administradas em associação com outro agente terapêutico que se direciona para C. difficile.

[000195] Como outra modalidade, um método de restauração da flora gastrointestinal normal em um indivíduo infectado com C. difficile, tratando assim eficientemente a infecção causada por C. difficile e/ou e suas toxinas, também é fornecido. Ainda como outra modalidade, um método de redução da suscetibilidade de um indivíduo à infecção causada por C. difficile ou à doença associada a C. difficile também é fornecido. Como outra modalidade, um método de prevenção da infecção causada por C. difficile ou da doença associada a C. difficile em um indivíduo é fornecido.

[000196] Nos métodos mencionados anteriormente, o indivíduo recebe a administração de um ou mais dos anticorpos ou das composições fornecidas aqui (por exemplo, uma composição que compreende um anticorpo monoclonal ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo direcionado contra a toxina A de C. difficile e uma composição que compreende um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno direcionado contra a toxina B de C. difficile). As composições podem ser administradas ao indivíduo ao mesmo tempo ou em momentos diferentes. As composições podem ser administradas ao indivíduo como uma mistura em uma composição que compreende um carreador, um veículo ou um excipiente farmaceuticamente aceitável e opcionalmente outro antibiótico, não antibiótico, fármaco ou agente terapêutico eficiente contra C. difficile e/ou suas enterotoxinas.

[000197] Um anticorpo monoclonal antitoxina A humanizado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e/ou um anticorpo monoclonal humanizado antitoxina B ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma composição farmaceuticamente aceitável que compreende os anticorpos humanizados ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos, separadamente ou juntos, pode ser utilizada em qualquer um dos métodos descritos de acordo com a invenção.

[000198] Como utilizado aqui, "carreador farmaceuticamente aceitável" ou "carreador fisiologicamente aceitável" inclui qualquer um e todos os sais, solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e agentes antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo da absorção e similares que são fisiologicamente compatíveis. Preferencialmente, o carreador é adequado para administração oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão).

Dependendo da rota de administração, o composto ativo, isto é, o anticorpo pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

[000199] Quando administradas, as preparações farmacêuticas da invenção são aplicadas em quantidades farmaceuticamente aceitáveis e em composições farmaceuticamente aceitáveis. O termo "farmaceuticamente aceitável" significa um material fisiologicamente aceitável não tóxico que não interfere com a eficácia da atividade biológica dos ingredientes ativos. Tais preparações podem conter rotineiramente sais, agentes tamponantes, preservantes, carreadores compatíveis e opcionalmente outros agentes terapêuticos, tais como agentes potencializadores imunológicos suplementares, incluindo adjuvantes, quimiocinas e citocinas. Quando utilizados na medicina, os sais devem ser farmaceuticamente aceitáveis, mas sais não farmaceuticamente aceitáveis podem ser convenientemente utilizados para preparar sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos e não são excluídos do âmbito da invenção.

[000200] Um sal mantém a atividade biológica desejada do composto parental e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (ver, por exemplo, Berge, S.M. e outros. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Os exemplos de tais sais incluem sais de adição ácida e sais de adição básica. Os sais de adição ácida incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e similares, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos tais como ácidos mono e dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos substituídos por fenila, ácidos hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Os sais de adição básica incluem aqueles derivados de metais alcalinos terrosos, tais como sódio, potássio,

magnésio, cálcio e similares, bem como de amidas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, acetato de etilenodiamina (EDTA), com ou sem um íon indicador, tal como sódio ou cálcio, procaína e similares.

[000201] Qualquer uma das composições da invenção pode ser combinada, se desejado, com um carreador farmaceuticamente aceitável. O termo "carreador farmaceuticamente aceitável" como utilizado aqui significa um ou mais recheios sólidos ou líquidos compatíveis, diluentes ou substâncias de encapsulamento que são adequadas para administração a um ser humano. O termo "carreador" significa um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o ingrediente ativo é combinado para facilitar a aplicação. Os componentes das composições farmacêuticas também são capazes de ser misturados com as moléculas das composições fornecidas e com cada outro, de uma maneira tal que não haja interação que prejudicasse substancialmente a eficácia farmacêutica desejada.

[000202] As composições farmacêuticas podem conter agentes tamponantes adequados, incluindo: ácido acético em um sal; ácido cítrico em um sal; ácido bórico em um sal; e ácido fosfórico em um sal.

[000203] As composições farmacêuticas também podem conter, opcionalmente, preservantes adequados, tais como: cloreto de benzalcônio; clorobutanol; e parabenos.

[000204] As composições farmacêuticas podem ser convenientemente apresentadas em uma fora de dosagem unitária e podem ser preparadas através de qualquer um dos métodos bem conhecidos na arte da farmácia. Todos os métodos incluem a etapa de colocar o agente ativo em associação com um carreador que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as composições são

preparaddas através da colocação uniformemente e intimamente do composto ativo em associação com um carreador líquido, um carreador sólido finamente dividido ou ambos e então, se necessário, moldando o produto.

[000205] Os anticorpos antitoxina A e antitoxina B da invenção ou porções dos mesmos, podem ser fornecidos de acordo com regimes de dosagem que podem ser adjustados para fornecer a resposta ótima desejada, tal como uma resposta terapêutica ou profilática, em um indivíduo. De maneira ilustrada, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser reduzida ou aumentada proporcionalmente, como pode ser indicado por uma situação terapêutica particular. As composições parenterais podem ser embaladas ou preparadas na forma de dosagem unitária para facilitar a administração e a uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária se refere a unidades fisicamente distintas fornecidas na forma de dosagens unitárias para os indivíduos que serão tratados, em que cada unidade contém uma quantidade pré-determinada do composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador, o veículo, o excipiente ou o diluente farmacêutico requerido. A especificação para formas de dosagens unitárias da invenção é determinada por e é diretamente dependente (a) das características exclusivas do composto ativo e do efeito terapêutico particular que será atingido e (b) das limitações inerentes na arte de obtenção de compostos tal como um composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

[000206] As composições adequadas para administração parenteral compreendem convenientemente uma preparação aquosa ou não aquosa esterilizada, que é preferencialmente isotônica em relação ao sangue do receptor. Esta preparação pode ser formulada de acordo

com métodos conhecidos utilizando agentes de dispersão ou umectantes e agentes de suspensão adequados. A preparação injetável esterilizada também pode ser uma solução ou uma suspensão injetável esterilizada em um diluente ou um solvente parenteralmente aceitável não tóxico, por exemplo, na forma de uma solução em 1,3-butano diol. Entre os veículos e os solventes adequados que podem ser empregados estão água, solução de Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. Em adição, óleos fixos esterilizados são convencionalmente empregados como um solvente ou um meio de suspensão. Para esta finalidade qualquer óleo fixo suave pode ser empregado incluindo mono ou diglicerídeos sintéticos. Em adição, os ácidos graxos tal como ácido oleico podem ser utilizados na preparação de produtos injetáveis. As formulações carreadoras adequaddas para administração oral, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular etc. podem ser encontradas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

[000207] Os componentes ativos podem ser preparados com carreadores que irão proteger os componentes contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de fornecimento microencapsulados. Polímeros biocompatíveis biodegradáveis podem ser utilizados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos pelos peritos na arte. Ver, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[000208] O anticorpo e as composições da invenção como agentes terapêuticos podem ser administrados através de qualquer rota

convencional, incluindo injeção ou através de infusão gradual ao longo do tempo. A rota de administração pode, como exemplos não limitantes, ser oral, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, intratecal, intracavidade, retroorbital, vaginal, retal, por inalação, aspiração, dérmica, via supositório ou transdermal.

[000209] Os anticorpos e as composições da invenção são administrados em quantidades ou doses eficientes. Uma "quantidade eficiente" é tal quantidade de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou composição(ões) que é(são) fornecida(s) aqui que isoladamente ou junto com doses adicionais ou outro(s) agente(s) terapêutico(s), produze(m) a resposta desejada, por exemplo, trata(m), melhora(m), eradica(m), resolve(m) ou previne(m) a infecção causada por C. difficile, diarreia ou uma doença associada a C. difficile em um indivíduo. Isto pode envolver apenas o retardo da progressão da infecção, da diarreia ou da doença ao longo de um período prolongado, por exemplo, mais longo que uma semana, duas semanas, três semanas, um mês, dois meses, três meses ou mais de três meses. Entretanto, tais quantidades eficientes tratam ou interrompem de maneira ótima a progressão da infecção, da diarreia ou da doença permanentemente. Isto pode ser monitorado através de métodos de rotina. A resposta desejada ao tratamento da doença ou o do estado de saúde também pode ser o retardo do início ou até mesmo a prevenção do início da infecção ou doença.

[000210] As quantidades eficientes dependerão, evidentemente, da infecção ou da doença particular que será tratada, da gravidade da infecção ou da doença, dos parâmetros individuais do paciente incluindo idade, condição física, tamanho e peso, da duração do tratamento, da natureza da terapia concorrente (se alguma), da rota de administração específica e fatores similares dentro do conhecimento e da perícia agente de saúde. Estes fatores são bem conhecidos pelos

peritos comuns na arte e podem ser endereçados com não mais do que teste e experimentos de rotina. É geralmente preferido que uma dose máxima dos componentes individuais ou combinações dos mesmos sejam utilizadas, isto é, a dose segura mais alta de acordo com o julgamento médico razoável. Será entendido pelos peritos comuns na arte, entretanto, que um paciente pode insistir sobre uma dose mais baixa ou uma dose tolerável por razões médicas, razões psicológicas ou por virtualmente quaisquer outras razões.

[000211] As composições farmacêuticas utilizadas nos métodos anteriores são preferencialmente esterilizadas e contêm uma quantidade eficiente de um ou mais anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos fornecidos aqui para a produção da resposta desejada em uma unidade de peso ou volume adequada para administração a um paciente. A resposta pode, por exemplo, ser medida através da determinação dos efeitos fisiológicos da composição, tal como a diminuição dos sintomas da doença. Outros ensaios serão conhecidos por um perito comum na arte e podem ser empregados para medir o nível da resposta.

[000212] As doses ou as quantidades das composições administradas a um indivíduo podem ser escolhidas de acordo com parâmetros diferentes, em particular de acordo com o modo de administração utilizado e a condição do indivíduo. Outros fatores incluem o período de tratamento desejado. No evento de que uma resposta em um indivíduo é insuficiente nas doses iniciais aplicadas, doses mais altas (ou doses eficientemente mais altas através de uma rota de fornecimento mais localizada) podem ser empregadas até a extensão que a tolerância do paciente permite.

[000213] Em geral, as doses ou as quantidades podem variar de aproximadamente 1 µg/kg até aproximadamente 100.000 µg/kg. Os exemplos não limitantes de faixas de doses que constituem uma

quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficiente de um anticorpo, porção de anticorpo ou composição da invenção incluem 0,1 mg/kg-100 mg/kg; 0,1 mg/kg-60 mg/kg; de 0,5 mg/kg-75 mg/kg; 0,5 mg/kg-25 mg/kg; 0,75 mg/kg-40 mg/kg; 1 mg/kg-50 mg/kg; ou 1 mg/kg-5 mg/kg. Será considerado que para qualquer indivíduo particular, paciente ou indivíduo, as doses e os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e o julgamento profissional do perito que é a administração ou a supervisão da administração dos anticorpos e/ou das composições. Tais faixas de doses são apenas exemplos e não são pretendidas que limitem o âmbito ou a prática da invenção. Com base na composição, a dose pode ser fornecida continuamente, tal como através de bomba contínua ou intervalos periódicos. Os intervalos de tempo desejados de várias doses de uma composição particular podem ser determinados sem experimentos desnecessários por um perito na arte. Outros protocolos para a administração das composições serão conhecidos por um perito comum na arte, em que a quantidade da dose, o programa de administração, os sítios de administração, o modo de administração e similares variam do que foi descrito anteriormente.

[000214] A administração das composições a mamíferos sem ser humanos, por exemplo, para as finalidades de teste ou para as finalidades terapêuticas veterinárias, é realizada sob substancialmente as mesmas condições que são descritas anteriormente.

[000215] São também fornecidos aqui kits que compreendem anticorpos da invenção ou composições que compreendem anticorpos da invenção e instruções para uso. Os kits podem conter ainda pelo menos um reagente adicional, tal como um agente terapêutico adicional ou um ou mais anticorpos ou fragmentos adicionais que se ligam a antígenos que são fornecidos aqui (por exemplo, um anticorpo

ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo à toxina A quando o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no kit é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo à toxina B e vice versa).

[000216] Os componentes dos kits podem ser embalados em meio aquoso ou na forma liofilizada. Quando os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos são utilizados nos kits na forma de conjugados (por exemplo, um conjugado de anticorpo biespecífico), os componentes de tais conjugados podem ser fornecidos na forma completamente conjugada, na forma de intermediários ou na forma de grupamentos separados que serão conjugados pelo usuário ou o kit de acordo com as instruções para uso fornecidas.

[000217] Um kit pode compreender um carreador que é compartimentalizado para receber em confinamento íntimo alí um ou mais meios de recipientes ou uma série de meios de recipientes, tais como tubos de ensaio, frascos, garrafinhas, garrafas, seringas ou similar. Um primeiro meio de recipiente ou uma série de meios de recipientes pode conter um ou mais anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos. Um segundo meio de recipiente ou série de meios de recipientes pode conter um ou mais anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos, em que os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos são diferentes daqueles no primeiro meio de recipiente ou algum outro agente terapêutico adicional. Os kits fornecidos aqui podem incluir ainda um terceiro recipiente que contém uma molécula para ligar os anticorpos ou os fragmentos que se ligam a antígenos contidos no primeiro e no segundo recipientes.

[000218] Como utilizado aqui em relação aos polipeptídeos, às proteínas ou aos fragmentos dos mesmos, "isolado" significa separado

de seu ambiente nativo e presente em quantidade suficiente para permitir sua identificação ou uso. Isolado, quando se refere a uma proteína ou um polipeptídeo, significa, por exemplo: (i) seletivamente produzido através de clonagem com expressão ou (ii) purificado através de cromatografia ou eletroforese. Proteínas ou polipeptídeos isolados podem ser, mas não precisam ser, substancialmente puros. O termo "substancialmente puro" significa que as proteínas ou os polipeptídeos são essencialmente livres de outras substâncias com as quais podem ser encontrados na natureza ou em sistemas in vivo até uma extensão prática e apropriada para seu uso pretendido. Os polipeptídeos substancialmente puros podem ser produzidos através de técnicas bem conhecidas na arte. Devido ao fato de que uma proteína isolada pode ser misturada com um carreador farmaceuticamente aceitável em uma preparação farmacêutica, a proteína pode compreender apenas uma pequena porcentagem em peso da preparação. A proteína é, todavia, isolada pelo fato de que foi separada das substâncias com as quais pode estar naturalmente associada nos sistemas vivos, isto é, isolada de outras proteínas que ocorrem naturalmente.

[000219] Os métodos para a avaliação um agente candidato para eficácia no tratamento de infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile também são fornecidos. Tais métodos podem compreender as etapas de tratamento de um indivíduo com um agente que aumenta o risco de infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile no indivíduo, inoculando o indivíduo com C. difficile, tratando o indivíduo com o agente candidato e avaliando a eficácia de tratamento com o agente candidato. Como utilizado aqui, um "agente que aumenta o risco de infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile" é qualquer agente que se acredita que promova o início ou a progressão de infecção causada por C. difficile

ou doença associada a C. difficile. Tal agente pode ser um agente antibiótico ou não antibiótico. Por exemplo, o agente pode ser qualquer um dos antibióticos descritos aqui. De maneira ilustrada, tal antibiótico pode ser clindamicina metronizadol, vancomicina, fidaxomicina, nitazoxanida, rifaximina ramoplanina ou uma combinação dos mesmos.

[000220] Nestes métodos, o agente candidato pode ser administrado ao indivíduo antes ou após a inoculação com C. difficile. O agente candidato pode ser qualquer agente que se acredita ter o potencial para tratamento ou para prevenção da infecção causada por C. difficile ou doença associada a C. difficile. Os agentes candidatos, que podem ser um antibiótico ou um não antibiótico, incluem anticorpos ou fragmentos que se ligam a antígenos dos mesmos que se ligam especificamente à toxina A e/ou à toxina B de C. difficile.

[000221] Estes métodos incluem qualquer um dos métodos in vitro e in vivo descritos nos Exemplos aqui abaixo.

[000222] A meta final do tratamento de CDAD é descontinuar todos os antibióticos e permitir a restauração da microflora intestinal normal. De acordo com a invenção, os mAbs antitoxinas A e B descritos aqui podem fornecer terapias sem antibiótico planejadas para bloquear os efeitos patogênicos da toxina de C. difficiles, permitir a descontinuação de antibióticos e dessa maneira fornecer tempo para que o cólon cicatrize e a microflora intestinal normal se restabeleça. Os anticorpos monoclonais da invenção demonstraram proteção completa e durável (>37 dias) em um modelo rigoroso de hamster de CDAD. Com base em suas características e propriedades excepcionais, os mAbs antitoxina A e toxina B de *C. difficile* da invenção fornecem novas opções de tratamento e medicamentos para pacientes que se serviram fracamente de terapias existentes, incluindo aqueles indivíduos afligidos com os casos mais graves de doença.

[000223] A presente invenção abrange ainda uma vacina ou um agente imunogênico que compreende porções, fragmentos ou peptídeos da toxina A e/ou da toxina B de *C. difficile* contendo as regiões epitópicas reconhecidas e/ou ligadas por um ou mais de anticorpo monoclonal PA-39 (No. de Acesso da ATCC PTA-9692), uma forma humanizada de PA-39, o anticorpo monoclonal PA-50 (No. de Acesso da ATCC PTA-9694), uma forma humanizada de PA-50, o anticorpo monoclonal PA-41 (No. de Acesso da ATCC PTA-9693), uma forma humanizada de PA-41, um anticorpo que compete pela ligação da toxina A com anticorpo monoclonal PA-39 ou uma forma humanizada do mesmo, um anticorpo que compete pela ligação da toxina A com anticorpo monoclonal PA-50 ou uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo que compete pela ligação da toxina B com anticorpo monoclonal PA-41 ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, a vacina ou o agente imunogênico compreende porções, fragmentos ou peptídeos da toxina A e toxina B de C. difficile contendo as regiões epitópicas reconhecidas e/ou ligadas por um ou mais de anticorpo monoclonal PA-39 (No. de Acesso da ATCC PTA-9692), uma forma humanizada de PA-39 ou um anticorpo que compete pela ligação da toxina A e toxina B com anticorpo monoclonal PA-39 ou uma forma humanizada do mesmo. Em uma modalidade, as porções, os fragmentos ou os peptídeos que contêm epítopo da toxina A e/ou da toxina B da vacina ou do agente imunogênico são derivados da proteína da toxina A ou da toxina B através de clivagem proteolítica. Em uma modalidade, os fragmentos, as porções ou os peptídeos da toxina A da vacina ou do agente imunogênico são produzidos através de clivagem proteolítica por enteroquinase. Em uma modalidade, os fragmentos, as porções ou os peptídeos da toxina B da vacina ou do agente imunogênico são produzidos através de clivagem proteolítica por caspase (caspase 1). Em uma modalidade,

as porções ou os fragmentos que contêm epítopo da vacina ou do agente imunogênico são peptídeos qumicamente ou recombinantemente sintetizados da proteína da toxina A ou da toxina B. Em uma modalidade, os fragmentos, as porções ou os peptídeos da vacina ou do agente imunogênico contendo uma ou mais regiões epitópicas da toxina A e/ou da toxina B que são reconhecidos e ligados pelo anticorpo são derivados de um ou mais dos terminais aminos da toxina A; os terminais aminos da toxina B; os terminais carbóxi da toxina A; os terminais carbóxi da toxina B; o domínio de ligação ao receptor da toxina A; uma região fora do domínio de ligação ao receptor da toxina A; a região enzimática N-terminal da toxina B; o domínio de glicosiltransferase da toxina A; o domínio de glicosiltransferase da toxina B; o domínio proteolítico da toxina A; o domínio proteolítico da toxina B; o domínio formador de poros hidrofóbicos da toxina A; ou o domínio formador de poros hidrofóbicos da toxina B.

[000224] Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados dos terminais aminos da toxina A ou da toxina B. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados dos terminais carbóxi da toxina A ou da toxina B. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados do domínio de glicosiltransferase da toxina A ou da toxina B. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados do domínio proteolítico da toxina A ou da toxina B. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados do domínio formador de poros

hidrofóbicos da toxina A ou da toxina B. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados do domínio de ligação ao receptor da toxina A. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados do domínio de ligação ao receptor da toxina B. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados de uma região fora do domínio de ligação ao receptor da toxina A. Em algumas modalidades, os fragmentos contendo uma ou mais regiões epitópicas reconhecidas e ligadas pelos anticorpos são derivados da região enzimática N-terminal da toxina B. Em uma modalidade, os fragmentos ou as porções que contêm epítopo da toxina A e/ou da toxina B têm <300 kDa de tamanho. Em outras modalidades, os fragmentos ou as porções que contêm epítopo da toxina A e/ou da toxina B têm ~158-160 kDa, ~100-105 kDa, por exemplo, 103 kDa, ~90-95 kDa, por exemplo, 91 kDa e/ou ~63-68 kDa, por exemplo, 63 kDa ou 68 kDa de tamanho. Em outras modalidades, os fragmentos ou as porções que contêm epítopo da toxina A têm ~158-160 kDa; ~90-95 kDa, por exemplo, 91 kDa e/ou ~63-68 kDa, por exemplo, 68 kDa de tamanho. Em outras modalidades, os fragmentos ou as porções que contêm epítopo da toxina B têm ~100-105 kDa, por exemplo, 103 kDa e/ou ~63-68 kDa, por exemplo, 63 kDa de tamanho.

[000225] Tais porções, fragmentos ou peptídeos das toxinas, quando administrados na forma de uma vacina ou um agente imunogênico a um indivíduo infectado com C. difficile ou afligido com doença associada a C. difficile, podem ativar uma resposta humoral no indivíduo, isto é, anticorpos que possuem especificidades para toxina A e/ou toxina B, permitindo assim que o indivíduo monte uma resposta imunológica contra as toxinas e para neutralizar, bloquear, reduzir,

melhorar, curar ou tratar a doença associada a C. difficile, infecção ou CDAD no indivíduo. Consequentemente, outra modalidade fornece um método de neutralização, bloqueio, redução, melhora, cuyra ou tratamento da infecção causada por C. difficile ou uma doença associada a C. difficile em um indivíduo que necessita do mesmo, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficiente da vacina ou do agente imunogênico descrito anteriormente. Em uma modalidade, o indivíduo ativa uma resposta humoral à toxina A e/ou à toxina B de C. difficile, dessa maneira neutralizando, bloqueando, reduzindo, melhorando, curanto ou tratando a doença associada a C. difficile, infecção ou CDAD no indivíduo. Em outra modalidade, o indivíduo ativa uma resposta imunológica celular à toxina A e/ou à toxina B de C. difficile. Em outra modalidade, o indivíduo ativa tanto uma resposta imunológica humoral quanto celular à toxina A e/ou à toxina B de C. difficile.

[000226] Em outra modalidade, a invenção abrange um método de neutralização, inibição ou bloqueio na atividade da toxina A e/ou da toxina B em ou contra uma célula suscetível à infecção causada por C. difficile, que compreende o contato a célula com um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a presente invenção, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, neutraliza, inibe ou bloqueia a atividade da toxina A e/ou da toxina B em ou contra a célula através de um mecanismo de ação competitivo ou competitivo misto. Em uma modalidade, o anticorpo é um ou mais de um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico. Em uma modalidade, a célula está em um indivíduo e o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, administrado em uma quantidade eficiente ao indivíduo. Em uma modalidade, a célula está dentro do trato gastrointestinal, por exemplo, uma célula epitelial intestinal, do

indivíduo. Em uma modalidade, a toxina é a toxina A. Em uma modalidade, a toxina é a toxina B. Em uma modalidade, a toxina é a toxina A e o mecanismo de ação do anticorpo é um mecanismo de ação de inibição competitiva. Em uma modalidade, a toxina é a toxina A e o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é PA-50 (No. de Acesso da ATCC PTA-9694), uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo ou fragmento do mesmo, que compete com PA-50 pela atividade de neutralização da toxina A. Em uma modalidade, a toxina é a toxina A e o mecanismo de ação do anticorpo é um mecanismo de ação de inibição competitiva mista. Em uma modalidade, a toxina é a toxina A e o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é PA-39 (No. de Acesso da ATCC PTA-9692), uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo ou fragmento do mesmo, que compete com PA-39 pela atividade de neutralização da toxina A. Em uma modalidade, a toxina é a toxina B e o mecanismo de ação do anticorpo é um mecanismo de ação de inibição competitiva mista. Em uma modalidade, a toxina é a toxina B e o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é PA-41 (No. de Acesso da ATCC PTA-9693), uma forma humanizada do mesmo ou um anticorpo ou fragmento do mesmo, que compete com PA-41 pela atividade de neutralização da toxina B.

[000227] Como utilizado aqui, o termo "inibidor competitivo" da toxina refere-se a um inibidor da neutralização da toxina, por exemplo, um anticorpo, um agente ou uma molécula pequena ou uma entidade química, que exibe um desvio da EC50 para a direita na curva de neutralização, sem uma alteração na porcentagem de neutralização máxima à medida que a concentração da toxina aumenta na cultura. Assim, um inibidor competitivo é tipicamente capaz de vencer o efeito citotóxico da toxina através da adição de mais inibidor. O termo "inibidor não competitivo" da toxina refere-se a um inibidor da

neutralização da toxina que exibe um decréscimo na porcentagem de neutralização máxima sem uma alteração na concentração, produzindo uma resposta meia-máxima (EC_{50}) à medida que a concentração da toxina aumenta na cultura. Assim, um inibidor não competitivo é tipicamente incapaz de vencer completamente o efeito citotóxico da toxina através da adição de mais inibidor. O termo "inibidor competitivo misto" de toxina refere-se a um inibidor da neutralização da toxina que exibe algum grau de inibição tanto competitiva quanto não competitiva à medida que a concentração da toxina aumenta na cultura. Por exemplo, um inibidor competitivo misto de toxina pode se ligar à toxina e exercer seu efeito através do bloqueio da ligação de toxina a uma célula, bem como através do bloqueio de outros efeitos citotóxicos da toxina; exercendo assim um mecanismo de ação competitivo misto.

Exemplos

Exemplo 1

Produção de anticorpos monoclonais de neutralização contra a toxina A e/ou a toxina B de *C. difficile*

A. Preparação do agente imunogênico

[000228] Os anticorpos monoclonais de neutralização direcionados contra a toxina A e/ou toxina B de *C. difficile* foram gerados através da imunização de camundongos com o toxoide da toxina A de *C. difficile* (forma inativa de toxina) e com formas ativas da toxina A e/ou da toxina B. Os mAbs murinos (PA-38: mAb antitoxina A, ATCC # PTA-9888; PA-39: mAb antitoxinas A e B, ATCC # PTA-9692; PA-41: mAb antitoxina B ATCC # PTA-9693; e PA-50: mAb antitoxina A, ATCC # PTA-9694) foram gerados através da imunização de animais com toxoide A seguida por imunizações com a forma ativa da toxina A e/ou da toxina B. O toxoide da toxina A, a toxina A, a toxina B (List Biological Laboratories Inc., Campbell, CA) e a toxina A (Techlab Inc.,

Blacksburg, VA) foram armazenados a 4˚C até o uso. As toxinas e o toxoide eram derivados da cepa VPI 10463, uma cepa de referência comumente utilizada de *C. difficile*. O adjuvante Quil A (Accurate Chemical, Westbury, NY) foi adicionado ao volume requerido de toxoide ou toxina e misturado. A mistura foi preparada dentro de 60 minutos de imunizações e armazenada em gelo até pronta para imunizar. Para o reforço final antes da fusão, a toxina requerida foi diluída em PBS e armazenada em gelo até ser utilizada para imunização.

B. Imunização e fusão

[000229] Trinta fêmeas de camundongos BALB/c (Charles River Labs, Wilmington, MA) receberam duas doses de imunização (para PA-50) ou três doses de imunização (para PA-38, PA-39 e PA-41) da toxoide da toxina A (10 µg) de forma subcutânea em intervalos de três semanas antes de receberem imunizações de reforço com doses crescentes da toxina A ativa ou da toxina B ativa, também em intervalos de três semanas. Para PA-38, um camundongo recebeu uma imunização de reforço a cada três semanas para um total de três reforços com a toxina A (List Biological Laboratories Inc.), cada reforço com aumento de dose de 500 ng até 2 µg e um reforço final da toxina A (8 µg) três dias antes da esplenotomia. Para PA-39 e PA-41, dois camundongos receberam três ou cinco imunizações de reforço, respectivamente, a cada três semanas com toxina B, cada reforço com aumento na dose de 2 µg até 12,5 µg e um reforço final da toxina B (20 µg) três dias antes da esplenotomia. Para PA-50, um camundongo recebeu imunização de reforço a cada três semanas para um total de quatro reforços com toxina A (Techlab Inc.), cada reforço com aumento na dose de 20 ng até 2,5 µg e um reforço final da toxina A (10 µg) três dias antes da esplenotomia. As doses de imunização e de reforço de toxoide e toxina, respectivamente, foram administradas em

associação com adjuvante, por exemplo, Quil A (10 µg). O reforço com a forma ativa da toxina A ou da toxina B serviu para identificar animais que podem ter desenvolvido anticorpos protetores. O soro dos animais imunizados foi diluído em série e testado em relação à neutralização do efeito citotóxico da toxina A em células CHO-K1 como descrito abaixo. Os animais com o título mais alto de anticorpos de neutralização foram escolhidos para as fusões e receberam reforço com toxina sem adjuvante.

[000230] Após o reforço, os animais foram sacrificados e os esplenócitos isolados foram fundidos com a linhagem de células Sp2/0, utilizando métodos padronizados. Os hibridomas foram suspensos em meio de seleção, RPMI-1640, 10% de FBS, 10% de BM Condimed-H1 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) e beta mercaptoetanol (para PA-38 e PA-39) ou Hibridoma-SFM e 10% de FBS (para PA-41 e PA-50) que continha 100 µM de hipoxantina, 1 µg/mL de azaserina e 16 µM de timidina para pressão seletiva. Os hibridomas foram plaqueados em placas de cultura de tecido de fundo chato de 96 poços (BD Biosciences, San Jose, CA). As placas foram incubadas a 37˚C durante 3 dias, seguida pela adição de meio de crescimento HT (o meio de seleção sem azaserina). A incubação continuou durante mais 4-7 dias antes da verificação dos sobrenadantes de hibridoma em relação à atividade de neutralização.

[000231] Na verificação primária para PA-38, 608 sobrenadantes de hibridoma foram testados em relação à capacidade de neutralizar o efeito citotóxico da toxina A (List Laboratories) em células CHO-K1 (ATCC# CCL-61, Manassas, VA). Na verificação primária para PA-39 e PA-41, 2416 sobrenadantes de hibridoma foram testados em relação à capacidade de neutralizar o efeito citotóxico da toxina B (List Laboratories) em células CHO-K1. Na verificação primária para PA-50, 1440 sobrenadantes de hibridoma foram testados em relação à

capacidade de neutralizar o efeito citotóxico da toxina A (Techlab Inc.) nas células T-84. Um segundo ensaio verificava a inibição da aglutinação mediada por toxina de eritrócitos de coelho. Partindo do procedimento de verificação, quatro mAbs, que foram denominados PA-38 (antitoxina A), PA-39 (antitoxina A/B), PA-50 (antitoxina A) e PA-41 (antitoxina B) e que inibiam ou neutralizavam eficientemente as toxinas de C. difficile nos ensaios de verificação, foram isolados. As linhagens de célula de hibridoma que produziram estes mAbs foram clonadas duas vezes por diluição limitante para gerar linhagens de células clonais. Os mAbs PA-38, PA-39, PA-41 e PA-50 foram determinados como sendo do isotipo IgG2a,□, IgG1,□, IgG1,□ e IgGI,□, respectivamente, utilizando IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). As linhagens de células de hibridoma produtoras de mAb são denominadas pelo menos nome que os mAbs que produzem.

C.Verificação: neutralização do efeito citotóxico da toxina A ou B sobre as células

[000232] Os sobrenadantes de hibridoma foram verificados em relação à capacidade de neutralizar o efeito citotóxico da toxina A ou da toxina B nas células. Um método de alto rendimento foi desenvolvido para processar milhares de sobrenadantes de hibridoma de uma vez. O ensaio de citoxicidade utilizava células CHO-K1 (para PA-38, PA-39 e PA-41) ou células T-84 (para PA-50). As células foram adicionadas às placas de ensaio (placas de fundo chato translúcidas com parede opaca branca de 96 poços; Perkin Elmer, Waltham, MA) utilizando o sistema robótico Biomek FX (Beckman Coulter, Brea, CA). As placas de ensaio foram incubadas durante 4 horas a 37ºC para permitir que as células se aderissem aos poços. Para o ensaio de T-84, a toxina A foi diluída até 240 ng/mL. Para o ensaio de CHO-K1, a toxina A foi diluída até 2 µg/mL ou a toxina B foi diluída até 6 ng/mL. A

toxina diluída foi adicionada às placas de diluição de reagente (placas de fundo arredondado de 96 poços; BD, Franklin Lakes, NJ) manualmente em um Biosafety Cabinet (BSC). Os sobrenadantes de hibridoma foram coletados manualmente e adicionados nos poços das placas de diluição de reagente utilizando o sistema Biomek FX. O sobrenadante e a mistura de toxina foram incubados a 37ºC durante 1 hora e adicionados nas placas de ensaio contendo as células utilizando o sistema Biomek FX. Após a incubação a 37˚C durante 72 horas, 20 µL/poço de CellTiter-Blue (Promega, Madison, WI) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas durante 4 horas adicionais e então lidas em uma SpectraMax M5 Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. A sobrevivência das células foi comparada em culturas não tratadas e tratadas com toxina. A porcentagem de sobrevivência das células foi representado graficamente em relação à concentração.

D.Produção de mAbs murinos da invenção

[000233] Os métodos de produção *in vivo* e *in vitro* foram utilizados para a obtenção de mAbs isolados e/ou purificados da invenção. Para a produção *in vivo* dos mAbs murinos, o fluido de ascitos foi preparado através da injeção da linhagem de célula de hibridoma apropriada dentro da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c iniciados com pristano. O mAb foi purificado até >95% de homogeneidade através da precipitação com sulfato de amônio seguida pela cromatografia com Proteína A. Os anticorpos purificados foram ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

[000234] Para produção *in vitro* em pequena escala (< 100 mg), os mAbs murinos foram purificados dos sobrenadantes de hibridoma crescidos em cultura. Os hibridomas foram cultivados em Hibridoma-SFM (Invitrogen) e 10% de FBS. As linhagens de células foram

passadas e expandidas em frascos T-150 três vezes semanalmente para garantir que a concentração celular não excedia $2x10^6$ células/mL. Os sobrenadantes contendo PA-39 (IgG1,κ), PA-41 (IgG1,κ) e PA-50 (IgG1,κ) foram clarificados por centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos e filtrados. O material clarificado foi diluída em uma concentração final de tampão de corrida (60 mM de glicina/3 M de NaCl, pH 8,5) e carregado sobre uma coluna de proteína A equilibrada com tampão de corrida. Após a lavagem da coluna, os mAbs PA-39 ou PA-41 foram eluídos com 0,1 de sódio acetato, pH 5,5 e neutralizados em pH 7,0. Os sobrenadantes contendo PA-38 (IgG2a,κ) foram clarificados por centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos e filtrados. O material clarificado foi ajustado até uma concentração final de 25 mM de tampão fosfato de sódio/100 mM de NaCl, pH 7,0 e carregado sobre uma coluna de proteína A equilibrada com 50 mM de tampão fosfato de sódio/0,5 M de NaCl. A coluna foi lavada; o mAb PA-38 foi eluído com 0,1 M de acetato de sódio, pH 3,0 e o anticorpo eluído foi neutralizado em pH 7,0.

[000235] Para a produção *in* vitro de grandes quantidades de mAb (> 100 mg), os hibridomas foram inoculados em um WAVE Bioreactor (GE Healthcare, Piscataway, NJ) com uma densidade inicial de $2x10^5$ células/mL de Hibridoma-SFM com 5% de Ultra Low IgG FBS. A contagem e a viabilidade celular foram monitoradas diariamente. Aproximadamente no dia 6 ou 7 quando a produção de anticorpo chegou a um platô, a cultura foi terminada. A cultura foi clarificada e foi então concentrada 10-20 vezes por filtração com fluxo tangencial. O anticorpo foi carregado sobre uma coluna de proteína A equilibrada com 60 mM de glicina 3 M de NaCl em pH 8,5. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e o anticorpo foi eluído com 50 mM de acetato, pH 3,5. O anticorpo agrupado foi neutralizado em pH 7,4 com 1 M de Tris, concentrado até 10mg/mL e diafiltrado em PBS. Os mAbs

purificados foram esterilizados por filtração e armazenados a -80˚C.

Exemplo 2

Especificidade e afinidade de mAbs antitoxina A e/ou toxina B de *C. difficile* da invenção à toxina A e/ou à toxina B

A.ELISA para determinar a especificidade de mAb para toxina A e/ou toxina B

[000236] As placas de ELISA (BD Biosciences) foram revestidas com 50 ng/poço da toxina A (List Laboratories) ou 25 ng/poço da toxina B (List Laboratories) durante a noite a 4°C. Após a lavagem das placas com PBS- (PBS sem cálcio ou magnésio, 0,05% de Tween 20), os poços foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio (PBS sem cálcio ou magnésio, 0,1 % de Tween 20, 2,5% de leite desnatado) durante uma hora a 37°C. A etapa de lavagem foi repetida e os sobrenadantes de hibridoma ou o mAb purificado foram adicionados durante uma hora a 37°C. A placa foi lavada e incubada durante uma hora a 37°C com IgG anti-Fc de camundogo de caprino, peroxidase de raiz forte (HRP)-conjugada (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). A placa foi revelada com o sistema de substrato de ABTS peroxidase (KPL, Gaithersburg, MD), com solução de término de ABTS peroxidase (KPL) e lida em uma leitora de placas SpectraMax (Molecular Devices) a 405 nm.

[000237] Os dados de titulação são mostrados nas **Figs. 1A-C**. A **Fig. 1A** demonstra que PA-38 se liga à toxina A e não à toxina B. A **Fig. 1B** demonstra que PA-39 pode se ligar tanto à toxina A quanto à toxina B. A **Fig. 1C** demonstra que PA-41 se liga à toxina B e não à toxina A.

B.Reatividade de mAbs às toxinas A e B em Biacore

[000238] Um instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare) foi utilizado para determinar a especificidade de ligação de mAbs da invenção à toxina A e/ou à toxina B. Os MAbs foram imobilizados a

aproximadamente 10.000 unidades de ressonância (RU) nos chips sensores CM5 (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante para acoplamento de amina. Uma superfície de referência de anticorpo combinado ao isotipo de especificidade irrelevante (Southern Biotech) foi utilizada como um controle. Os experimentos de ligação foram realizados a 25ºC em tampão HPS-EP baseado em HEPES (GE Healthcare). A toxina A ou a toxina B purificada (30 nM; List Biological Laboratories) foi passada pelo controle e as células de fluxo de teste a uma taxa de 5 µL/min. Quando indicado, o mAb adicional (100 nM) foi então passado ao longo da célula de fluxo a 5 µL/min para verificar a ligação multivalente ou competitiva.

[000239] Como mostrado nas **Figs. 2A-D**, mAb PA-38 (**Fig. 2A**) e mAb PA-50 (**Fig. 2C**) especificamente se ligam à toxina A; mAb PA-41 (**Fig. 2D**) se liga especificamente à toxina B; e mAb PA-39 (**Fig. 2B**) se liga preferencialmente à toxina A, mas também demonstrava ligação à toxina B. Os resultados destes dados são coerentes com os dados de ELISA (**Figs. 1A-C**) e demonstram as especificidades de ligação de mAbs da invenção à toxina A e/ou à toxina B.

C.Afinidade de ligação

[000240] A análise de Biacore também foi utilizada para determinar a avidez de ligação de mAbs da invenção às suas respectivas toxinas. O mAb foi capturado utilizando um chip sensor CM5 preparado com kit de captura de anticorpo de camundongo da Biacore. A toxina foi então passada ao longo das células de fluxo em concentrações variáveis (0,4 -100 nM, aumento de duas vezes). Todas as concentrações de toxina foram testadas em duplicata e a superfície do chip foi regenerada após cada corrida utilizando as condições especificadas nos kits. As alterações na UR foram registradas e analisadas utilizando Bia Evaluation Software 1:1 (Langmuir) modelo de ligação que calculava a K_D do mAb para a toxina. Os dados de associação e

dissociação e o ajuste são ilustrados nas **Figs. 3A-E**.

[000241] A K_D dos mAbs para toxina A foi determinada através da análise de Biacore como sendo de 1,0 nM para PA-38, 0,16 nM para PA-39 e 0,16 nM para PA-50. A K_D dos mAbs para toxina B foi determinada como sendo de 2,4 nM para PA-39 e 0,59 nM para PA-41. Estes resultados demonstravam que os mAbs da invenção se ligavam à toxina A e/ou à toxina B com afinidades nanomolares e subnanomolares.

Exemplo 3

Ensaios de neutralização à base de células *in vitro*

[000242] Os ensaios de citotoxicidade à base de células que empregam células CHO-K1 ou células T-84 foram utilizados para avaliar as atividades de neutralização dos mAbs antitoxina A e antitoxina B descritos.

A.Neutralização do efeito citotóxico da toxina A em células CHO-K1

[000243] As células CHO-K1 foram semeadas (2.000 células em 50 µL/poço) nas placas de ensaio (placas de fundo chato translúcidas com parede opaca branca de 96 poços (Perkin Elmer)). Foi permitido que as células se aderissem durante 4 horas antes do tratamento. Volumes iguais (35 µL) de 2 µg/mL de toxina A (List Biological Laboratories) e mAbs diluídos em série foram misturados em placas de diluição de reagente (placas de fundo arredondado de 96 poços (Falcon)) durante 1 hora a 37°C e então 50 µL da mistura foram adicionados em cada poço das placas. Após a incubação durante 72 horas, 20 µL/poço de CellTiter-Blue (Promega) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas durante 4 horas adicionais, então lidas em uma SpectraMax M5 Plate Reader (Molecular Devices) utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. A sobrevivência das células foi comparada em culturas não tratadas e tratadas com toxina.

A porcentagem de sobrevivência das células foi representada graficamente em relação à concentração de mAb. Os dados de inibição foram ajustados à curva de resposta à dose sigmoidal com regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism e a concentração de mAb necessária para 50% de neutralização da citoxicidade (EC_{50}) foi calculada. Como mostrado na **Fig. 4**, mAb PA-39 neutralizava completamente a atividade da toxina A em células CHO-K1 com uma EC_{50} de 93 pM.

B.Neutralização do efeito citotóxico da toxina B em células CHO-K1

[000244] Um ensaio de citotoxicidade CHO-K1 foi utilizado para avaliar a atividade de neutralização de mAbs antitoxina B específicos. Similar à avaliação de mAbs antitoxina A, a toxina B (8 pg/mL, TechLab) foi incubada durante 1 hr a 37ºC com mAbs diluídos em série antes da adição a CHO-K1 (2.000 células/poço) em uma placa de 96 poços. Após 72 horas, 20 µL/poço de CellTiter-Blue (Promega) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas durante 4 horas adicionais e então lidas em uma SpectraMax M5 Plate Reader (Molecular Devices) utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. A viabilidade celular foi determinada utilizando CellTiter-Blue; a sobrevivência das células foi comparada entre culturas tratadas e não tratadas. Os dados de inibição foram ajustados à curva de resposta à dose sigmoidal com regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism e a concentração de mAb necessária para 50% de neutralização da citoxicidade (EC_{50}) foi calculada. Como mostrado na **Fig. 5**, PA-41 demonstrou um alto grau de atividade (uma EC_{50} de 9,2 pM) na neutralização da citotoxicidade da toxina B em células CHO-K1.

[000245] Embora o mAb PA-39 demonstrasse ligação à toxina B com base nas análises de ELISA e Biacore, este mAb não tinha atividade *in*

vitro contra a toxina B em CHO-K1 e outros ensaios à base de células. Os anticorpos que se ligam tanto à toxina A quanto à toxina B, mas não possuem atividade funcional na neutralização da toxina A ou da toxina B em ensaios à base de células *in vitro* foram relatados (46, 92 e 93). A presente invenção abrange um novo mAb que possui a capacidade dual de se ligar tanto à toxina A quanto à toxina B e também de neutralizar a citotoxicidade de uma toxina de *C. difficile*, isto é, a toxina A.

C.Neutralização do efeito citotóxico da toxina A nas células T-84

[000246] Um ensaio de citotoxicidade de T-84 foi utilizado para avaliar a atividade de neutralização dos mAbs descritos antitoxina A. As células T-84 foram semeadas (15.000 células em 50 µL/poço) em placas de ensaio (placas de fundo chato translúcidas com parede opaca branca de 96 poços (Perkin Elmer)). Foi permitido que as células se aderissem durante 4 horas antes do tratamento. Volumes iguais (35 µL) de 240 ng/mL de toxina A (Techlab) e mAbs diluídos em série foram misturados em placas de diluição de reagente (placas de fundo arredondado de 96 poços (Falcon)) durante 1 hora a 37ºC e então 50 µL da mistura foram adicionados em cada poço das placas de ensaio. Após a incubação durante 72 horas, 20 µL/poço de CellTiter-Blue (Promega) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas durante 4 horas adicionais, então lidas em uma SpectraMax M5 Plate Reader (Molecular Devices) utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. A sobrevivência das células foi comparada em culturas não tratadas e tratadas com toxina. Os dados de inibição foram ajustados à curva de resposta à dose sigmoidal com regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism e a concentração de mAb necessária para 50% de neutralização da citoxicidade (EC_{50}) foi calculada. Como mostrado na **Fig. 6**, mAbs PA-

38 e PA-50 neutralizavam completamente a atividade da toxina A nas células T-84 com uma EC_{50} de 175 pM e 146 pM, respectivamente. No ensaio de células T-84, mAb PA-39 demonstrava atividade mínima contra a toxina A e PA-41 não era ativo.

D.Hemaglutinação de células vermelhas do sangue (RBC) de coelho

[000247] A capacidade dos mAbs da invenção de bloquear a ligação da toxina A aos receptores celulares foi avaliada utilizando um ensaio de hemaglutinação. Para este ensaio, volumes iguais de (30 µL/poço) da toxina A (8 µg/mL; TechLab) e mAbs diluídos em série foram misturados em placas de diluição de reagente (placas de fundo arredondado de 96 poços (Falcon)) durante 1 hora a 4ºC. As células sanguíneas vermelhas de coelho (RBC), (Colorado Serum Co., Denver, CO) foram lavadas com PBS três vezes e ressuspensas em PBS. 60 µL de uma suspensão a 1% de RBC foram adicionados nos poços de placas de 96 poços contendo a mistura de toxina A-mAb e as placas foram incubadas a 4ºC durante 4 horas. A toxina A livre causa a hemaglutinação de RBC. Consequentemente, é esperado que a adição de mAb antitoxina A que se liga à toxina A previna a hemaglutinação. A extensão da hemaglutinação foi determinada utilizando um instrumento ImageQuant 400; a hemaglutinação completa forneceu um sinal mais forte comparado com RBC em suspensão. Os valores de EC_{50} foram calculados partindo dos dados de inibição utilizando o ajuste da curva de resposta à dose sigmoidal com regressão não linear GraphPad Prism. Como mostrado na **Fig. 7**, mAb PA-38 (quadrados preenchidos) e mAb PA-50 (triângulos preenchidos) neutralizavam completamente a atividade da toxina A nas RBC com uma EC_{50} de 30 nM e 1,8 nM, respectivamente. PA-38 e PA-50 parecem neutralizar a toxina A através do bloqueio da ligação da toxina A com seu receptor. Foi observado que mAbs PA-39 e PA-41 eram inativos no ensaio.

E. Ensaio em monocamada de Caco-2

[000248] As células caco-2 foram semeadas (25.000 células em 75 µL/poço) na câmara superior das placas Multiscreen Caco-2 de 96 poços (Millipore Billerica, MA) com 250 µL de meio adicionados na câmara inferior. Foi permitido que as células crescessem durante 10 dias com trocas regulares de meio a cada 3-4 dias. Após uma incubação de 10-14 dias, a formação de uma monocamada compacta foi confirmada através da medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) utilizando um voltohmômetro epitelial (modelo: EVOMX, World Precision Instruments, Sarasota, FL). Após a integridade da monocamada ter sido estabelecida e determinada, volumes iguais (60 µL) da toxina A (a 50 ng/mL) e mAb diluído em série foram misturados durante 1 hora a 37ºC e então foram adicionados na câmara superior da placa de ensaio. As placas foram incubadas durante 18-24 horas e então o valor de TEER foi medido utilizando o voltohmômetro. A integridade da monocamada foi comparada nos poços não tratados e tratados com toxina. Como mostrado na **Fig. 8**, os dados de inibição se ajustavam a uma curva de resposta à dose sigmoidal com regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism para determinar a concentração de mAb necessária para 50% de neutralização (EC_{50}). Os mAbs PA-38 e PA-50 neutralizavam a interrupção de monocamadas de Caco-2 pela toxina A com uma EC_{50} de 485 pM e 196 pM, respectivamente. Foi observado que os outros mAbs era inativos neste ensaio.

[000249] Embora não seja desejado estar ligado à teoria, os resultados *in vitro* baseados em células demonstram que PA-38 e PA-50 parecem representar uma classe de mAbs antitoxina A, enquanto PA-39 representa outra classe de mAbs antitoxina A. Os mAbs PA-38 e PA-50 parecem se ligar a um epítopo da toxina A importante para a ligação ao receptor; o mAb PA-39 parece se ligar à toxina de uma

maneira que bloqueia mais diretamente os efeitos citotóxicos da toxina A *in vitro*.

Exemplo 4

Avaliação da eficácia *in vivo* de mAbs antitoxina A e toxina B de *C. difficile* da invenção em camundongos

[000250] Um modelo de camundongo *in vivo* foi utilizado para medir a capacidade dos mAbs descritos aqui de neutralizar toxinas de *C. difficile* circulantes em um animal. As atividades de neutralização *in vivo* dos mAbs PA-38, PA-39, PA-41 ou PA-50, administrados isoladamente ou em combinações, foram testadas contra os efeitos de toxina A e toxina B de *C. difficile* sistêmicas combinadas (Techlab) em animais de teste.

[000251] Fêmeas de 4-6 camundongos Swiss Webster/grupo (idade: ~6-8 semanas no início do estudo; Charles River Laboratories) foram utilizadas nos experimentos. Os camundongos foram aclimatados na unidade durante um mínimo de 4 dias e a saúde dos animais foi verificada antes do uso. Os experimentos com animais foram conduzidos sob o protocolo aprovado por IACUC.

[000252] Os experimentos iniciais foram realizados para determinar a toxicidade da toxina A e da toxina B em camundongos. Os animais receberam dose a 0, 20, 100, 500, 2500 ng de toxina/animal de forma intraperitoneal (i.p.) e uma dose que era letal para os animais foi selecionada para uso nos experimentos de neutralização de anticorpos subsequentes. Os camundongos de controle injetados com PBS não foram afetados. Uma dose de 100 ng da toxina A (TechLab) foi selecionada para os experimentos de neutralização, uma vez que esta era o nível de dose menor observado como sendo letal a 100% dos camundongos dentro de 24 horas após a injeção. Similarmente, uma dose de 100 ng da toxina B (TechLab) foi selecionada para os experimentos de neutralização, uma vez que era o nível de dose

menor observado como sendo letal para 100% dos camundongos dentro de 24 horas após a injeção.

[000253] Para avaliar a atividade de neutralização dos mAbs antitoxina, uma única injeção de cada mAb em níveis de doses diferentes foi administrada i.p. aos camundongos (5 por grupo) no dia 0, seguida pela administração i.p. de 100 ng/200 □L da toxina A ou da toxina B no dia 1. Os animais foram observados diariamente durante três dias e então semanalmente durante até 21 dias após a administração da toxina. A sobrevivência dos animais era o ponto final primário do estudo.

[000254] Para os experimentos de neutralização, todas as doses de anticorpo foram formuladas em PBS sem cálcio ou magnésio (PBS-, Invitrogen, Carlsbad, CA)**.** Uma única injeção de mAb PA-38, PA-39, PA-41 ou PA-50 em níveis de dose diferentes foi administrada i.p. (200 □l/dose/animal) aos camundongos no dia 0, seguida pela injeção da toxina (i.p. em um sítio diferente do sítio de injeção do anticorpo) no dia 1. A condição de saúde dos animais foi monitorada diariamente durante os primeiros 3-4 dias e então duas vezes por semana durante até 21 dias após a administração da toxina. As observações ao lado das gaiolas dos animais (por exemplo, postura arqueada, pelagem opaca, inatividade) foram registradas, bem como a sobrevivência.

[000255] Níveis de doses diferentes de PA-38 (0,2 μg até 250 μg por animal) e PA-50 (0,2 μg até 100 μg por animal) foram avaliados. Neste modelo, foi observado que PA-38 e PA-50 neutralizavam uma dose de 100 ng da toxina A e possibilitavam 100% de sobrevivência em níveis de doses tão baixos quanto 2 μg de mAb por animal como mostrado nas **Figs. 9A e B**. Em contraste, um anticorpo humano monoclonal comparador antitoxina A (WO/2006/121422 e US2005/0287150), referido aqui como mAb comparador CDA-1, a 5 μg por animal, não protegia os animais da morte relacionada com a toxina como faziam os

mAbs da invenção (**Fig. 9C**). As doses de PA-41 variando de 0,5 µg até 250 µg foram avaliadas e foi observado que uma única dose de 5 µg de mAb por animal neutralizavam completamente uma dose de 100 ng da toxicidade da toxina B em animais como mostrado na **Fig. 10**. Não foi observado que o MAb PA-39 (100 µg por animal) fornecia um retardo na morte relacionada com a toxina dos camundongos para a toxina A ou B.

[000256] Após a atividade de neutralização de anticorpos individuais contra a toxina A (PA-38, PA-50) ou contra a toxina B (PA-41) ter sido claramente demonstrada *in vivo*, um experimento foi realizado para testar a combinação dos mAbs (PA-38 + PA-41) em níveis de doses de 5 e 50 µg de cada mAb contra uma dose letal combinada de toxinas (100 ng da toxina A e 100 ng da toxina B) no mesmo modelo de camundongo *in vivo*. Em adição, os anticorpos monoclonais individuais foram incluídos como controles. Como mostrado na **Fig. 11**, uma combinação dos mAbs PA-38 e PA-41 mostravam proteção da combinação de toxinas tanto a 50 µg/animal (4 de 5 sobreviveram) quanto a 5 µg/animal (1 de 5 sobreviveu) comparada com a atividade de cada mAb isoladamente (todos os animais morreram dentro de 24 horas da administração de toxina).

Exemplo 5

Avaliação de mAbs antitoxina A e toxina B de *C. difficile* da invenção no modelo de diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) em hamsters Golden Syrian

[000257] O modelo de CDAD em hamsters reproduz os aspectos chaves da doença CDAD em humanos. Após o tratamento com antibióticos, a flora colônica normal é erradicada e os hamsters se tornam mais rapidamente suscetíveis à infecção por *C. difficile*. A infecção resulta em diarreia grave, colite pseudomembranosa e morte. O modelo de CDAD de hamster foi utilizado para avaliar a eficácia

potencial dos mAbs da invenção para prevenir doença e morte associadas com o desafio de animais de bactérias *C. difficile* vivas. Estes experimentos foram conduzidos sob os protocolos aprovados por IACUC.

A. Análise farmacocinética

[000258] Antes de realizar o estudo de eficácia no modelo de hamster utilizando hamsters infectados com microorganismos *C. difficile* vivos, um estudo da farmacocinética foi realizado em hamster não infectados normais. Hamsters Golden Syrian (Harlan) receberam injeção de forma intraperitoneal com 0,2 mg/animal ou 1 mg/animal de mAb PA-38 ou mAb PA-41 purificado. As amostras de sangue foram coletadas através de técnicas de extração de sangue por perfuração retroorbital ou cardíaca (terminal) em 0,125, 0,25, 1, 2, 4, 7, 10, 14 e 21 dias. As amostras de sangue foram centrifugadas a 8000 rpm durante 10 minutos para obter o soro.

[000259] A concentração de mAb no soro foi determinada através de ELISA. Placas de ELISA de noventa e seis poços (BD Biosciences) foram revestidas durante a noite com toxina A (Techlab) ou toxina B (Techlab) a 250 ng/poço a 4ºC. As placas foram lavadas três vezes com PBS/0,05% de Tween-20® (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL de tampão de bloqueio (PBS sem cálcio ou magnésio, 0,1% de Tween 20®, 2,5% de leite desnatado) durante uma hora à temperatura ambiente. O padrão de referência de anticorpo (mAb PA-38 ou mAb PA-41 purificado) foi diluído em 1% de soro de hamster naive agrupado para gerar uma curva padrão com uma faixa de 0,3-1000 ng/mL. As amostras de teste diluídas e os padrões foram incubados durante uma hora à temperatura ambiente.

[000260] As placas foram lavadas (como anteriormente) e incubadas durante uma hora à temperatura ambiente com IgG anticamundogo de caprino conjugada com HRP, específica para Fc□ (Jackson

Immunoresearch). As placas foram reveladas com o sistema de substrato de ABTS peroxidase (KPL), interrompido com a solução de término de ABTS peroxidase (KPL) e lidas em uma leitora de placas SpectraMax (Molecular Devices) a 405 nm. A concentração de mAb em cada hamster em pontos de tempo diferentes foi calculada utilizando as curvas padrões. Aproximadamente 10% das amostras não tinham título de anticorpo, provavelmente devido a uma injeção perdida ou nenhuma absorção; estas amostras não foram incluídas no cálculo dos parâmetros de PK. A análise farmacocinética não compartimental foi realizada utilizando WinNonLin, Versão 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA) e os dados são ilustrados na Tabela 1 e nas **Figs. 12A e B**. Como indicado, Cmax e área sob a curva (AUC) erem dependentes da dose. Cada um dos anticorpos demonstrava uma meia-vida terminal maior que 6 dias, que garantia a retenção do anticorpo nos estudos de eficácia descritos aqui abaixo.

Tabela 1. Parâmetros de PK de mAbs em hamsters

mAb	AUC_{INF_obs} (dia*µg/mL)	Tmax (dia)	Cmax (µg/mL)	Meia vida$_{\lambda}$ (dia)	Rsq
PA-38 2mg/kg	303,8	2,00	25,2	7,4	0,999
PA-38 10mg/kg	1522,6	0,25	128,0	10,6	0,988
PA-41 2mg/kg	202,2	0,25	20,5	6,2	1,000
PA-41 10mg/kg	696,7	1,00	78,1	6,8	1,000

B. Avaliação de mAbs antitoxina A e toxina B de *C. difficile* da invenção, em combinação, no modelo de diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) em hamsters Golden Syrian

[000261] Um experimento de eficácia foi realizado para avaliar os mAbs antitoxina A e antitoxina B murinos da invenção em relação a sua capacidade de afetar a capacidade de sobrevivência de animais infectados em um model de diarreia associada a *C. difficile in vivo* em hamsters. Machos de hamsters Golden Syrian (~90g) (Crl:LVG(SYR)), (Charles River Laboratories, Inc., Kingston, NY) foram pré-tratados com uma única dose subcutânea de clindamicina (Sigma, St. Louis, formulada em PBS a 5 mg/mL) a 50 mg/kg para perturbar a flora colônica normal. No dia seguinte, os hamsters nos grupos de teste relevantes receberam uma dose oral (1 x 10^7 UFC em 0,5 mL) de uma suspensão de *C. difficile* (ATCC 43596 cepa). A cepa 43596 foi previamente utilizada em modelos de hamster para a avaliação dos anticorpos de neutralização. Os animais foram pesados semanalmente e monitorados diariamente em relação à condição de saúde e à sobrevivência.

[000262] Os anticorpos de teste compreendiam combinações dos mAbs murinos da invenção, isto é, uma combinação de mAbs PA-38 e PA-41 ou uma combinação de mAbs PA-39 e PA-41. Os anticorpos de caprino antitoxina A e toxina B de *C. difficile* policlonais (Techlab) foram incluídos como um controle positivo. Os mAbs e reagentes de controle foram administrados como descrito na Tabela 2**.**

Tabela 2. Grupos de tratamento no estudo de eficácia em hamster.

Grp	Tratamento	Dose (mg/kg)	Rota	Programação	Nº de hamsters
1	Não infectado	NA*	NA	NA	4
2	Não infectado+ clindamicina	NA	NA	NA	4
3	Controle infectado	NA	NA	NA	8

Grp	Tratamento	Dose (mg/kg)	Rota	Programação	Nº de hamsters
4	Vancomicina	20	PO	BID X 5 dias	8
5	Abs policlonais de caprino	1 mL/hamster	IP	Q2d X 4	8
6	PA-38 + PA-41	50, 50	IP	Q2d X 4	8
7	PA-39 + PA-41	50, 40	IP	Q2d X 4	8

*Não Aplicável.

[000263] Os hamsters no Grupo 1 não receberam tratamento ao longo de todo o estudo. Os hamsters nos Grupos 2-7 foram pré-tratados com uma única dose subcutânea de fosfato de clindamicina a 50 mg/kg (Dia -1). Os hamsters nos Grupos 5-7 receberam dose com os anticorpos caprinos policlonais (Grupo 5) ou com as combinações de mAb (Grupos 6 e 7) como apresentado na Tabela 2 através de administração i.p. imediatamente após o tratamento com clindamicina. Após 24 horas, cada hamster nos Grupos 3-7 foi inoculado com 0,5 mL da suspensão apropriada de *C. difficile* ATCC 43596 (10^6-10^7 UFC/mL) via ingestão oral forçada (dia 0). Após o tratamento inicial com os anticorpos no dia -1, os três tratamentos subsequentes para estes grupos foram administrados em dias alternados, uma vez ao dia, nos dias 1, 3 e 5. A vancomicina (20 mg/kg BID) foi administrada via ingestão oral forçada aos animais no Grupo 4 duas vezes ao dia, aproximadamente 6 horas separadas nos dias 1-5. A administração de vancomicina (animais do Grupo 4) começou aproximadamente 20-24 horas após os animais terem sido inoculados com *C. difficile*.

[000264] Os resultados de sobrevivência para os grupos tratados com mAb e de controle são ilustrados na **Fig. 13**. Um resumo da mortalidade de hamster para todos os grupos é apresentado na Tabela

3. Foi observado que todos os hamsters infectados com *C difficile* sem qualquer tratamento (controle infectado, Grupo 3) morriam no dia 2 ou dia 3 do estudo. No grupo tratado com vancomicina (Grupo 4), sete de oito hamsters foram encontrados mortos entre os dias 15 e 19. Como é tipicamente observado neste modelo, a maioria (88%) dos hamsters tratados com vancomicina sofriam reincidência e morriam de infecção causada por *C. difficile* dentro de duas semanas após a descontinuação da terapia. Em contraste, todos os hamsters tratados com a combinação de mAbs PA-39 + PA-41 (Grupo 7) e 7 de 8 hamsters tratados com a combinação de mAbs PA-38 + PA-41 (Grupo 6), sobreviveram até o final do estudo (37 dias pós-infecção). Em adição, no final do estudo, todos os animais no grupo tratado com anticorpos policlonais caprinos (Grupo 5) estavam vivos. Todos os hamsters sobreviventes tinha tratos GI normais na necropsia *post mortem* (ver as **Figs. 15A, C e D**).

Tabela 3. Taxa de mortalidade e dia da morte do hamster em cada grupo

Grp	Tratamento	Nº de animais	% de mortalidade	Dia do estudo							
				2	3	5	7	15	18	19	37
1	Não infectado	4	0								
2	Não infectado+ Clindamicina	4	50			1	1				
3	Controle infectado	8	100	5	3						
4	Vancomicina	8	88					1	5	1	
5	Abs policlonais de caprino	8	0								
6	PA-38 + PA-41	8	13		1						
7	PA-39 + PA-41	8	0								

[000265] Estes resultados indicam que a combinação de mAbs PA-39 e PA-41 e a combinação de mAbs PA-38 e PA-41 eficientemente e

de forma durável protegia os hamsters da doença grave, tanto inicialmente quanto de reincidência subsequente da doença. A duração do benefício do tratamento com mAb (37 dias) excedia significativamente a janela (duas semanas) para o estabelecimento da infecção causada por *C. difficile* após o tratamento com clindamicina no modelo de hamster.

[000266] Os pesos corporais dos animais nos grupos tratados com policlonais e mAbs e nos grupos de controle são ilustrados na **Fig. 14**. Os hamsters no grupo de controle não infectado (Grupo 1) ganhavam peso regularmente, variando de 13-29 g ao longo do curso do estudo. Todos os animais infectados de controle morreram antes da primeira medida de peso pós-inoculação. Os pesos corporais médios dos animais tratados com vancomicina, anticorpos policlonais caprinos, a combinação mAb PA-38 + PA-41 e a combinação mAb PA-39 + PA-41 diminuíam significativamente durante o primeiro semana após infecção. Depois disso, os pesos corporais médios nos grupos tratados com mAb, bem como no grupo tratado com anticorpo policlonal, aumentavam regularmente e eram similares aqueles do controle não infectado até o final do estudo, indicando que não havia toxicidade evidente.

[000267] De forma geral neste estudo com hamster, foi demonstrado que as combinações de mAbs da invenção eficientemente e de forma durável protegiam os hamsters da mortalidade em um modelo de hamster relevante e rigoroso de infecção causada por *C. difficile*. Estas descobertas sustentam um mecanismo através do qual as combinações de mAb protegiam os animais de doença causada por *C. difficile* durante um período de tempo longo o suficiente para permitir o crescimento e a repopulação da flora intestinal normal nos animais tratados com mAb comparados com os animais não infectados (**Figs. 15A-D**). Assim, os mAbs da invenção forneciam proteção terapêutica

para os animais infectados e efetuavam a resolução da doença associada a *C. difficile*, a restauração da saúde gastrointestinal e a sobrevivência.

Avaliação de mAbs antitoxina A e/ou toxina B de *C. difficile* individuais da invenção no modelo de diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) em hamsters Golden Syrian

[000268] Um estudo adicional em hamsters foi realizada para avaliar a eficácia de mAbs murinos individuais da invenção administrados a animais infectados comparada com aquela dos mAbs administrados em combinação. Os grupos de tratamento para este estudo são presentados na Tabela 4.

Tabela 4. Estudo da eficácia em hamster dos mAbs individuais comparados com uma combinação de mAbs

Grp	Tratamento	Dose (mg/kg)	Rota	Programação	Nº de hamsters
1	Controle infectado	NA[1]	NA	NA	7
2	Vancomicina	20	PO	BID X 5 dias	7
3	PA-39 + PA-41	50, 50	IP	Q2d X 4	7
4	PA-41	50	IP	Q2d X 4	7
5	PA-38	50	IP	Q2d X 4	7
6	PA-39	50	IP	Q2d X 4	7
7	PA-50	50	IP	Q2d X 4	7

[1]Não Aplicável.

[000269] Neste estudo, os hamsters nos Grupos 1-7 foram pré-tratados com uma única dose subcutânea de fosfato de clindamicina a 50 mg/kg (dia –1). Os animais nos Grupos 3-7 receberam dose com mAbs por administração i.p. imediatamente após o tratamento com clindamicina. Após 24 horas, cada hamster nos Grupos 1-7 foi inoculado com 0,5 mL da suspensão de *C. difficile* via ingestão oral

forçada (dia 0), como descrito na Seção B, *supra*. Os tratamentos com mAb de teste foram administrados aos animais nos Grupos 3-7 em uma única dose nos dias 1, 3 e 5. A vancomicina foi administrada aos animais duas vezes ao dia nos dias 1-5 (Grupo 2). Os hamsters foram observados duas vezes ao dia em relação à viabilidade. Os pesos corporais foram registrados uma vez por semana. Uma necropsia foi realizada nos animais que foram encontrados mortos ou que sofreram eutanásia durante o estudo. No final do estudo (40 dias após a inoculação), uma necropsia terminal foi realizada em todos os hamster remanescentes.

[000270] A sobrevivência dos grupos de animais tratados com mAb e de controle é representada na **Fig 16A e** o dia da morte para os hamsters em todos os grupos é resumido na Tabela 5.

Tabela 5. Dados de mortalidade e dia da morte

Grp	Tratamento	Nº de hams-ters	% de mortalidade	Dia do estudo										
				2	3	4	8	11	12	14	15	18	19	40
1	Controle infectado	7	100	7										
2	Vancomicina	7	100						1	2	1	1	2	
3	PA-39 + PA-41	7	14						1					
4	PA-41	7	100	6	1									
5	PA-38	7	100	5	2									
6	PA-39	7	100	1	1	1	2	1	1					
7	PA-50	7	100	3	4									

[000271] No grupo de controle infectado (Grupo 1), todos os sete

hamsters foram encontrados mortos no dia 2. Todos estes hamsters tinham tratos GI inflamados no exame *post mortem*. No grupo tratado com vancomicina (Grupo 2), todos os sete hamsters morreram entre os dias 12 e 19 do estudo. O sincronismo destas mortes foi similar ao sincronismo que foi observado anteriormente com tratamento com vancomicina neste modelo. O exame *post mortem* indicou que todos os hamsters tinham tratos GI inflamados, indicativo de infecção causada por *C. difficile*.

[000272] O tratamento combinado com PA-39 + mAb PA-41 (Grupo 3) foi muito eficiente em proteção dos hamsters infectados neste estudo. Seis dos sete hamsters no Grupo 3 sobreviveram ao final do estudo. Um hamster foi encontrado morto no dia 12 do estudo. O exame *post mortem* indicou que este hamster tinha um trato GI inflamado, típico de infecção causada por *C. difficile*.

[000273] Dentre os tratamentos com um único anticorpo (Grupos 4-7), mAb PA-39 isoladamente (Grupo 6) exibiu alguma atividade protetora em animais tratados. Hamsters neste grupo foram encontrados mortos nos dias 2 a 12. Nos grupos tratados com os mAbs individuais, PA-41 (Grupo 4), PA-38 (Grupo 5) ou PA-50 (Grupo 7), os hamsters foram encontrados mortos nos dias 2 e 3. Na necropsia final, todos os hamsters nestes grupos tinham tratos GI inflamados, que é indicativo de infecção causada por *C. difficile*. Em contraste, todos os hamsters tratados que sobreviveram tinham tratos GI normais.

[000274] Os resultados deste estudo indicam que tratamento com a combinação de mAb PA-39 + PA-41 protegeu com sucesso os hamsters contra desenvolvimento de doença durante mais de um mês após término de tratamento e são os mesmos conforme aqueles obtidos no estudo descrito acima do Exemplo 5B, no qual oito de oito hamsters tratados com a combinação de PA-39 + PA-41 sobreviveram

à infecção causada por *C. difficile*. Neste estudo, mAb PA-39, como um tratamento com um único mAb, exibiu alguma atividade em proteção de hamsters infectados com *C. difficile* contra doença causada por *C. difficile*.

D. Determinação de concentrações de anticorpo a partir de sangue terminal e avaliação da existência de *C. difficile* em amostras terminais de cecos de hamster

[000275] Sangue foi coletado de animais que estavam moribundos durante o estudo. Ao final do estudo, sangue foi também coletado de todos os animais que ficaram vivos. As amostras de sangue foram processadas para coletar o soro, a menos que de outro modo mencionado abaixo. As amostras processadas foram congeladas a <-70ºC para possível análise adicional.

[000276] Após os estudos de eficácia *in vivo* em hamster descritos anteriormente, a presença de mAbs foi examinada em coletas de sangue terminais de animais nos estudos. Para o estudo com combinação de mAb descrito no Exemplo 5B, coleta de sangue de oito dos animais do Grupo 7, que tinham recebido uma dosagem (Q2d x 4) de uma combinação de mAb PA-39 (50 mg/kg) + mAb PA-41 (40 mg/kg), foi realizada terminalmente no dia 37 do estudo. Em soro coletado desta coleta de sangue terminal, PA-39 foi detectado em um nível de 3,3 ± 3,4 µg/mL e PA-41 foi detectado em um nível de 2,4 ± 1,7 µg/mL. Para o estudo com mAb individual descrito no Exemplo 5C, coleta de sangue de seis dos animais no Grupo 3, os quais tinham recebido uma dosagem (Q2d x 4) de uma combinação de mAb PA-39 (50 mg/kg) + mAb PA-41 (50 mg/kg), foi realizada terminalmente no dia 40 do estudo e a amostra de sangue foi processada para obter o plasma. Em plasma coletado desta coleta de sangue terminal, PA-39 foi detectado em um nível de 1,8 ± 1,4 µg/mL e PA-41 foi detectado em um nível de 3,4 ± 3,2 µg/mL. O limite de detecção de anticorpo

nestas análises foi de 1,6 ng/mL. Assim, níveis detectáveis de mAbs foram medidos nos animais durante um período de várias semanas. Isto sustenta um modo de ação em que estes mAbs conferem um benefício terapêutico durante o curso de um regime de tratamento e após as últimas doses dos mAbs serem administradas.

[000277] Na necropsia terminal do Grupo 3 no Exemplo 5C, o ceco de cada hamster foi exposto e cada um parecia normal. Nenhuma inflamação ou vermelhidão foi observada e os conteúdos dos cecos eram de consistência relativamente firme. A parede de cada ceco foi cortada com um bisturi descartável estéril. Um novo bisturi foi utilizado para cada hamster a fim de evitar contaminação cruzada. Uma pequena quantidade de fezes foi removida de cada ceco com um cotonete estéril e colocada em um tubo de ensaio estéril. Um *loop* de inoculação de 10 □L foi utilizado para coletar uma amostra das fezes do tubo e depositar em listras a amostra sobre uma lâmina de agar contendo CCFA com meio de sangue de cavalo (Remel, Lote 735065), que é seletivo para *C.* difficile. As lâminas foram colocadas em uma câmara anaeróbica e incubadas durante 48 horas a 37 ºC. Uma lâmina foi recebeu uma listra de *C. difficile* ATCC 43596 da cultura de estoque e incubada com as listras fecais para comparação de colônia. Colônias parecendo *C. difficile* foram observadas sobre as placas de todos os seis hamsters. Os resultados destes experimentos indicam que, embora os animais sobreviventes tratados com mAbs da invenção ainda tivessem *C. difficile*, sua flora normal tinha sido povoada novamente de modo a restaurar o equilíbrio microbiano do intestino normal, o qual contribui para sua sobrevivência global.

E. Avaliação de mAbs humanizados antitoxina A e/ou toxina B de *C. difficile* no modelo de diarreia associada a *C. difficile* (*C. Difficile*-Associated Diarrhea - CDAD) em hamsters Golden Syrian

[000278] Um outro estudo em hamsters foi conduzido para avaliar a

eficácia *in vivo* de uma combinação dos mAbs humanizados antitoxina A e mAbs antitoxina B da invenção comparado com aquela de uma combinação de mAb antitoxina A humana comparativo, CDA-1, e mAb antitoxina B humano comparativo, CDB-1, quando as respectivas combinações de anticorpo foram administradas a animais infectados com *C. difficile*. Os grupos de tratamento para este estudo são apresentados na Tabela 5A.

Tabela 5A. Grupos de tratamento no estudo comparativo de eficácia em hamster.

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Esquema	Nº de Hamsters
1	Controle não infectado	NA[1]	NA	NA	4
2	Controle infectado	NA	NA	NA	8
3	Vancomicina	20	BID	BID X 5 dias	8
4	hPA-41 + hPA-50	50, 50	IP	Q2d X 4	10
5	hPA-41 + hPA-50	20, 20	IP	Q2d X 4	10
6	CDA-1 + CDB-1	50, 50	IP	Q2d X 4	10
7	CDA-1 +CDB-1	20, 20	IP	Q2d X 4	10

[1]Não Aplicável.

[000279] Os anticorpos de teste compreendiam combinações dos mAbs humanizados da invenção, isto é, uma combinação de mAb antitoxina A humanizado PA-50 e mAb antitoxina B humanizado PA-41 (hPA-41 + hPA-50) ou uma combinação de mAb antitoxina A humano comparativo referido como mAb CDA-1 comparativo e mAb antitoxina B humano comparativo referido como mAb CDB-1 comparativo (CDA-1 + CDB-1) nas quantidades indicadas na Tabela 5A. Os mAbs comparativos foram sintetizados (DNA2.0) com base nas regiões de cadeias pesada e leve publicadas de 3D8 e 124, (documentos

WO2006/121422 e US2005/0287150), clonados em vetores de expressão de IgG1 de comprimento total (pCON-gama e pCON-kappa), expressos em células CHO-KSV1 e purificados utilizando os métodos descritos aqui. Os tratamentos com combinações de mAb e de controle foram administrados conforme descrito na Tabela 5A.

[000280] Os métodos de tratamento foram essencialmente conforme descrito para a Parte B deste Exemplo, *supra***.** Resumidamente, hamsters Golden Syrian (Charles River Laboratories, Stone Ridge, NY, 50 dias de idade) foram utilizados neste estudo do Exemplo 5E. Os hamsters no Grupo 1 de controle não estavam infectados (e não tratados). Os animais nos Grupos 2-7 foram pré-tratados com uma única dose subcutânea de fosfato de clindamicina a 50 mg/kg até ruptura da flora colônica normal (Dia -1). Os animais nos Grupos 4-7 receberam a dose através de administração IP imediatamente após o tratamento com clindamicina. Após 24 horas, cada animal nos Grupos 2-7 foi inoculado com 0,5 mL de suspensão de *C. difficile* (ATCC 43596, cepa 545) via ingestão oral forçada (Dia 0), (isto é, dose oral). Administrações adicionais dos tratamentos de teste foram fornecidas aos animais nos Grupos 4-7 em uma única dose nos dias 1, 3 e 5. Vancomicina foi administrada aos animais do Grupo 3 duas vezes ao dia, com intervalo de aproximadamente 6 horas, nos dias 1-5. Os animais foram pesados semanalmente e monitorados diariamente com relação ao estado de saúde e sobrevivência durante 39 dias. Necropsia foi realizada no final e titulações cecais de micro-organismos *C. difficile* foram determinadas após cultura anaeróbica a 37°C durante 48 horas em meio seletivo. O limite de detecção foi de 20 CFU/g de conteúdo cecal. Este estudo e os estudos com hamster descritos acima foram realizados na Ricerca Biosciences (Concord, OH) de acordo com as diretrizes do Institutional Animal Care and Use Committee.

[000281] Resultados de sobrevivência para os grupos tratados com mAb e controle são ilustrados na **Fig. 16B-1**. Dados de mortalidade para o estudo são apresentados na Tabela 5B abaixo. Um sumário da sobrevivência dos hamsters é apresentado na Tabela 5C abaixo.

Tabela 5B. Dados de mortalidade e dia de morte dos hamsters em cada grupo

Grupo	Tratamento	N° de animais	% mortalidade	Dia de estudo							
				2	3	5	8	11 a 14	18 a 20	22	30
1	Controle não infectado	4	0								
2	Controle infectado	8	100	7	1						
3	Vancomicina	8	100					1	5	2	
4	hPA-50 + hPA-41 50, 50 mg/kg	10	10				1				
5	hPA-50 + hPA-41 20, 20 mg/kg	10	0								
6	Comparativo CDA-1 + CDB-1 50, 50 mg/kg	10	100			1		8			1
7	Comparativo CDA-1 + CDB-1 20, 20 mg/kg	10	100			2		8			

[000282] Conforme observado na Tabela 5B, todos os 4 hamsters de controle não infectados (Grupo 1) sobreviveram ao final do estudo. Todos os animais de controle infectados (Grupo 2) morreram nos dias 2 e 3. No grupo tratado com vancomicina (Grupo 3), todos os animais de estudo morreram entre os dias 13 e 22. Para o Grupo 4 com hPA-

50 + hPA-41 (50, 50 mg/kg), nove de dez animais sobreviveram ao final do estudo. Um hamster deste grupo foi encontrado moribundo no dia 8, com descoloração vermelha do trato GI, enquanto que os nove animais sobreviventes restantes neste grupo tinham tratos GI normais. Todos os dez hamsters no Grupo 5 sobreviveram ao final do estudo com tratos GI normais. Nos grupos com mAb comparativo, nove de dez animais dosados com 50 mg/kg (Grupo 6) morreram entre os dias 5 e 14; um animal morreu no dia 28 do estudo. Todos os dez hamsters tratados com 20 mg/kg da combinação de mAb comparativo (Grupo 7) morreram entre os dias 5 e 14 do estudo.

Tabela 5C. Sobrevivência mediana e global de animais tratados com mAbs humanizados da invenção e mAbs comparativos

Grupo/ Tratamento	Dose (mg/kg)	Sobrevivência mediana (Dias)	Sobrevivência Dia 40 (%)
Grupo 1 Não infectado	NA*	40	100
Grupo 2 Infectado	NA*	2	0
Grupo 3 Vancomicina	20	20	0
Grupo 4 hPA-50 + hPA-41	50, 50	NA	90
Grupo 5 hPA-50 + hPA-41	20, 20	NA	100
Grupo 6 CDA-1 + CDB-1	50, 50	14	0
Grupo 7 CDA-1 + CDB-1	20, 20	11	0

* Não Aplicável;

[000283] Conforme observado na Tabela 5C, todos os quatro animais no Grupo 1 de controle não infectado sobreviveram ao final do estudo (40 dias). Todos os hamsters infectados com *C. difficile* sem qualquer tratamento (controle infectado, Grupo 2) tinham uma sobrevivência mediana de 2 dias; nenhum animal neste grupo sobreviveu ao final do estudo. No grupo tratado com vancomicina (Grupo 3), a sobrevivência média foi de 20 dias, sem nenhum animal sobrevivente no dia 40. Ambos os tratamentos combinados com mAb hPA-50 + hPA-41 foram eficientes em proteção de animais infectados neste estudo (Grupos 4 e 5). Todos (100%) os hamsters tratados com a combinação de mAbs humanizados PA-50 + PA-41 (20 mg/kg cada; Grupo 5) e 90% dos hamsters tratados com a combinação de mAbs humanizados PA-50 + PA-41 (50 mg/kg cada; Grupo 4), sobreviveram ao final do estudo (40 dias pós-infecção). Todos os hamsters sobreviventes tinham tratos GI essencialmente normais na necropsia *post mortem*. Em contraste, a sobrevivência média de animais que receberam uma combinação dos mAbs antitoxina A e antitoxina B comparativos foi similar para ambas as doses de mAbs comparativos; todos os animais morreram nos dois grupos tratados com as combinações de mAb comparativos. Especificamente, para animais que receberam a combinação CDA-1 + CDB-1 (50 mg/kg cada; Grupo 6), a sobrevivência média foi de 14 dias enquanto que, para animais que receberam a combinação CDA-1 + CDB-1 (20 mg/kg cada; Grupo 7), a sobrevivência média foi de 11 dias.

[000284] Avaliações adicionais no estudo incluíam medições de peso corporal, necropsia macroscópica e titulação cecal de micro-organismos *C. difficile* ao término do estudo. Os pesos corporais médios de animais tratados com vancomicina ou a combinação de PA-50/PA-41 diminuíram durante a primeira semana pós-infecção e, então, foram recuperados (**Fig. 16B-2**). No dia 39, o peso corporal

médio de animais tratados com a combinação PA-50/PA-41 era similar àquele de animais saudáveis, não infectados que foram alojados em paralelo (P > 0,05). Os pesos corporais médios de animais tratados com a combinação de anticorpos CDA1/CDB1 comparativos declinaram regularmente durante o estudo.

[000285] No dia 39, os tratos gastrintestinais dos 19 animais sobreviventes tratados com a combinação PA-50/PA-41 pareciam similares àqueles de animais não infectados; e as titulações cecais de *C. difficile* eram indetectáveis (<1,3 $\log_{10}$ CFU, n = 11) ou baixas (4,15 ± 0,76 $\log_{10}$ CFU, n = 8). Em contraste, tratos gastrintestinais inflamados foram observados em alguns ou todos os animais nos outros grupos de tratamento no momento da morte. *C. difficile* foi detectado em 4 de 4 animais não tratados (CFU média = 8,96 ± 0,59 $\log_{10}$, P < 0,0001 com relação ao PA-50/PA-41) e 4 de 4 animais tratados com vancomicina (CFU média = 6,01 ± 0,93 $\log_{10}$, P < 0,017 com relação ao PA-50/PA-41) para os quais análises cecais foram realizadas. A maioria dos hamsters tratados com a combinação de anticorpo CDA1/CDB1 comparativo tinham pouco a nenhum conteúdo cecal, o que impediu análise quantitativa das titulações de *C. difficile*.

[000286] Para análises estatísticas neste estudo e nos estudos acima, dados de neutralização foram adaptados a uma equação logística com quatro parâmetros utilizando o GraphPad Prism (v. 4.0 GraphPad Software, San Diego, CA). t testes bilaterais foram utilizados para comparação de médias ou dados de sobrevivência, respectivamente.

[000287] Os resultados do estudo indicam que tratamento de animais infectados com C. difficile com a combinação dos mAbs humanizados PA-50 e PA-41 em ambos os níveis de dose protegeu eficiente e duravelmente os hamsters contra doença grave, inicialmente e contra subsequente reincidência da doença. A duração de benefício por

tratamento com a combinação de mAb humanizado mAb (40 dias) melhorou significativamente a sobrevivência de animais a longo prazo comparado com tratamento com vancomicina ou mAbs antitoxina A e antitoxina B comparativos como controles.

[000288] Conforme evidenciado pelos estudos com animais in vivo, tratamento combinado com uma combinação de mAbs humanizados PA-50/PA-41 foi altamente eficaz contra infecção causada por C. difficile no modelo com hamster Golden Syrian bem estabelecido para CDI e terapia. Um breve curso de tratamento com PA-50/PA-41 resultou em sobrevivência de 95% a 39 dias pós-infecção, comparado com sobrevivência de 0% para animais que não tinham recebido tratamento, terapia padrão com antibiótico ou mAbs comparativos. A 39 dias pós-infecção, animais tratados com PA-50/PA-41 tinham pesos normais e nenhuma lesão gastrintestinal evidente. C. difficile não pôde ser recuperado da maioria dos animais, refletindo uma eliminação >7-$\log_{10}$ com relação aos animais não tratados. Uma provável explicação para estas descobertas é que neutralização de toxinas mediada por mAb na ausência de antibióticos permitiu que uma flora microbiana protetora se tornara restabelecida no trato gastrintestinal dos animais.

[000289] Foi reportado que toxina A ou toxina B isoladamente era capaz de causar doença fatal no modelo de CDI com hamster e mAbs a ambas as toxinas são geralmente necessários para eficácia máxima de tratamento. Nos estudos descrito supra, mAbs de murino PA-50 e PA-41 não mostraram benefício para a sobrevivência quando utilizados individualmente em doses de 50 mg/kg no modelo com hamster, assim, acentuando a necessidade de tratamento combinado.

[000290] Em geral, neste estudo com hamster, similar às descobertas descritas supra utilizando combinações de mAb de murino, foi demonstrado que combinações de mAbs humanizados da invenção protegeram eficiente e duravelmente os hamsters contra

mortalidade no modelo rigoroso de infecção causada por C. difficile em hamsters. Sem desejar estar preso pela teoria, estas descobertas sustentam um mecanismo de ação pelo qual as combinações de mAb humanizado protegeram os animais contra doença causada por C. difficile e/ou permitiram que os animais montassem uma resposta contra a infecção causada por C. difficile durante um tempo longo o bastante para permitir crescimento e re-povoamento da flora intestinal normal nos animais tratados com mAb humanizado, assim, conferindo proteção terapêutica aos animais infectados, resolução eficiente da doença associada a *C. difficile* e restauração da saúde gastrintestinal e sobrevivência.

Exemplo 6

Ligação de mAbs à regiões da toxina A e toxina B de *C. difficile*

[000291] Experimentos foram conduzidos para determinar as regiões de epítopo da toxina A e toxina B de *C. difficile* às quais mAbs da invenção se ligam. Toxina A e toxina B produzidas por *C. difficile* têm aproximadamente 300 kDa e compartilham homologia de sequência e estrutura considerável. Ambas têm um domínio C-terminal de ligação a receptor que contém oligopeptídeos clostridiais repetitivos (CROPs), um domínio central hidrofóbico que acredita-se que cause formação de poro e medie a inserção da toxina na membrana do endossomo e um domínio proteolítico que cliva o domínio enzimático N-terminal, deste modo, permitindo que a glicosil transferase entre no citosol. Sequências de ácido nucleico que codificam as toxinas de *C. difficile*, bem como outras proteínas de *C. difficile*, foram publicadas e também estão acessíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (isto é, www.ncbi.nlm.nih.gov). Por exemplo, para a cepa VPI 10463 de *C. difficile*, sequências de DNA que codificam toxina A e toxina B podem ser encontradas sob NCBI N° de Acesso x92982; além disso, NCBI N° de Acesso NC_009089,

região 795842-803975, fornece a sequência de DNA para toxina A da sequência genômica completa do cromossomo 630 de *C. difficile*, enquanto que o NCBI N° de Acesso NC_009089, região 787393-794493, fornece a sequência de DNA que codifica toxina B a partir da sequência do cromossomo 630 de *C. difficile*.

A. Mapeamento de domínio de ligação a anticorpo da toxina B de *C. difficile*

[000292] Toxina B de *C. difficile* de comprimento total consiste de três domínios principais: um domínio enzimático N-terminal que processa atividade de glicosil transferase (GT) (63 kDa) e um de ligação a receptor celular C-terminal (59 kDa), que estão sobre qualquer extremidade de um domínio de translocação putativo (148 kDa) (**Figs. 17A** e **C**). Vários fragmentos de toxina B foram gerados por meio de clivagem enzimática da toxina B de comprimento total utilizando a enzima caspase 1 (**Fig. 17C**). Após tratamento da toxina B com caspase 1 (proporção de enzima/toxina de ~1 U/□g de toxina) a 37ºC durante 96 horas, quatro fragmentos principais foram produzidos, incluindo dois fragmentos C-terminais (193 e 167 kDa) e dois fragmentos N-terminais (103 e 63 kDa), conforme detectado via SDS-PAGE (**Fig. 17B**). Outros fragmentos menores, tais como de 26 e 14 kDa, também parecem ter sido gerados, mas não são detectáveis em análise de gel de Tris-Acetato a 3-8%.

[000293] Análises SDS-PAGE e Western blot foram realizadas na toxina B que não foi tratada ou tratada com caspase 1 (**Figs. 18A-C**). mAb PA-41 reconheceu os fragmentos de 103 kDa e 63 kDa de toxina B tratada com caspase 1 (fileira à direita na **Fig. 18B**) indicando, assim, que o PA-41 se liga ao domínio enzimático N-terminal da toxina B. Análise de sequenciamento N-terminal confirmou que PA-41 se liga ao domínio enzimático N-terminal de 63 kDa da toxina B. É interessante notar que uma banda de 63 kDa na toxina B não tratada

(fileira à esquerda, **Fig. 18B**) não foi reconhecida pelo PA-41, o qual sugere que dois fragmentos com o mesmo peso molecular (63 kDa) nas fileiras parecem ser proteínas diferentes

[000294] mAb PA-39 se ligou ao fragmento de 167 kDa de toxina B tratada com caspase 1 (**Fig. 18C**, fileira à direita), bem como uma proteína de 63 kDa no preparado de toxina B não tratada (**Fig. 18C**, fileira à esquerda), assim, sugerindo que PA-39 se liga a um epítopo no domínio de translocação da toxina B. Assim, com base nos resultados de análises SDS-PAGE/Western blot de toxina B de *C. difficile* tratada com caspase 1, foi observado que mAbs PA-41 e PA-39 interagem diferentemente com toxina B. Enquanto descobriu-se que mAb PA-41 se liga a um epítopo no domínio enzimático N-terminal da toxina B, descobriu-se que mAb PA-39 se liga a um epítopo no domínio de translocação da toxina (aminoácidos 850-1330). Estas descobertas também foram confirmadas por meio de análises SDS-PAGE/Western blot de fragmentos de toxina B utilizando digestão com enteroquinase.

[000295] Ligação competitiva dos mAbs antitoxina B à toxina B foi também realizada utilizando Biacore. Conforme observado nas **Figs. 19A-E**, mAbs PA-39 e PA-41 se ligam a diferentes regiões epitópicas da toxina B. Foi observado que mAbs PA-39 e PA-41 de murino se ligam a um sítio ou epítopo isolado na toxina B; descobriu-se que estes mAbs não se ligam ao domínio de ligação a receptor celular C-terminal (CRB). Para PA-41 de murino, a afinidade de ligação à toxina B foi de 0,59 mM. Adicionalmente, o sítio na toxina B ligado pelo PA-41 não bloqueia a ligação de mAb antitoxina B CDB-1 comparativo (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), (**Fig. 19D**). Estas descobertas estão em concordância com os resultados das análises Western blot. Conforme observado nas **Figs. 19C** e **E**, o mAb antitoxina B CDB-1 comparativo se liga à toxina B em epítopos

diferentes daqueles dos mAbs PA-39 e PA-41.

B. Mapeamento de domínio de ligação a anticorpo da toxina A de *C. difficile*

[000296] Toxina A de *C. difficile* de comprimento total tem um peso molecular de 310 kDa (**Fig. 20A**) e contém três principais domínios: um domínio de processamento enzimático N-terminal que possui atividade de glicosil transferase (GT) (~63 kDa) e um domínio CRB C-terminal (~101 kDa), que estão em qualquer extremidade de um domínio hidrofóbico (~144 kDa).

[000297] Vários fragmentos de toxina A foram gerados mediante clivagem enzimática da toxina de comprimento total utilizando a enzima enteroquinase (EK). Após tratamento da toxina A com enteroquinase (proporção de enzima/toxina: aproximadamente 3 mU/□g de toxina) a 25ºC durante 48 horas, nove fragmentos principais foram produzidos, incluindo quatro fragmentos C-terminais (~223, ~158-160, ~91 e ~68 kDa) e três fragmentos N-terminais (~195, ~181 e ~127 kDa). Fragmentos menores (~53 e ~42 kDa) foram também observados (**Figs. 20 B** e **C**).

[000298] Análises SDS-PAGE e Western blot foram realizadas na toxina A que não foi tratada ou tratada com enteroquinase (**Figs. 21A-C**). Toxina A de comprimento total e seus fragmentos que possuem pesos moleculares de ~223, ~158-160, ~91 e ~68 kDa foram reconhecidos pelo mAb PA-50 (**Fig. 21B**); sequenciamento N-terminal confirmou que o fragmento de 68 kDa contém parte do domínio de ligação a receptor C-terminal (CRB). O padrão de ligação do mAb PA-50 sugere que o mAb se liga aos fragmentos C-terminais da toxina A. Tomados juntos, os resultados indicam que o mAb PA-50 se liga a epítopos de ligação C-terminais na toxina A. mAb PA-39 se ligou a fragmentos C-terminais (~223 e ~158-160 kDa), bem como um fragmento N-terminal de ~181 kDa (**Fig. 21C**) indicando, assim, que o mAb PA-39 se liga a um epítopo em uma

região fora do domínio de ligação a receptor da toxina A. Múltiplos sítios de ligação (pelo menos dois sítios de ligação) foram também identificados em um estudo de interação de mAb PA-50 e toxina A utilizando um ensaio Biacore (**Fig. 22A-1**). Em estudos de comparação utilizando análise Biacore, PA-50 de murino imobilizado se ligou especificamente à toxina A com uma afinidade de 0,16 nM. Descobriu-se também que, após ser capturada sobre o Sensor Chip pelo mAb de murino PA-50, toxina A foi capaz de se ligar adicionalmente ao PA-50 e, subsequentemente, mAb CDA-1 antitoxina A comparativo (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), (**Fig. 22A-2**). Adicionalmente, toxina A capturada pelo mAb CDA-1 antitoxina A comparativo sobre o chip Biacore se ligou adicionalmente aos mAbs CDA-1 e PA-50, indicando que o mAb CDA-1 comparativo se liga a múltiplas repetições na toxina A, as quais são diferentes dos epítopos de ligação do mAb PA-50 na toxina A (**Fig. 22B**). Assim, conforme determinado a partir destes resultados, o epítopo do mAb PA-50 mAb está presente em múltiplas cópias na toxina A e não se sobrepõe ao epítopo para CDA-1. ainda, o mAb PA-39 se ligou a epítopo(s) na toxina A diferente(s) do(s) epítopo(s) de toxina A ligado(s) pelo mAb CDA-1 comparativo (**Fig. 22C**). Descobriu-se que os mAbs PA-39 e PA-50 se ligam a epítopos diferentes na toxina A (**Fig. 22D**). Análise Western blot mostrou que os mAbs PA-39 e CDA-1 comparativo têm diferentes padrões de ligação à toxina A tratada com EK indicando, assim, domínios de ligação diferentes e epítopos diferentes na toxina A (**Fig. 22E**). Análise Western blot mostrou que os mAbs PA-50 e CDA-1 comparativo se ligam ao mesmo domínio de toxina A tratada com EK (**Fig. 22F**), mas a epítopos diferentes (**Fig. 22B**).

[000299] Conforme descrito em A e B deste Exemplo, os sítios de ligação para os mAbs de murino PA-50 e PA-41 estavam localizados em regiões específicas das toxinas por proteólise limitada das toxinas, seguido por Western blotting. O mAb de murino PA-50 reconheceu a

toxina A de comprimento total e vários produtos da clivagem de enteroquinase, incluindo um grande fragmento de 223 kDa e fragmentos carbóxi-terminais de 68, 91 e 160 kDa de tamanho (**Fig. 22F**). Sequenciamento N-terminal confirmou que o fragmento de 68 kDa corresponde ao domínio carbóxi terminal da toxina A. Os mesmos fragmentos foram reconhecidos pelo mAb comparativo CDA-1. O mAb de murino PA-41 se ligou à toxina B de comprimento total, bem como aos fragmentos de 63 e 103 kDa amino-terminais gerados por meio de digestão com caspase-1 (**Fig. 18B**), enquanto que o mAb CDB-1 comparativo reconheceu um conjunto distinto de produtos da clivagem de caspase-1. Sequenciamento N-terminal confirmou que o fragmento de 63 kDa corresponde ao domínio amino terminal da toxina B. Coletivamente, os dados indicam que o mPA-50 se liga a múltiplos sítios dentro do domínio de ligação a receptor da toxina A e o mPA-41 se liga a um sítio isolado dentro do domínio enzimático da toxina B.

Exemplo 7

mAbs antitoxina A e toxina B de *C. difficile* -- Estudos de mecanismo de ação

A. Ensaios *in vitro* à base de células utilizados para estudos de mecanismo de ação

[000300] Para avaliar o mecanismo de ação dos mAbs antitoxina, ensaios *in vitro* foram realizados utilizando diferentes concentrações de toxina A ou toxina B. Estes ensaios utilizaram células CHO-K1 ou T-84, conforme descrito no Exemplo 3 *supra*.

[000301] Resumidamente, o ensaio com CHO-K1 foi utilizado para avaliar a potência de neutralização de mAbs antitoxina A e antitoxina B (PA-39 e PA-41). Células CHO-K1 foram semeadas (2.000 células/cavidade) em lâminas com 96 cavidades. As células foram deixadas fixar durante 4 horas antes de tratamento. Diferentes concentrações (60, 30, 15 ou 6 ng/mL) de toxina de *C. difficile* (cepa VPI

10463) foram incubadas com mAbs serialmente diluídos, misturadas em lâminas de fundo redondo com 96 cavidades durante 1 hora a 37°C e a mistura foi, então, adicionada à lâminas de cultura de células. Após incubação durante 72 horas, 20 µL/cavidade de CellTiter-Blue foram adicionados; a mistura foi incubada durante mais 4 horas; e a sobrevivência percentual das células comparado com controles foi medida.

[000302] O ensaio de citotoxicidade com T-84 foi também utilizado para avaliar a potência de neutralização de mAbs antitoxina A. Células T-84 (linhagem de células de carcinoma de cólon humano) foram semeadas (15.000 células/cavidade) em lâminas com 96 cavidades. As células foram deixadas fixar durante 4 horas antes de tratamento. Diferentes concentrações (240, 120, 60 ou 30 ng/mL) de toxina de *C. difficile* (cepa VPI 10463) foram incubadas com mAbs serialmente diluídos, misturadas em lâminas de fundo redondo com 96 cavidades durante 1 hora a 37 °C e a mistura foi, então, adicionada à lâminas de cultura de células. Após incubação durante 72 horas, 20 µL/cavidade de CellTiter-Blue foram adicionados; a mistura foi incubada durante mais 4 horas; e a sobrevivência percentual das células comparado com controles foi medida.

<u>B. ELISA que mostra que mAbs antitoxina A impedem internalização da toxina A em células</u>

[000303] Em um experimento projetado para avaliar adicionalmente o mecanismo de ação de mAb antitoxina de *C. difficile*, cada anticorpo de teste (PA-39, PA-50, mAb CDA-1 antitoxina A comparativo e um controle de anticorpo policlonal de cabra antitoxina A) foi misturado e incubado durante 1 hora a 100x seu valor de EC_{90} com uma concentração CC_{90} da toxina A para células Vero, a fim de assegurar neutralização completa em uma concentração de toxina A altamente citotóxica. A mistura foi, então, incubada com células Vero a 37°C durante 15 minutos. As células

foram, então, lavadas com PBS, fixadas e permeabilizadas. Um anticorpo antitoxina A, rotulado com peroxidase de rábano (HRP) (PA-38), que não compete pela ligação com os anticorpos testados, foi utilizado para hibridizar a toxina A internalizada e detectado utilizando quimioluminescência (**Fig. 31G**). Neste ensaio, apenas toxina A que se ligou e foi internalizada em uma célula será detectada pela sonda, assim, proporcionando um sinal quimioluminescente com base em uma reação quimioluminescente com HRP. A detecção quimioluminescente usa uma enzima para catalisar uma reação (isto é, a oxidação catalisada de luminol por peróxido) entre a enzima HRP e seu substrato na presença de peróxido, a qual resulta na geração de luz visível. Luminol oxidado emite luz à medida que ele declina para seu estado de base. Uma vez que o substrato é catalisado pela HRP, o sinal luminoso é quantificado por um luminômetro (Analyst GT).

C. Resultados de atividade de neutralização e estudos de MOA

mAbs antitoxina A

[000304] No ensaio de citotoxicidade celular utilizado para avaliar a atividade de neutralização e mecanismo de ação para os anticorpos antitoxina A, toxina A foi adicionada em concentrações crescentes às células, conforme descrito *supra* na Seção A deste Exemplo. Os resultados destes experimentos, nos quais neutralização de toxina A pelos mAbs antitoxina A PA-39, PA-50 e mAb CDA-1 comparativo foi avaliada, são mostrados nas **Figs. 31B-D** e na Tabela A abaixo.

Tabela A. Resultados de experimento de potência contra toxina A e inibição percentual máxima

mAb	[Toxina A] (ng/mL)	[EC_{50}]* (nM)	Inibição percentual máxima
PA-39	60	0.340	69
	30	0.080	86
	15	0.003	96
	6	0.002	97

mAb	[Toxina A] (ng/mL)	[EC_{50}]* (nM)	Inibição percentual máxima
PA-50	240	0,91	105
	120	0,54	100
	60	0,27	114
	30	0,10	118
mAb CDA-1 comparativo	240	9,0	52
	120	6,6	74
	60	5,1	103
	30	2,0	110

*: EC_{50} foi calculada como inibição percentual máxima de 50% em casos onde as curvas não atingem 100% do controle.

[000305] Conforme observado a partir dos dados apresentados na Tabela A, a atividade *in vitro* do mAb PA-39 no ensaio de potência contra toxina mostra alterações na EC_{50} e na inibição percentual máxima quanto mais toxina A é adicionada à cultura, indicando um mecanismo de inibição competitivo misto para PA-39. Detecção por ELISA da toxina A após proteção por um excesso de 100 vezes de PA-39 confirmou que inibição da toxina pelo PA-39 ocorre impedindo internalização da toxina e um efeito citocelular da toxina. A atividade *in vitro* do mAb PA-50 no ensaio de potência contra toxina mostra uma alteração na EC_{50} quanto mais toxina A é adicionada à cultura, indicando um mecanismo de inibição competitivo para PA-50. Detecção por ELISA da toxina A após proteção por um excesso de 100 vezes de PA-50 confirmou que inibição da toxina pelo PA-50 ocorre impedindo internalização da toxina.

mAbs antitoxina B

[000306] No ensaio de citotoxicidade celular utilizado para avaliar a potência de neutralização e o mecanismo de ação para os anticorpos

antitoxina B, toxina B foi adicionada em concentrações crescentes às células, conforme descrito na Seção A deste Exemplo. Os resultados dos experimentos de potência, nos quais neutralização de toxina B pelos mAbs antitoxina B PA-41 e mAb CDB-1 comparativo foi avaliada, são mostrados nas **Figs. 31E** e **F** e na Tabela B abaixo. Conforme observado a partir dos dados apresentados na Tabela, a atividade *in vitro* de PA-41 no ensaio de potência contra toxina mostra alterações na EC_{50} e na inibição percentual máxima quanto mais toxina B é adicionada na cultura, indicando um mecanismo de inibição competitivo misto para PA-41.

Tabela B. Resultados do experimento de potência contra toxina B e inibição percentual máxima

mAb	**[Toxina B] (pg/mL)**	**[EC_{50}]* (nM)**	**Inibição percentual máxima**
PA-41	20	0,82	49
	10	0,33	80
	5	0,13	96
	2	0,05	96
mAb CDB-1 comparativo	20	4,1	23
	10	3,0	51
	5	1,1	75
	2	0,2	95

*: EC_{50} foi calculada como inibição percentual máxima de 50% em casos onde as curvas não atingem 100% do controle.

[000307] Com base nos ensaios descritos acima neste Exemplo, um inibidor que tem a capacidade de neutralizar completamente concentrações crescentes de toxina A ou toxina B simplesmente mediante adição de maiores concentrações de inibidor mostraria uma

alteração na EC_{50} quanto mais anticorpo se liga e neutraliza as maiores concentrações de toxina e, assim, seria considerado como um inibidor competitivo. Um inibidor que é incapaz de superar os efeitos tóxicos de concentrações crescentes de toxina mostraria um efeito percentual máximo reduzido em maiores concentrações de inibidor, mas não mostraria uma alteração na EC_{50} e, assim, seria considerado um inibidor não competitivo. Ainda, um inibidor que exibe uma alteração na EC_{50} e um efeito percentual máximo reduzido como um resultado de concentrações crescentes de inibidor em maiores concentrações de toxina seria considerado como sendo um inibidor misto competitivo. Até certo ponto, a avaliação do mecanismo de ação utilizando ensaios de citotoxicidade celular deve ser realizada considerando-se o erro envolvido em repetibilidade do ensaio e a citotoxicidade de base observada em cavidades de controle sem inibidor, os quais afetam o platô da inibição percentual máxima. Consequentemente, um ligeiro desvio para a direita nos valores de EC_{50} pode ser observado à medida que as concentrações de toxina são aumentadas em virtude destes efeitos.

[000308] De acordo com o precedente, para neutralização e MOA de toxina A, o mAb PA-39 é considerado um inibidor misto competitivo em virtude do desvio na EC_{50} e platô reduzido observado para as curvas de citotoxicidade para PA-39 (**Fig. 31B**), bem como no efeito percentual máximo reduzido calculado na Tabela A. Estes dados são sustentados pelos resultados do ELISA (**Fig. 31H**), que mostram um grau de efeito citotóxico em altas concentrações de PA-39 indicando, assim, que pelo menos uma parte do MOA para PA-39 ocorre intracelularmente. É observado que o mAb PA-50 é um inibidor competitivo, conforme evidenciado pelo desvio para a direita nos valores de EC_{50} observados nas curvas do ensaio de citotoxicidade (**Fig. 31C**) e pelos dados apresentados na Tabela A, que mostram

alteração mínima na inibição percentual máxima. Estes dados são sustentados pelos resultados do ELISA (**Fig. 31H**), que mostram inibição completa de ligação da toxina A e internalização em altas concentrações de PA-50.

[000309] Conforme observado na **Fig. 31D**, o mAb CDA-1 comparativo mostra um desvio mínimo na EC_{50}, mas diminuição considerável do efeito percentual máximo à medida que a toxina aumenta. Quando os resultados mostrados na **Fig. 31D** são considerados com os dados apresentados na Tabela A, o mAb CDA-1 comparativo demonstra um mecanismo de ação não competitivo, uma vez que toda sua atividade é observada fora da célula. Estero-impedimento de ligação de toxina e internalização celular provavelmente são responsáveis por proporcionar os dados plotados na **Fig. 31D**, deste modo, um sustentando um MOA não competitivo para o mAb CDA-1 comparativo.

[000310] De acordo com o precedente para neutralização de toxina B e MOA, considera-se que o mAb PA-41 exibe um mecanismo de ação competitivo misto em virtude do desvio para a direita dos valores de EC_{50} e do efeito percentual máximo reduzido observado na **Fig. 31E** e nos dados apresentados na Tabela B.

[000311] Os resultados observados para o mAb PA-41 estão em contraste com aqueles observados para o mAb CDB-1 comparativo, que exibe um efeito percentual máximo reduzido, mas um grau menor de desvio de EC_{50}. Neste caso, o mecanismo de ação para a atividade do mAb comparativo contra a toxina B é menos evidente, particularmente em vista das considerações de erro mencionadas acima.

Exemplo 8

Testagem de mAbs da invenção contra um painel de isolados ou cepas de *C. difficile,* incluindo isolados ou cepas hiper-virulentas

[000312] Para avaliar a capacidade de mAbs antitoxina A e antitoxina B de *C. difficile* da invenção de neutralizar toxinas de uma ampla faixa de isolados relevantes de *C. difficile*, a atividade de neutralização dos mAbs foi testada contra uma coleção de vinte isolados clínicos ou cepas de *C. difficile* toxigênicas, incluindo isolados BI/NAP1/027 hiper-virulentos. Uma vez que *C. difficile* exibe heterogeneidade inter-cepa considerável nos genes que codificam as toxinas A e B, estes estudos foram realizados para examinar a amplitude de neutralização de toxina pelos mAbs descritos e, em particular, mAbs PA-50 e PA-41.

[000313] Um painel de isolados clínicos toxigênicos de *C. difficile* (Tabela 6) foi selecionado pela diversidade geográfica e genética com base no tipo de toxina, ribotipo e análises com endonuclease de restrição a partir de uma coleção internacional de isolados ou cepas de *C. difficile* mantida no TechLab (Blacksburg, VA).

[000314] Conforme classificado na Tabela 6, as cepas de *C. difficile* incluem 3 cepas de referência (VPI 10463 (ATCC 43255), 630 (ATCC BAA-1382) e 545 (ATCC 43596), seis cepas derivadas de hospital BI/NAP1/027 (CCL678, HMC553, Pitt45, CD196, 5, 7,1), duas cepas toxina A-/ toxina B+ (tcdA-tcdB+) (F1470, 8864), três isolados de pacientes de ambulatório (MH5, CCL13820 e CCL14402) e outros isolados clínicos frequentes (Pitt2, CCL14137, UVA17, UVA30/TL42, Pitt102, Pitt7). Adicionalmente, os isolados 13 (CCL13820) e 19 (Pitt 102), que são classificados como um "isoladode ambulatório" e um "isolado clínico frequente" (sem ser Ribotipo 027)", respectivamente, na Tabela 6 são também cepas toxA-/toxB+. Sobrenadantes de cultura contendo estas toxinas de *C. difficile* foram produzidos no TechLab, esterilizados em filtro e armazenados a 4°C. A presença das toxinas nos sobrenadantes de cultura foi confirmada utilizando o kit *C. difficile* Toxin/Antitoxin (TechLab) e o ensaio de citotoxicidade.

[000315] A atividade citotóxica de cada sobrenadante de cultura

contendo toxina para células CHO-K1 (usadas para determinar a atividade da toxina B de sobrenadantes de cultura) e células T-84 (usadas para determinar a atividade da toxina A de sobrenadantes de cultura) foi avaliada tratando as células com sobrenadantes de cultura titulados.

Tabela 6. Isolados/cepas de *C. difficile* utilizados para geração de sobrenadantes

Nº	Cepa	Categoria	Ribotipo	Tipo de toxina	Tipo REA	Ano	Localização
1	VPI 10463 ATCC 43255	Cepas de referência A+B+	003	0	Desconhecido	~1975	EUA
2	630 ATCC BAA-1382		Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	1982	Suíça
3	545 ATCC 43596		Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Louvain, Bélgica
4	CCL 678	Ribotipo 027 (isolados de hospital)	027	III	BI	2007	Virgina, EUA
5	HMC553					2008	Pensilvânia, EUA
6	Pitt 45					2001-2002	Pensilvânia, EUA
7	Cd 196					1988	Paris, França
8	5					2004	Quebec, Canadá
9	7.1					2004	Quebec, Canadá
10	F1470	Cepas tcdA-tcdB+	017	VIII	CF1	1990	Louvain, Bélgica
11	8864 CCUG 20309		0,36	X	CY1	1986	Bimingham, Inglaterra
12	MH 5	Isolados de	001	Desconhecido	Desconhecido	2008	Virginia, EUA

Nº	Cepa	Categoria	Ribotipo	Tipo de toxina	Tipo REA	Ano	Localização
13	CCL 13820	ambulatório	017	VIII	CF	2008	Virginia, EUA
14	CCL 14402		027	III	BI	2008	Virginia, EUA

Tabela 6. Continuação

Nº	Cepa	Categoria	Ribotipo	Tipo de toxina	Tipo REA	Ano	Localização
15	Pitt 2	Isolados clínicos frequentes (outros que não Ribotipo 027)	001	Desconhecido	J	2001-2002	Pensilvânia, EUA
16	CCL 14137		001	Desconhecido	J	2008	Virginia, EUA
17	UVA17		002	Desconhecido	G	2006-2007	Virginia, EUA
18	UVA30/TL42		014	Desconhecido	Y	2006-2007	Virginia, EUA
19	Pitt 102		017	VIII	CF	2001-2002	Pensilvânia, EUA
20	Pitt 7		078	V	BK	2001-2002	Pensilvânia, EUA

[000316] Para testar as atividades de neutralização de mAbs da invenção, sobrenadantes de cultura contendo toxina foram utilizados na diluição máxima que resultava em perda de ≥95% na viabilidade celular. Sobrenadantes com toxina foram pré-misturados com várias concentrações dos mAbs durante 1h e, então, adicionados às células para incubação a 37ºC durante 72h. A viabilidade celular foi medida utilizando Cell-Titer Blue (Promega). A sobrevivência percentual das cavidades tratadas foi comparada com aquela de cavidades de controle não tratadas e transformada em gráfico para calcular as atividades de neutralização *in vitro* (EC_{50}) dos mAbs. Em uma primeira série de experimentos, a **Fig. 23A** mostra a atividade do mAb PA-41 em neutralização de sobrenadantes contendo toxina utilizando células CHO-K1. PA-41 neutralizou potentemente (faixa de EC_{50} de $1,1^{-11}$M a $6,5^{-10}$M) sobrenadantes de todas as cepas toxigênicas de *C. difficile*, incluindo todas as cepas hiper-virulentas, com a exceção de três cepas toxina A-/toxina B+. Foi reportado que há uma diferenças de sequência significativas nos domínios enzimáticos da toxina A-/toxina B+ de cepas convencionais de *C. difficile*. Em virtude do fato de o PA-41 se ligar ao domínio enzimático da toxina B, a diversidade de sequência neste domínio pode explicar a atividade de neutralização menos eficiente de PA-41 contra a toxina B das duas cepas toxina A-/toxina B+.

[000317] Experimentos foram também conduzidos para avaliar a atividade dos mAbs hPA-41 e antitoxina B humana CDB-1 comparativo (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), contra cepas hiper-virulentas de *C. diffiicle* na linhagem de células CHO-K1. Nestes estudos, foi observado que hPA-41 mostrou atividade de neutralização significativa contra os sobrenadantes de todas as 6 cepas BI/NAP1/027, enquanto que o mAb CDB-1 comparativo mostrou atividade mínima (**Fig. 23B**). Também nestes estudos, foi observado

que a atividade de neutralização do mAb hPA-41 era >1.000 vezes maior do que aquela do mAb CDB-1 comparativo em neutralização de toxicidade das cepas BI/NAP1/027. A atividade de neutralização dos mAbs hPA-41 e CDB-1 comparativo para as 2 cepas de referência (VPI 10463 e ATCC 43596) e 6 cepas BI/027/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 e Montreal 7.1) é ilustrada na **Fig 23B**. Nestes estudos, descobriu-se que hPA-41 era inativo contra três isolados de Ribotipo 017 (Tabela 6) os quais são toxina A-/B+, enquanto que o mAb hPA-41 antitoxina B exibiu atividade de neutralização significativamente maior do que o mAb comparativo contra outras cepas no painel.

[000318] A atividade do mAb PA-50 em neutralização de sobrenadantes de culturas de *C. difficile* contendo toxina A utilizando células T-84 oscilava de $2,6^{-12}$M a $7,7^{-11}$M, conforme mostrado na **Fig. 24A.** PA-50 neutralizou completamente sobrenadantes de todas as cepas disponíveis que produzem toxina A, incluindo cepas hiper-virulentas. PA-50 não neutraliza as quatro cepas toxina A-/toxina B+ (F1470, 8864, CCL 13820, CCL 14402), uma vez que estas cepas não produzem qualquer toxina A. hPA-50 foi também significativamente mais eficiente em neutralização de atividade das cepas restantes no painel. Em outros estudos comparativos, descobriu-se que a atividade de neutralização de hPA-50 contra todas as 6 cepas BI/NAP1/027 de *C. difficile* que produzem toxina A era >100 vezes maior que aquela do mAb CDA-1 comparativo (documentos WO/2006/121422; US2005/0287150), (**Fig. 24B**). hPA-50 também mostrou maior atividade de neutralização do que o mAb CDA-1 comparativo contra cepas de referência VPI 10463 e 545 de *C. difficile* que produzem toxina A. Similarmente, mAb PA-39 neutralizou a toxina A em sobrenadantes de culturas de *C. difficile* com valores de EC_{50} variando de $7,7^{-12}$M a $4,8^{-8}$M, conforme mostrado em (**Fig. 25A**). Conforme

observado para o mAb PA-50, as quatro cepas toxina A-/toxina B+ não foram neutralizadas pelo PA-39. Além disso, resultados de estudos comparativos demonstraram que a atividade de neutralização do mAb PA-39 contra todas as 6 cepas BI/NAP1/027 era >100 vezes maior que aquela do mAb antitoxina A humano CDA-1 comparativo; PA-39 também mostrou significativamente mais atividade de neutralização contra as cepas restantes no painel (**Fig. 25B**). Deve ser notado que uma cepa que produz toxina, CCL 14402, não reduz a viabilidade de células T-84 suficientemente o bastante para permitir uma medição precisa de atividade de neutralização pelo mAb no ensaio.

[000319] Nestes estudos com a linhagem de células CHO-K1, hPA-41 mostrou altos níveis de atividade de neutralização contra os sobrenadantes de todas as 6 cepas BI/NAP1/027, enquanto que o mAb CDB-1 comparativo mostrou atividade mínima. Foi observado que PA-41 humanizado tem uma atividade de neutralização >1.000 vezes maior que aquela do mAb CDB-1 comparativo em neutralização das cepas hiper-virulentas BI/NAP1/027 de *C. difficile*. As atividades de neutralização de hPA-41 e CDB-1 nestes estudos contra as 2 cepas de referência (VPI 10463 e ATCC 43596) e 6 cepas BI/027/027 (CCL678, HMC553, Pitt 45, CD196, Montreal 5.1 e Montreal 7.1) são ilustradas na **Fig 23B.** Similarmente, hPA-41 mostrou atividade de neutralização significativamente maior nestes estudos comparado com o mAb CDB-1 comparativo contra as outras cepas no painel, com a exceção de três isolados de Ribotipo 017, os quais são toxina A-/B+. Experimentos similares foram realizados para avaliar a atividade de neutralização de hPA-39 e aquela do mAb antitoxina A humano CDA-1 comparativo sobre células T-84. Os resultados mostraram que neutralização de todas as 6 cepas BI/NAP1/027 pelo hPA-39 foi >100 vezes maior que aquela do mAb CDA-1 comparativo (**Fig 25B**). PA-39 humanizado também mostrou atividade de neutralização

significativamente maior nos estudos do que o mAb CDA-1 comparativo contra as cepas restantes no painel. Assim, os mAbs hPA-41 e hPA-39 mostraram altos níveis de atividades de neutralização anti-cepa hiper-virulenta de *C. difficile* contra todas as cepas testadas. Isto indica que os epítopos reconhecidos por estes mAbs humanizados são altamente conservados através de diversas cepas.

[000320] Similar à Tabela 6, a Tabela 7 apresenta os resultados dos experimentos de neutralização de toxina de *C. difficile in vitro* descritos acima, mostrando o painel de cepas toxigênicas de *C. difficile* isoladas da América do Norte e Europa e os valores de EC_{50} resultantes gerados pelos mAbs humanizados antitoxina e mAbs comparativos CDA-1 e CDB-1. O painel inclui ribotipos 001, 002, 003, 012, 014, 017, 027 e 078 em proporção apropriada às taxas observadas clinicamente (94, 95), com a exceção das cepas de ribotipo 017 *tcdA*$^{-}$*tcdB*$^{+}$, que são super-representadas no painel. Sobrenadantes de cepas *tcdA*$^{-}$*tcdB*$^{+}$ foram utilizados como ferramentas para identificar células que eram resistentes à morte pelos sobrenadantes contendo toxina B isoladamente e, assim, seriam adequadas para exame de citotoxicidade mediada pela toxina A. VPI 10463 foi incluída no painel e permitiu a comparação de resultados obtidos com toxinas purificadas e não purificadas.

[000321] Nestes estudos, mAb PA-50 humanizado neutralizou a toxina A de uma maneira cepa-independente. O valor de EC_{50} mediano foi de 32 pM (faixa: 20 a 127 pM, Tabela 7) e curvas de dose-resposta graduais foram observadas com declínios de Hill que eram, tipicamente, maiores do que dois (**Fig. 25C**). PA-50 foi mais ativo do que CDA1 contra cada um dos isolados de teste. A maior diferença na potência foi observada para as cepas hiper-virulentas 027, para as quais PA-50 foi aproximadamente 1.000 vezes mais potente do que

CDA1 (P = 0,0002) e para uma cepa de ribotipo 078 incluída no painel. [000322] mAb PA-41 humanizado inibiu potentemente cada uma das cepas *tcdA*$^+$*tcdB*$^+$ com um valor de EC_{50} mediano de 23 pM (faixa: 7,7 a 129 pM, Tabela 7) e neutralização essencialmente completa foi observada em maiores concentrações (**Fig. 25D**). PA-41 foi geralmente mais eficiente do que CDB1 contra cepas *tcdA*$^+$*tcdB*$^+$ e foi aproximadamente 500 vezes mais potente contra as cepas hiper-virulentas 027 (P = 0,003). CDB1, mas não PA-41, foi eficiente em neutralização de toxina B de cepas de ribotipo 017 *tcdA*$^-$*tcdB*$^+$. Finalmente, PA-41 e PA-50 exibiram atividades similares contra formas brutas e purificadas de toxina da cepa de referência VPI 10463 (Tabela 7 e **Figs. 25C** e **25D**).

Tabela 7. Neutralização de toxinas de diversas cepas de *C. difficile in vitro*

Ribotipo	Cepa	EC_{50}, pM			
		mAbs antitoxina A		mAbs antitoxina B	
		PA-50	CDA1	PA-41	CDB1
001	CCL14137	39	611	9,7	129
001	MH5	127	384	18	73
001	Pitt 2	27	247	13	92
002	UVA17	26	825	129	671
003	VPI 10463	20	1271	7,7	136
012	545	38	4552	15	153
012	630	54	1019	111	1782
014	UVA30/TL42	51	625	21	324
017	CCL13820	N/A	N/A	$>10^5$	72
017	F1470	N/A	N/A	$>10^5$	46
017	Pitt 102	N/A	N/A	$>10^5$	8,1
027	CCL678	29	58,950	77	$>10^5$

Ribotipo	Cepa	EC_{50}, pM			
		mAbs antitoxina A		mAbs antitoxina B	
		PA-50	CDA1	PA-41	CDB1
027	CCL14402	ND	ND	19	4.678
027	CD196	61	132.600	16	9.812
027	HMC553	29	109.000	24	14,730
027	Montreal 5	29	87.090	36	25.810
027	Montreal 7.1	31	109.400	29	16.800
027	Pitt 45	43	108.100	29	26.510
078	Pitt 07	32	$>10^5$	59	8.415

[000323] Conforme mostrado neste Exemplo, mAbs humanizados PA-50 e PA-41 mostraram um alto nível de atividade de neutralização contra toxinas A e B de *C. difficile*, respectivamente, de cepas geneticamente diversas representativas de CDI epidêmica atual. A amplitude de atividade destes mAbs é notável à luz da variação genotípica e fenotípica dentro das toxinas. Em particular, PA-50 e PA-41 neutralizaram toxinas produzidas pelas cepas 027 hiper-virulentas, resistentes a antibiótico com atividade picomolar, enquanto que foi observado que os mAbs comparativos têm atividade nanomolar. Este resultado pode refletir a ligação reduzida de CDA-1 à toxina A de cepas 027, conforme previamente reportado (90). Toxina B de cepas 027 exibe divergência de sequência acentuada com relação à outras cepas de *C. difficile*. As diferenças de sequência se concentram dentro do domínio de ligação a receptor carbóxi-terminal e estão associadas à citotoxicidade aumentada *in vitro*. Entretanto, tal divergência de sequência não afeta a atividade de neutralização de PA-41, o qual se liga a um epítopo dentro do domínio amino-terminal da toxina B. PA-50 e PA-41 neutralizaram todas as seis cepas 027 no painel com potências picomolares, incluindo a cepa CD196, que antecede a elevação recente na prevalência de 027. Em geral, as descobertas

indicam que os epítopos para PA-50 e PA-41 são amplamente conservados através da linhagem 027.

[000324] CDI é, tipicamente, causada por cepas de *C. difficile* que produzem toxinas A e B. Entretanto, cepas *tcdA*$^{-}$*tcdB*$^{+}$ também foram relacionadas à doença. Cepas *tcdA*$^{-}$*tcdB*$^{+}$ clinicamente relevantes são predominantemente de ribotipo 017. Foi reportado que cepas de ribotipo 017 exibem patogenicidade reduzida em hamsters e codificam uma tcdB atípica cuja região amino-terminal traz 70-80% de identidade de sequência com tcdB de VPI 10463 e toxina letal (tcsL) de *C. sordellii.* Fenotipicamente, tcdB de ribotipo 017 tem características híbridas e exibe as propriedades de ligação a receptor e especificidades de glicosilação de toxinas tcdB e tcsL típicas, respectivamente. A região amino-terminal atípica de tcdB 017 fornece uma provável explicação porque essa toxina não foi neutralizada pelo PA-41 neste estudo. Embora cepas 017 possam ser regionalmente prevalentes e causar surtos locais de CDI, em geral, foi determinado que elas compreendem <2% das cepas encontradas em estudos clínicos em fase 3 internacionais recentes de terapias investigacionais para tratamento de CDI (94, 95).

Exemplo 9

Geração de mAbs quiméricos

[000325] Anticorpos quiméricos monoclonais que compreendem a região variável do mAb parental de camundongo e a região constante de IgG1 humana foram produzidos e caracterizados. mAbs quiméricos foram gerados para assegurar que regiões variáveis de murino que possuem a atividade antitoxina e especificidade de ligação corretas fossem clonados e que construção das regiões variáveis de murino com a região constante humana não altera significativamente as propriedades de ligação e neutralização de cada mAb clonado. mAbs quiméricos exibem, tipicamente, a mesma atividade de ligação que os

mAbs parentais de camundongo.

[000326] mAbs PA-38, PA-39, PA-41 e PA-50 contêm todos cadeia leves kappa. Para gerar os mAbs quiméricos, as sequências de ácido nucleico que codificam as regiões variáveis das cadeias pesada e leve foram inseridas em vetores de expressão adequados tais como, porém sem limitações, pCON Gama1 e pCON kappa, respectivamente (Lonza Biologics, Berkshire, Reino Unido). Plasmídeos adequados codificam a região constante da cadeia leve kappa humana ou a região constante da cadeia pesada de IgG1 humana. Para produção de mAb quimérico, a região variável da cadeia pesada de cada mAb foi clonada no plasmídeo pCON gama1. O gene de cadeia pesada completo foi subclonado no plasmídeo contendo o gene de cadeia leve para criar um único plasmídeo que codifica os genes de cadeias pesada e leve. Células 293F foram transitoriamente transfectadas com este vetor de expressão utilizando Effectene (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Sobrenadante celular contendo mAb quimérico secretado foi coletado sete dias após transfecção e purificado utilizando cromatografia com Proteína A. As potências e atividades do(s) mAb(s) quimérico(s) foram comparadas com aquelas dos mAbs murinos em ensaios de citotoxicidade e hemaglutinação.

[000327] De acordo com o procedimento acima, mAbs quiméricos (cPA-39 e cPA-41) foram gerados com base nos mAbs parentais de camundongo PA-39 e PA-41. As concentrações destes mAbs quiméricos em sobrenadantes celulares brutos oscilavam de aproximadamente 2-11 µg/mL. Em particular, sobrenadante bruto de uma cultura de células 293F transfectada que produzem cPA-39 continha 10,6 µg/mL do mAb quimérico, enquanto que sobrenadantes brutos de várias culturas de células 293F transfectadas que produzem cPA-41 continham de 9,6-10,9 µg/mL do mAb quimérico.

[000328] Os mAbs quiméricos foram comparados com seus respectivos mAbs parentais de camundongo com relação à capacidade de neutralizar toxinas de *C. difficile in vitro* conduzindo ensaios de citotoxicidade (cPA-39: células CHO-K1, cPA-41: células CHO-K1e cPA-50: células T-84), conforme previamente descrito (Exemplo 3). Descobriu-se que todos os mAbs quiméricos eram igualmente eficientes quando comparado com seus mAbs parentais de murino, conforme mostrado na **Fig.** 26 **(**PA-41), **Fig. 27** (PA-39) e **Fig. 28** (PA-50). Estes resultados demonstram o sucesso de quimerização e a produção de mAbs quiméricos funcionais que possuem potências de neutralização de toxina equivalentes àquelas dos mAbs parentais de camundongo.

Exemplo 10

Humanização de mAb(s) de murino e testagem dos mAbs humanizados da invenção quanto à potência de neutralização de toxina *in vitro*

[000329] mAbs humanizados foram gerados por meio de métodos conhecidos na técnica. Os exemplos e descrições de vários mAbs humanizados incluem, por exemplo, Zenapax (65,66) Synagis (67-69), Herceptina (70-72), Milotarg (73,74), Xolair (75-77), Raptiva (78-80), Avastina (81,82) e Tysabri (83). Anticorpos monoclonais humanizados que são eficientes ao minimizar a imunogenicidade do agente podem ser gerados, de modo que a atividade do mAb em seres humanos não seja adversamente afetada. (84-87). De preferência, os mAbs humanizados demonstram atividade de neutralização de toxina que está dentro de duas vezes os mAbs parentais de camundongo. Ainda, mAbs humanizados demonstram, de modo ótimo, eficácia potente no modelo de infecção causada por *C. difficile* em hamster.

Métodos estabelecidos de enxertia de região de determinação de complementaridade (CDR) foram utilizados para gerar formas

humanizadas dos mAbs antitoxina A e/ou antitoxina B de murino, conforme descrito aqui. O(s) mAb(s) humanizado(s) foram comparados com o(s) mAb(s) parental(is) de camundongo com relação à atividade de neutralização de toxina *in vitro* e *in vivo*. De acordo com a invenção, o(s) mAb(s) humanizado(s) pode(m) reter a atividade antitoxina do(s) mAb(s) parental(is) de murino e pode(m) ser adequado(s) para dosagem repetida em seres humanos.

A. Clonagem molecular dos genes de cadeias pesada e leve dos mAbs de murino

[000330] Métodos estabelecidos foram utilizados para a clonagem de genes de anticorpo. (88) Resumidamente, RNA total foi purificado a partir de $1x10^7$ células de hibridoma utilizando reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. 5□g de RNA total foram reversamente transcritos utilizando SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) utilizando um primer de oligo-dT. O cDNA resultante foi tratado com RNAse H para remover o *template* de RNA e foi, então, purificado utilizando um kit de purificação por PCR QIAquick (Qiagen) para remover os nucleotídeos e primers livres. Em seguida, uma cauda de nucleotídeos guanidina foi adicionada à extremidade 3' do cDNA utilizando a enzima terminal transferase (NEB) na presença de dGTP de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O cDNA com cauda resultante foi, então, individualizado para PCR utilizando um primer que se hibridizava à região constante da cadeia pesada ou leve e um primer universal que se hibridizava à cauda de guanosina sobre o cDNA. Para cadeias pesada e leve, o primer universal 5'TATATCTA GAATTCCCCCCCCCCCCCCCC3' SEQ ID NO: 11 foi utilizado. Para amplificar a cadeia leve, o primer 5'TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAA

GATGGATACAGTTGGTGC3' (SEQ ID NO: 12) foi utilizado, enquanto que a cadeia pesada foi amplificada utilizando o primer

5'TATAGAGCTCAAGC
TTCCAGTGGATAGAC(CAT)GATGGGG(GC)TGT(TC)GTTTTGGC3'
(SEQ ID NO: 13), onde as sequências entre parênteses indicam degenerâncias de base. O DNA amplificado por PCR resultante foi purificado utilizando um kit de purificação por PCR QIAquick (Qiagen) e sequenciado. As reações de PCR foram realizadas e sequenciadas em triplicata para assegurar que nenhum erro era introduzido durante a amplificação dos fragmentos de DNA de aproximadamente 500 pares de base.

B. Humanização de regiões variáveis do mAb

[000331] Para produzir as sequências dos mAbs humanizados, os resíduos de aminoácidos estruturais importantes para a estrutura de CDR foram primeiro identificados. Em paralelo, sequências VH e VL humanas que possuem alta homologia às VH e VL de murino, respectivamente, foram selecionadas dentre sequências de imunoglobulina humana conhecidas. Sequências de CDR do mAb de murino, junto com quaisquer resíduos de aminoácidos estruturais importantes para a manutenção da estrutura das CDRs, se necessário, foram enxertadas nas sequências estruturais humanas selecionadas. Além disso, resíduos de aminoácidos estruturais humanos que se descobriu serem atípicos no subgrupo de região V correspondente foram substituídos pelos resíduos típicos em um esforço para reduzir imunogenicidade potencial do agente ao mAb humanizado resultante. Estas regiões VH e VL humanas foram clonadas em vetores de expressão tais como, porém sem limitações, pCON Gama1 e pCON kappa (Lonza Biologics, Berkshire, Reino Unido), respectivamente. Estes vetores codificam a(s) região(ões) constante(s) dos genes de cadeias pesada e leve de imunoglobulina humana. Células 293F foram transitoriamente transfectadas com estes vetores de expressão utilizando o sistema Effectene (Qiagen, Valencia, CA). Sobrenadantes

celulares contendo mAb humanizado secretado foram coletados sete dias após transfecção e purificados utilizando cromatografia com Proteína A.

C. Geração de células CHO clonadas, estáveis que expressam mAbs humanizados

[000332] A geração de células CHO/linhagens de células estáveis para a produção de quantidades suficientes de mAbs para testar ensaios celulares *in vitro* e no modelo de diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) em hamsters Golden Syrian. Como um exemplo, células CHO K1 SV da Lonza Biologics (Berkshire, Reino Unido) podem ser usadas por meio de seleção com sintetase de glutamina e o sistema de amplificação (GS) para gerar células CHO estavelmente transfectadas. O sistema GS da Lonza proporciona, tipicamente, linhagens de células CHO de alta produção que podem produzir quantidades mensuráveis dos mAbs humanizados.

[000333] Células CHO K1 SV foram expandidas em meio de cultura de células CHO CD (Invitrogen) suplementado com 1X glutamina (Invitrogen) e 1X H/T Supplement (Invitrogen). 1 x 10^7 células viáveis foram submetidas à eletroporação a 290 V, resistência infinita e 960 uF com 40 µg de DNA de plasmídeo linearizado resuspenso em 100 µL de tampão TE estéril. As células foram transfectadas em um frasco T-150 contendo 50 mL de meio CD completo para CHO e incubadas durante aproximadamente 48 horas a 37ºC e 8,0% de CO_2. As células foram centrifugadas e resuspensas em uma densidade final de 3,3 x 10^5 células/mL em meio de seleção GS (CD CHO + 1X GS Supplement (JRH Biosciences) + 1X H/T Supplement) contendo MSX (Sigma) a 100 µM, colocadas a 5000 células viáveis/cavidade em lâminas com 96 cavidades (Corning) e incubadas durante aproximadamente 3-4 semanas até que colônias de células primárias (clones de células transfectadas) começassem a aparecer.

Aproximadamente 300 colônias de células (clones) foram coletadas para produção de mAb recombinante mediante remoção cuidadosa de 20 µL de sobrenadante e realização de ensaio ELISA em um formato com 96 cavidades. Resumidamente, lâminas com 96 cavidades foram revestidas com um anticorpo de captura (anticorpo anti-humano de cabra) e, então, sobrenadantes dos transfectantes de CHO clonados (diluídos a 1:800) foram adicionados para permitir ligação ao anticorpo de captura ligado às cavidades da lâmina. Após lavagem, um anticorpo secundário (anticorpo anti-humano de cabra conjugado à fosfatase alcalina) foi adicionado à lâmina e deixado se ligar ao anticorpo humano na amostra antes de ser lavado para remover a ligação não específica. A lâmina foi, então, analisada com relação à atividade de fosfatase alcalina utilizando um kit 1-Step PNPP (Thermo, Rockford, IL) para identificar os clones que produzem a maior quantidade de anticorpo secretado. Clones que produzem altas quantidades de mAb foram expandidos em meio de cultura de células CHO CD suplementado com 1X glutamina e 1X H/T Supplement. Sobrenadantes de célula contendo mAb humanizado secretado foram coletados e purificados utilizando Proteína A. Os clones que exibem a melhor produção foram subclonados por meio de diluição limitativa e escalonados para produzir quantidades gram de anticorpo monoclonal recombinante humanizado.

D. mAbs humanizados hPA-39, hPA-41 e hPA-50

[000334] Os mAbs humanizados molecularmente clonados foram isolados conforme descrito anteriormente e caracterizados (vide Seção E abaixo). A região constante (CL) de cadeia leve (L) de cada um dos anticorpos humanizados é da classe kappa (κ); a região constante (CH) de cadeia pesada (H) de cada um dos anticorpos humanizados é do isotipo IgG1. Descobriu-se que os mAbs humanizados contendo regiões variáveis (V) únicas se ligam e neutralizam a atividade de

toxina A ou toxina B de *C. difficile.* As regiões V das cadeias L e H dos mAbs humanizados podem formar uma parte de uma molécula de imunoglobulina completa (Ig) ou de anticorpo composta de dois polipeptídeos de cadeia H e dois polipeptídeos de cadeia L, tipicamente ligados por ligação de dissulfeto ou elas podem ser porções ou fragmentos de anticorpo distintos, em particular porções ou fragmentos de anticorpo que se ligam à toxina A e/ou à toxina B e/ou que neutralizam a atividade da toxina. Exemplos não limitativos de fragmentos ou porções de imunoglobulina contendo região V adequados incluem fragmentos F(ab), F(ab') ou $F(ab')_2$.

[000335] mAbs antitoxina A e toxina B de *C. difficile* humanizados foram produzidos de acordo com os procedimentos descritos acima. O processo de humanização proporcionou vários mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados (hmAbs) que se ligam à toxina A e neutralizam a atividade da toxina A sobre células suscetíveis. Exemplos de tais hmAbs incluem mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado que compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 1 (**Fig. 32A**) e uma região C humana de IgG1 e uma sequência polipeptídica de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 3 (**Fig. 33A**) e uma região κ C humana; hmAb antitoxina A de *C. difficile* que compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 2 (**Fig. 32B**) e uma região C humana de IgG1 e uma sequência polipeptídica de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 3 (**Fig. 33A**) e uma região κ C humana; hmAb antitoxina A de *C. difficile* que compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 1 (**Fig. 32A**) e uma região C humana de IgG1 e um polipeptídeo de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 4 (**Fig. 33B**) e uma região κ C humana; e hmAb antitoxina A de *C. difficile* que

compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 2 (**Fig. 32B**) e uma região C humana de IgG1 e uma sequência polipeptídica de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 4 (**Fig. 33B**) e uma região κ C humana. Tais mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados contêm um hmAb PA-39 (hPA-39) da invenção. Imunoglobulina hPA-39 completa que possui duas cadeias L e duas cadeias H podem ser produzidas em uma célula hospedeira que co-expressa e secreta um polipeptídeo de cadeia H de hPA-39 composto de uma região VH da invenção (por exemplo, SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2) e uma região CH adequada, por exemplo, do isotipo IgG1, tal como está contido dentro de No. de Acesso do Genbank NW_001838121 e um polipeptídeo de cadeia L de hPA-39 composto de uma região VL de hPA-39 da invenção (por exemplo, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4) e uma região CL adequada, por exemplo, do subtipo κ, tal como está contido dentro de No. de Acesso do Genbank NW_001838785.

[000336] Outros exemplos de mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados da invenção incluem mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado que compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 5 (**Fig. 34A**) e uma região C humana de IgG1 e uma sequência polipeptídica de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 7 (**Fig. 35**) e uma região κ C humana; e mAb antitoxina A de *C. difficile* humanizado que compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 6 (**Fig. 34B**) e uma região C humana de IgG1 e uma sequência polipeptídica de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 7 (**Fig. 35**) e uma região κ C humana. Tais mAbs antitoxina A de *C. difficile* humanizados contêm um mAb humanizado PA-50 (hPA-50) da invenção. Imunoglobulina hPA-50 completa que possui duas cadeias L e duas cadeias H podem

ser produzidas em uma célula hospedeira adequada que co-expressa e secreta um polipeptídeo de cadeia H de hPA-50 composto de uma região VH da invenção (por exemplo, SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6) e uma região CH adequada, por exemplo, do isotipo IgG1, tal como está contido dentro do No. de Acesso do Genbank NW_001838121 e um polipeptídeo de cadeia L de hPA-50 composto de uma região VL da invenção (SEQ ID NO: 7) e uma região CL, por exemplo, do subtipo κ, tal como está contido dentro do No. de Acesso do Genbank NW_001838785.

[000337] O processo de humanização ainda proporciona mAbs antitoxina B de *C. difficile* humanizados que se ligam à toxina B e neutralizam a atividade da toxina B sobre células suscetíveis *in vitro*. Exemplos de tais hmAbs incluem mAb antitoxina B de *C. difficile* humanizado que compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 8 (**Fig. 36A**) e uma região C humana de IgG1 e uma sequência polipeptídica de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 10 (**Fig. 37**) e uma região κ C humana; e mAb antitoxina B de *C. difficile* humanizado que compreende uma sequência polipeptídica de cadeia H que compreende uma região VH de SEQ ID NO: 9 (**Fig. 36B**) e uma região C humana de IgG1 e uma sequência polipeptídica de cadeia L que compreende uma região VL de SEQ ID NO: 10 (**Fig. 37**) e uma região κ C humana. Tais mAbs antitoxina B de *C. difficile* humanizados contêm um mAb PA-41 humanizado (hPA-41) da invenção. Imunoglobulina hPA-41 completa que possui duas cadeias L e duas cadeias H podem ser produzidas em uma célula hospedeira adequada que co-expressa e secreta um polipeptídeo de cadeia H de hPA-41 composto de uma região VH de hPA-41 da invenção (por exemplo, SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9) e uma região CH adequada, por exemplo, do isotipo IgG1, tal como está contido dentro do No. de

Acesso do Genbank NW_001838121 e um polipeptídeo de cadeia L de hPA-41 composto de uma região VL de hPA-41 da invenção (por exemplo, SEQ ID NO: 10) e uma região CL, por exemplo, do subtipo κ, tal como está contido dentro do No. de Acesso do Genbank NW_001838785.

[000338] Além disso, foram produzidos mAbs humanizados, clonados (hmAbs) que se ligam à toxina A ou à toxina B de *C. difficile* e neutralizam fortemente a atividade da toxina. hmAb PA-50 antitoxina A de *C. difficile* é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de cadeia pesada de hPA-50 de SEQ ID NO: 14 é apresentada na SEQ ID NO: 15, (**Fig. 38B**); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de cadeia leve de hPA-50 de SEQ ID NO: 16 é apresentada na SEQ ID NO: 17. (**Fig. 38A**). hmAb PA-39 antitoxina A de *C. difficile* é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de cadeia pesada de hPA-39 de SEQ ID NO: 18 é apresentada na SEQ ID NO: 19, (**Fig. 39B**); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de cadeia leve de hPA-39 de SEQ ID NO: 20 é apresentada na SEQ ID NO: 21 (**Fig. 39A**). hmAb PA-41 antitoxina B de *C. difficile* é composto de dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia pesada contendo uma região VH e uma região CH

humana e dois polipeptídeos de cadeia pesada, cada cadeia leve contendo uma região VL e uma região CL humana. A sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de cadeia pesada de hPA-41 de SEQ ID NO: 22 é apresentada na SEQ ID NO: 23 (**Fig. 40B**); a sequência de ácido nucleico (ou cDNA) que codifica a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de cadeia leve de hPA-41 de SEQ ID NO: 24 é apresentada na SEQ ID NO: 25 (**Fig. 40A**).

[000339] Os anticorpos monoclonais CDA-1 e CDB1 (7, 89) foram preparados para uso como mAbs comparativos. Sequências de DNA que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve de Ig de 3D8 e 124 (documentos WO2006/121422 e US2005/0287150) foram sintetizadas (DNA2.0) e clonadas em vetores pCON-gama1 e pCON-kappa. mAbs de IgG1,□ de comprimento total foram expressos em células CHO-K1SV estavelmente transfectadas e purificados conforme descrito anteriormente. Quando testados com relação à afinidade de ligação às toxinas A e B pelo Biacore, inibição de efeito citopático toxina-mediado e hemaglutinação de acordo com métodos publicados (7), os preparados de CDA1 e CDB1 exibiram os níveis esperados de atividade.

E. Caracterização *in vitro* dos mAbs humanizados

[000340] Experimentos de neutralização de toxina de *C. difficile* foram realizados *in vitro* para comparar a atividade funcional dos mAbs humanizados com aquela dos mAbs parentais de camundongo. Conforme mostrado em **Fig. 29**, mAb PA-41 humanizado (hPA-41) neutralizou potentemente a citotoxicidade da toxina B (EC_{50} de 6 pM) comparado com uma EC_{50} de 9 pM para o mAb de murino PA-41 (mPA-41). Similarmente, descobriu-se que o mAb PA-39 humanizado (hPA-39) e mAb PA-50 humanizado (hPA-50) eram igualmente potentes quando comparado com seus mAbs parentais de murino

quanto à neutralização de toxina A utilizando células CHO-K1 ou células T-84, respectivamente, conforme mostrado na **Fig. 30** para hPA-39 e na **Fig. 31** para hPA-50. Estes resultados demonstram que os mAbs parentais de murino foram humanizados com sucesso e que os mAbs humanizados eram funcionais e eficientes.

[000341] Dos mAbs antitoxina de *C. difficile* examinados nestes estudos, PA-50 exibiu uma curva de neutralização de dose-resposta distinta com coeficientes de Hill que eram, tipicamente, maiores do que dois, indicando inibição cooperativa. Interações cooperativas são comuns na natureza e frequentemente são caracterizadas por curvas de dose-resposta graduais e coeficientes de Hill de >1. Fármacos que mostram atividade cooperativa foram associados à atividade clínica intensificada em tratamento de infecções virais. Além disso, PA-50 se liga à toxina A de um modo multivalente, uma condição que é frequentemente necessária, mas não suficiente para cooperatividade.

Exemplo 11

Geração de fragmentos Fab dos mAbs antitoxina de murino da invenção

A. Preparo de fragmentos Fab

[000342] Fragmentação de Fab foi realizada utilizando um Mouse IgG1 Fab and F(ab')2 Preparation Kit (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante e reagentes fornecidos com o kit. O mesmo protocolo para fragmentação foi utilizado para todos os mAbs; PA-39, PA-41 e PA-50. Resumidamente, pasta de ficina imobilizada (750 µL) foi lavada com tampão de digestão (cisteína a 75 mM, pH de 5,6) antes que aproximadamente 3 mg de mAb fossem adicionados e a mistura foi incubada a 37˚C durante quatro horas com rotação "end-over-end" constante. Uma vez que digestão estava completa, a pasta foi centrifugada e o produto da digestão foi coletado. A pasta foi lavada três vezes com tampão de ligação de Proteína A e o material da

lavagem foi adicionado à digestão terminada. A coluna de Proteína A NAb foi equilibrada com tampão de ligação de Proteína A e a amostra de anticorpo digerida foi adicionada. A coluna e amostra foram incubadas em temperatura ambiente durante 10 minutos. A coluna foi centrifugada a 1000 g durante um minuto para coletar o fluxo passante que continha os fragmentos Fab. A coluna foi lavada três vezes com tampão de ligação de Proteína A. O fluxo passante foi coletado, o tampão trocado por PBS e concentrado.

B. SDS-PAGE de fragmentos Fab

[000343] Amostras foram analisadas via SDS-PAGE utilizando o sistema de gel Novex (Invitrogen) e todos os reagentes listados abaixo eram da Invitrogen, a menos que de outro modo observado. Amostras foram misturadas com tampão de amostra NuPage e reduzidas com DTT. Amostras reduzidas e não reduzidas foram incubadas a 100˚C durante 10 minutos. Após carregamento das amostras (4 µg) em um gel NuPage de Bis Tris a 4-12%, eletroforese foi realizada com tampão de operação MOPS a 180V durante 60 minutos. Após eletroforese, o gel foi incubado com fixador (metanol a 40%, ácido acético a 10%) durante 20 minutos, enxaguado com água e corado com corante Simply Blue durante a noite com rotação constante.

C. Caracterização de Fabs *in vitro*

[000344] Experimentos de neutralização de toxina de *C. difficile in vitro* foram realizados para comparar a atividade funcional dos Fabs (▲) com aquela dos mAbs intactos (■) com base no número de sítios de ligação. O Fab de PA-39 neutralizou fortemente a citotoxicidade de toxina A em células CHO-K1 comparado com PA-39 intacto (EC_{50} de 880 pM e EC_{50} de 200 pM, respectivamente), (**Fig. 41A**). Descobriu-se que o Fab de PA-41 era igualmente potente ao PA-41 intacto em neutralização de atividade da toxina B em células CHO-K1 (EC_{50} de 88 pM e EC_{50} de 80 pM, respectivamente), (**Fig. 41B**). O Fab de PA-50

tinha um valor de EC_{50} de 1,8 nM comparado com um valor de EC_{50} de 100 pM do mAb PA-50 intacto em neutralização de toxina A sobre células T-84 (**Fig. 41C**).

Exemplo 12

Análise imunohistoquímica dos mAbs humanizados antitoxina de *C. difficile* sobre espécimes de tecido humano

[000345] O valor de imunohistoquímica (IHC) no estudo da expressão de um determinado antígeno é que ele permite a avaliação de detalhe micro-anatômico e heterogeneidade em tecidos normais e tumorais. IHC é vantajoso com relação a outros métodos de análise porque ele pode localizar diretamente proteínas a tipos individuais de células. Diferenças na expressão gênica em tecido normal e tumoral podem ser detectadas enquanto, simultaneamente, se observa as alterações no número e composição celular. Limitações desta técnica incluem possíveis resultados falso-negativos em virtude dos baixos níveis de expressão da molécula sob estudo, bem como resultados falso-positivos (reatividade cruzada) em virtude de ligação de anticorpo a epítopos similares ou aqueles epítopos compartilhados por outros antígenos. Para se dirigir a estas limitações, este estudo foi realizado na menor concentração possível de cada um dos anticorpos que mostravam forte coloração específica sobre espécimes de controle de camundongo injetados com toxina específica positiva.

[000346] mAbs humanizados PA-41 e PA-50 foram biotinilados para determinar um padrão de ligação imunohistoquímica em uma seleção de tecidos humanos congelados, que incluíam adrenal, bexiga, medula óssea, mama, cerebelo, córtex cerebral, cérvix, cólon, esôfago, olho, tubo falopiano, coração, íleo, jejuno, rim, fígado, pulmão, nódulo linfático, músculo, ovário, nervo periférico, pâncreas, paratiroide, pituitária, placenta, próstata, pele, intestino delgado, coluna espinhal, baço, estômago, testículo, timo, tiroide, ureter, útero e células

sanguíneas brancas. Um tecido de cada um dos 37 diferentes tipos de tecidos humanos foi corado com cada anticorpo. Ensaios Working IHC foram desenvolvidos para ambos os anticorpos. Um anticorpo de controle de isotipo de IgG1,□ humana irrelevante foi incluído para todas as amostras.

[000347] Para preparo de tecido, espécimes congelados incrustados em composto OCT (Optimal Cutting Temperature Embedding Compound; Sakura, Torrance, CA) foram divididos em 5 mícrons e colocados sobre lâminas de vidro positivamente carregadas. Os métodos de coloração IHC e condições para cada anticorpo e espécime tecidual foram desenvolvidos, testados e otimizados. Um procedimento IHC biotinilado direto foi realizado utilizando seções teciduais não fixadas recentemente cortadas. As seções foram removidas do criostato, deixadas secar ao ar durante 10 minutos em temperatura ambiente, fixadas em etanol a 95% durante 5 minutos em temperatura ambiente e, então, lavadas em três banhos sequenciais de tampão de lavagem de Solução Salina Tamponada com Tris/Tween-20 a 0,1% (TBST; DakoCitomation) durante 3 minutos. Todas as lavagens subsequentes foram realizadas desta maneira. Atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com uma incubação de 5 minutos de Peroxidase Block pronto para uso em temperatura ambiente. Após uma lavagem com tampão, a atividade de biotina endógena foi, então, bloqueada com incubações de 15 minutos cada de avidina, seguido por biotina, com cada etapa seguida por lavagens com tampão. Para PA-41, as lâminas foram, então, incubadas com reagente de bloqueio de proteína Background Sniper durante 10 minutos em temperatura ambiente sem lavagem com tampão depois. As lâminas foram incubadas com o artigo de teste ou reagente de controle negativo (1,25 □g/mL para PA-41 e 10 □g/mL para PA-50) for 30 minutes à temperatura ambiente. O anticorpo primário PA-50 foi

diluído a 1:350 em diluente Dako, enquanto que o anticorpo primário PA-41 foi diluído a 1:3520 em diluente Dako com prolina (250 mM, 0,576 g, Genzyme, CA) e histidina (15 mM, 0,046 g, Genzyme, CA) adicionado a 20 mL de diluente (pH de 7,7). Após lavagens em TBST, reagente de detecção ABC (1:50 em TBST) foi aplicado às seções teciduais para ambos os ensaios de anticorpo e incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente, seguido por lavagens com tampão. A imuno-reação foi visualizada incubando-se com uma solução de tetracloridrato de 3,3□-diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram enxaguados com água desionizada (DI) 3 vezes durante 30-60 segundos cada, contra-coradas com hematoxilina de Mayers modificada (DakoCitomation), tingidas com amônia a 0,2%, desidratadas através de vários graus de álcool, limpas com xileno e cobertas com uma lamínula. A interpretação de lâminas coradas foi realizada por meio de exame microscópico. Em geral, uma revisão morfológica do tecido sobre a lâmina após coloração de anticorpo determinou se uma quantidade adequada de tecido estava presente e se os elementos teciduais normais designados estavam apropriadamente representados. Amostras que falham em ir de encontro aos padrões acima foram rejeitadas da análise pelo patologista do estudo.

[000348] O sistema de classificação incluía uma análise semi-quantitativa de intensidade de coloração. A intensidade de coloração do artigo de teste foi julgada com relação à intensidade do corte de controle tecidual contendo uma seção adjacente corada com um anticorpo de controle negativo. Coloração da seção marcada com o controle de reagente negativo foi considerada coloração "de base". Um escore de "0" indicou nenhuma coloração com relação à base; "1+" indicou coloração fraca; "2+" indicou coloração moderada; e "3+" indicou coloração forte. Em concordância com a prática padrão em

patologia, a intensidade de coloração foi reportada no maior nível de intensidade observado em todos os elementos teciduais.

[000349] Os resultados da análise IHC para os mAbs humanizados PA-50 e PA-41 foram que nenhuma coloração positiva (0%) foi exibida em qualquer um dos espécimes de tecido humano testados. Coloração forte consistente (por exemplo, 3+) foi indicada nos tecidos de controle de músculo de perna de camundongo injetado com toxina (Toxina A para PA-50 e Toxina B para PA-41) por todo o estudo. Para PA-50, nenhuma coloração positiva verdadeira foi observada para qualquer amostra tecidual (isto é, 100% de células mostraram 0% de coloração). Para PA-41, nenhuma coloração positiva verdadeira foi exibida nos 37 tecidos humanos testados, entretanto, coloração positiva fraca (1+) foi observada como a maior intensidade de coloração em fígado normal (em virtude do pigmento lipocromo), pulmão normal (macrófagos pulmonares com um corpo estranho) e músculo normal (reação consistente com coloração artificial). Tais valores de coloração fraca para PA-41 foram considerados como sem consequências com relação a todos os controles e em vista de variação mínima de coloração dentro do ensaio.

Exemplo 13

Análise farmacocinética dos mAbs humanizados antitoxina de *C. difficile* em primatas não humanos

[000350] Um estudo farmacocinético (PK) em macacos Cynomolgus não virgens foi conduzido utilizando os mAbs humanizados purificados PA-41 ou PA-50. Neste estudo, macacos Cynomolgus machos, não virgens (*Macaca fascicularis*) receberam injeção intravenosamente com 1 mg/kg/animal ou 5 mg/kg/animal de mAb humanizado PA-41 ou mAb PA-50 purificado. O estudo foi realizado de acordo com as normas e procedimentos do Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

[000351] A Tabela 8 apresenta o formato do estudo PK, mostrando que cada mAb (em uma concentração de 10 mg/kg) foi administrado intravenosamente em dois níveis de dose a animais não virgens.

Tabela 8. Estudo de PK de mAb humanizado em primatas não humanos

Grupo	Tratamento	Via	Nível de Dose (mg/kg/dia)	Concentração (mg/kg)	Volume de Dose (mL/kg/dia)	Nº de Macacos (machos)
1	PA-41	IV	1	10	0,1	3
2	PA-41	IV	5	10	0,5	3
3	PA-50	IV	1	10	0,1	3
4	PA-50	IV	5	10	0,5	3

[000352] Os animais receberam uma única injeção intravenosa de anticorpo de estudo no início do estudo. Depois disso, amostras de sangue foram obtidas por meio de punção venal de vasos periféricos de cada animal em 14 pontos de tempo individuais dentro de 29 dias (isto é, pré-dose; a 0,5, 2, 6, 12 e 24 horas no dia 1 (pós-dose); e nos dias 3, 4, 7, 9, 12, 15, 22 e 29). As amostras de sangue foram coletadas em tubos separadores de soro e mantidas sobre gelo úmido até coagulação. Após coagulação, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1800 g durante 15 minutos a 4˚C para obter soros. Amostras de soro foram armazenadas a -70˚C até uso.

[000353] A concentração de mAb nos soros foi determinada através de ELISA. Lâminas para ELISA com noventa e seis cavidades (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) foram revestidas durante a noite com toxina A (Techlab) ou toxina B (Techlab) a 100 ng/cavidade a 4ºC. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20® a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 200 µl de tampão de bloqueio (PBS

sem cálcio ou magnésio, Tween 20® a 0,1%, caseína a 1%) durante uma hora em temperatura ambiente. O padrão de referência de anticorpo (mAb PA-41 ou mAb PA-50 purificado) foi diluído em soro de cynomolgus virgem empoçado a 1% (Bioreclamation) para gerar uma curva padrão com uma faixa de 0,3 - 4000 ng/mL. Amostras de teste diluídas e padrões foram testados em triplicata e foram incubados durante uma hora em temperatura ambiente.

[000354] As lâminas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com anticorpo de cabra anti-IgG1 humana HRP-conjugado (The Binding Site, San Diego, CA). As lâminas foram reveladas com substrato peroxidase com 1 componente SureAzul TMB 1 (KPL), cessada com ácido clorídrico a 1N (Thermo Fisher Scientific) e lidas sobre um Plate Reader SpectraMax (Molecular Devices) a 450 nm. A concentração de mAb em cada macaco em diferentes pontos de tempo foi calculada utilizando as curvas padrões. Análise farmacocinética não compartimental foi realizada utilizando WinNonLin, Versão 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Os resultados de PK para o mAb humanizado PA-50 são mostrados na **Fig. 42A**; os resultados para o mAb humanizado PA-41 são mostrados na **Fig. 42B.** Para PA-50 em doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg, o $T_{1/2}$ média (Dias) foi de 14,5 □ 0,3 e 12,3 □ 1,5, respectivamente. Para PA-41 em doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg, a $T_{1/2}$ média (Dias) foi de 8,9 □ 1,3 e 9,2 □ 3,3, respectivamente.

Referências

1. Bartlett, J. G., T. W. Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach e A. B. Onderdonk. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. The New England Journal of Medicine 298:531-534.

2. Kyne, L., R. J. Farrell e C. P. Kelly. 2001. Clostridium

difficile. Gastroenterol. Clin North Am 30:753-777.

3. Kelly, C. P. e J. T. LaMont. 2008. Clostridium difficile--more difficult than ever. The New England Journal of Medicine 359:1932-1940.

4. MacCannell, D. R., T. J. Louie, D. B. Gregson, M. Laverdiere, A. C. Labbe, F. Laing e S. Henwick. 2006. Molecular analysis of Clostridium difficile PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. J Clin Microbiol 44:2147-2152.

5. McDonald, L. C., G. E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, Jr., S. V. Kazakova, S. P. Sambol, S. Johnson e D. N. Gerding. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. The New England Journal of Medicine 353:2433-2441.

6. Warny, M., J. Pepin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J. Brazier, E. Frost e L. C. McDonald. 2005. Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366:1079-1084.

7. Babcock, G. J., T. J. Broering, H. J. Hernandez, R. B. Mandell, K. Donahue, N. Boatright, A. M. Stack, I. Lowy, R. Graziano, D. Molrine, D. M. Ambrosino e W. D. Thomas, Jr. 2006. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent Clostridium difficile-induced mortality in hamsters. Infect Immun 74:6339-6347.

8. Bartlett, J. G. 1981. Antimicrobial agents implicated in Clostridium difficile toxin-associated diarrhea of colitis. Johns Hopkins Med J 149:6-9.

9. McFarland, L. V., M. E. Mulligan, R. Y. Kwok e W. E. Stamm. 1989. Nosocomial acquisition of Clostridium difficile infection. The New England Journal of Medicine 320:204-210.

10. Zilberberg, M. D., A. F. Shorr e M. H. Kollef. 2008. Increase in adult Clostridium difficile-related hospitalizations and case-

fatality rate, United States, 2000-2005. Emerg. Infect Dis 14:929-931.

11. Riley, T. V., Codde, J. P. e Rous, I. L. Increased length of hospital stay due to Clostridium difficile-associated diarrhoea. Lancet 345, 455-456. 2-18-1995.

12. O'Brien, J. A., B. J. Lahue, J. J. Caro e D. M. Davidson. 2007. The emerging infectious challenge of clostridium difficile-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. Infect Control Hosp Epidemiol. 28:1219-1227.

13. Redelings, M. D., F. Sorvillo e L. Mascola. 2007. Increase in Clostridium difficile-related mortality rates, United States, 1999-2004. Emerg. Infect Dis 13:1417-1419.

14. Loo, V. G., L. Poirier, M. A. Miller, M. Oughton, M. D. Libman, S. Michaud, A. M. Bourgault, T. Nguyen, C. Frenette, M. Kelly, A. Vibien, P. Brassard, S. Fenn, K. Dewar, T. J. Hudson, R. Horn, P. Rene, Y. Monczak e A. Dascal. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. The New England Journal of Medicine 353:2442-2449.

15. Warny, M. K. C. 2003. Pathogenicity of Clostridium difficile toxins. Washington DC: ASM Press 366:503-524.

16. Kelly, C. P., C. Pothoulakis e J. T. LaMont. 1994. Clostridium difficile colitis. The New England Journal of Medicine 330:257-262.

17. Lyerly, D. M., D. E. Lockwood, S. H. Richardson e T. D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect Immun. 35:1147-1150.

18. McFarland, L. V., H. W. Beneda, J. E. Clarridge e G. J. Raugi. 2007. Implications of the changing face of Clostridium difficile disease for health care practitioners. Am J Infect Control 35:237-253.

19. Drudy, D., T. Quinn, R. O'Mahony, L. Kyne, P. O'Gaora

e S. Fanning. 2006. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in gyrB in toxin-A-negative, toxin-B-positive Clostridium difficile. J Antimicrob Chemother 58:1264-1267.

20. Rupnik, M., N. Kato, M. Grabnar e H. Kato. 2003. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among Clostridium difficile isolates from Asia. J Clin Microbiol 41:1118-1125.

21. Voth, D. E. e J. D. Ballard. 2005. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 18:247-263.

22. Reineke, J., S. Tenzer, M. Rupnik, A. Koschinski, O. Hasselmayer, A. Schrattenholz, H. Schild e C. Eichel-Streiber. 2007. Autocatalytic cleavage of Clostridium difficile toxin B. Nature 446:415-419.

23. Aslam, S., R. J. Hamill e D. M. Musher. 2005. Treatment of Clostridium difficile-associated disease: old therapies and new strategies. Lancet Infect Dis 5:549-557.

24. Musher, D. M., S. Aslam, N. Logan, S. Nallacheru, I. Bhaila, F. Borchert e R. J. Hamill. 2005. Relatively poor outcome after treatment of Clostridium difficile colitis with metronidazole. Clin Infect Dis 40:1586-1590.

25. Pepin, J., M. E. Alary, L. Valiquette, E. Raiche, J. Ruel, K. Fulop, D. Godin e C. Bourassa. 2005. Increasing risk of relapse after treatment of Clostridium difficile colitis in Quebec, Canada. Clin Infect Dis 40:1591-1597.

26. Fekety, R. e A. B. Shah. 1993. Diagnosis and treatment of Clostridium difficile colitis. JAMA 269:71-75.

27. Fekety, R., L. V. McFarland, C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, G. W. Elmer e M. E. Mulligan. 1997. Recurrent Clostridium difficile diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled

in a prospective, randomized, double-blinded trial. Clin Infect Dis 24:324-333.

28. Pothoulakis, C. e J. T. LaMont. 1993. Clostridium difficile colitis and diarrhea. Gastroenterol. Clin North Am 22:623-637.

29. McFarland, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, R. Fekety, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, J. L. Cox, Z. Noorani e . 1994. A randomized placebo-controlled trial of Saccharomyces boulardii in combination with standard antibiotics for Clostridium difficile disease. JAMA 271:1913-1918.

30. McFarland, L. V., G. W. Elmer e C. M. Surawicz. 2002. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent Clostridium difficile disease. Am J Gastroenterol. 97:1769-1775.

31. Kyne, L., M. Warny, A. Qamar e C. P. Kelly. 2000. Asymptomatic carriage of Clostridium difficile and serum levels of IgG antibody against toxin A. The New England Journal of Medicine 342:390-397.

32. Kyne, L., M. Warny, A. Qamar e C. P. Kelly. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea. Lancet 357:189-193.

33. Leav, B., Blair, B., Leney, M., Knauber, M., Reilly, C., Lowy, I., Kohberger, R., Gerding, D. N., Kelly, C., Katchar, K., Baxter, R. e Ambrosino, D. 2008. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent Clostridium difficile associated diarrhea (CDAD). ICAAC/IDSA , Poster B-1295. 2008.

34. Wilcox, M. H., W. N. Fawley, C. D. Settle e A. Davidson. 1998. Recurrence of symptoms in Clostridium difficile infection--relapse or reinfection? J Hosp Infect 38:93-100.

35. Jodlowski, T. Z., R. Oehler, L. W. Kam e I. Melnychuk. 2006. Emerging therapies in the treatment of Clostridium difficile-associated disease. Ann. Pharmacother 40:2164-2169.

36. Missaghi, B., A. J. Valenti e R. C. Owens, Jr. 2008. Clostridium difficile Infection: A Critical Overview. Curr. Infect Dis Rep 10:165-173.

37. Optimer Pharmaceuticals, News Release, November 10. 2008.

38. Louie, T. J., J. Peppe, C. K. Watt, D. Johnson, R. Mohammed, G. Dow, K. Weiss, S. Simon, J. F. John, Jr., G. Garber, S. Chasan-Taber e D. M. Davidson. 2006. Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe Clostridium difficile-associated diarrhea. Clin Infect Dis 43:411-420.

39. Louie, T. G. M. G. D. e. al. 2007. Results of a phase III trial comparing tolevamer, vancomycin and metronidazole in patients with Clostridium difficile-associated diarrhea (CDI). 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

40. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, J. Orellana e J. T. LaMont. 1992. Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to Clostridium difficile toxin A inhibit toxin A-receptor binding. Gastroenterology 102:35-40.

41. Salcedo, J., S. Keates, C. Pothoulakis, M. Warny, I. Castagliuolo, J. T. LaMont e C. P. Kelly. 1997. Intravenous immunoglobulin therapy for severe Clostridium difficile colitis. Gut 41:366-370.

42. Leung, D. Y., C. P. Kelly, M. Boguniewicz, C. Pothoulakis, J. T. LaMont e A. Flores. 1991. Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by Clostridium difficile toxin. J Pediatr 118:633-637.

43. Medarex e Massachusetts Biologic Laboratories, News Release, November 3. 2008.

44. Kamiya, S., K. Yamakawa, X. Q. Meng, H. Ogura e S.

Nakamura. 1991. Production of monoclonal antibody to Clostridium difficile toxin A which neutralizes enterotoxicity but not haemagglutination activity. FEMS Microbiol Lett 65:311-315.

45. Kink, J. A. e J. A. Williams. 1998. Antibodies to recombinant Clostridium difficile toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of C. difficile-associated disease in a hamster model of infection. Infect Immun 66:2018-2025.

46. Lyerly, D. M., C. J. Phelps, J. Toth e T. D. Wilkins. 1986. Characterization of toxins A and B of Clostridium difficile with monoclonal antibodies. Infect Immun 54:70-76.

47. Harlow, E. e Lane, D. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York . 1988.

48. Clark, G. F., H. C. Krivan, T. D. Wilkins e D. F. Smith. 1987. Toxin A from Clostridium difficile binds to rabbit erythrocyte glycolipids with terminal Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc sequences. Arch Biochem Biophys 257:217-229.

49. Anton, P. M., M. O'Brien, E. Kokkotou, B. Eisenstein, A. Michaelis, D. Rothstein, S. Paraschos, C. P. Kelly e C. Pothoulakis. 2004. Rifalazil treats and prevents relapse of clostridium difficile-associated diarrhea in hamsters. Antimicrob Agents Chemother 48:3975-3979.

50. Boss, S. M., C. L. Gries, B. K. Kirchner, G. D. Smith e P. C. Francis. 1994. Use of vancomycin hydrochloride for treatment of Clostridium difficile enteritis in Syrian hamsters. Lab Anim Sci 44:31-37.

51. Freeman, J., S. D. Baines, D. Jabes e M. H. Wilcox. 2005. Comparison of the efficacy of ramoplanin and vancomycin in both in vitro and *in vivo* models of clindamycin-induced Clostridium difficile infection. J Antimicrob Chemother 56:717-725.

52. Kink, J. A. e J. A. Williams. 1998. Antibodies to recombinant Clostridium difficile toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of C. difficile-associated disease in a hamster model of infection. Infect Immun 66:2018-2025.

53. Kokkotou, E., A. C. Moss, A. Michos, D. Espinoza, J. W. Cloud, N. Mustafa, M. O'Brien, C. Pothoulakis e C. P. Kelly. 2008. Comparative efficacies of rifaximin and vancomycin for treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. Antimicrob Agents Chemother 52:1121-1126.

54. Kurtz, C. B., E. P. Cannon, A. Brezzani, M. Pitruzzello, C. Dinardo, E. Rinard, D. W. Acheson, R. Fitzpatrick, P. Kelly, K. Shackett, A. T. Papoulis, P. J. Goddard, R. H. Barker, Jr., G. P. Palace e J. D. Klinger. 2001. GT160-246, a toxin binding polymer for treatment of Clostridium difficile colitis. Antimicrob Agents Chemother 45:2340-2347.

55. McVay, C. S. e R. D. Rolfe. 2000. In vitro and *in vivo* activities of nitazoxanide against Clostridium difficile. Antimicrob Agents Chemother 44:2254-2258.

56. Razaq, N., S. Sambol, K. Nagaro, W. Zukowski, A. Cheknis, S. Johnson e D. N. Gerding. 2007. Infection of hamsters with historical and epidemic BI types of Clostridium difficile. J Infect Dis 196:1813-1819.

57. Fernie, D. S., R. O. Thomson, I. Batty e P. D. Walker. 1983. Active and passive immunization to protect against antibiotic associated caecitis in hamsters. Developmental Biology Standard 53:325-332.

58. Giannasca, P. J., Z. X. Zhang, W. D. Lei, J. A. Boden, M. A. Giel, T. P. Monath e W. D. Thomas, Jr. 1999. Serum antitoxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from Clostridium difficile disease in hamsters. Infect Immun 67:527-538.

59. Kim, P. H., J. P. Iaconis e R. D. Rolfe. 1987. Immunization of adult hamsters against Clostridium difficile-associated ileocecitis and transfer of protection to infant hamsters. Infect Immun 55:2984-2992.

60. Lyerly, D. M., E. F. Bostwick, S. B. Binion e T. D. Wilkins. 1991. Passive immunization of hamsters against disease caused by Clostridium difficile by use of bovine immunoglobulin G concentrate. Infect Immun 59:2215-2218.

61. Kelly, C. P., C. Pothoulakis, F. Vavva, I. Castagliuolo, E. F. Bostwick, J. C. O'Keane, S. Keates e J. T. LaMont. 1996. Anti-Clostridium difficile bovine immunoglobulin concentrate inhibits cytotoxicity and enterotoxicity of C. difficile toxins. Antimicrob Agents Chemother 40:373-379.

62. Delmee, M., M. Homel e G. Wauters. 1985. Serogrouping of Clostridium difficile strains by slide agglutination. J Clin Microbiol 21:323-327.

63. Delmee, M., V. Avesani, N. Delferriere e G. Burtonboy. 1990. Characterization of flagella of Clostridium difficile and their role in serogrouping reactions. J Clin Microbiol 28:2210-2214.

64. Barbut, F., A. Richard, K. Hamadi, V. Chomette, B. Burghoffer e J. C. Petit. 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of Clostridium difficile-associated diarrhea. J Clin Microbiol 38:2386-2388.

65. Carswell, C. I., G. L. Plosker e A. J. Wagstaff. 2001. Daclizumab: a review of its use in the management of organ transplantation. BioDrugs 15:745-773.

66. Wiland, A. M. e B. Philosophe. 2004. Daclizumab induction in solid organ transplantation. Expert Opin Biol Ther 4:729-740.

67. Fenton, C., L. J. Scott e G. L. Plosker. 2004.

Palivizumab: a review of its use as prophylaxis for serious respiratory syncytial virus infection. Paediatr. Drugs 6:177-197.

68. Wu, H., D. S. Pfarr, Y. Tang, L. L. An, N. K. Patel, J. D. Watkins, W. D. Huse, P. A. Kiener e J. F. Young. 2005. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. J Mol Biol 350:126-144.

69. Romero, J. R. Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002:results from four years of palivizumab usage. Pediatr.Infect.Dis 22, S46-S54. 2003.

70. Carter, P., L. Presta, C. M. Gorman, J. B. Ridgway, D. Henner, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. Kotts, M. E. Carver e H. M. Shepard. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 89:4285-4289.

71. Emens, L. A. 2005. Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. Am J Ther 12:243-253.

72. Finn, R. S. e D. J. Slamon. 2003. Monoclonal antibody therapy for breast cancer: herceptin. Cancer Chemother Biol Response Modif. 21:223-233.

73. Giles, F., E. Estey e S. O'Brien. 2003. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. Cancer 982095-2104.

74. Siemoneit, K., S. Cardoso Mda, K. Koerner, A. Wolpl e B. Kubanek. 1995. Human monoclonal antibodies for the immunological characterization of a highly conserved protein domain of the hepatitis C virus glycoprotein E1. Clin Exp Immunol 101:278-83.75. Casale, T. B. 2004. Omalizumab: an effective anti-IgE treatment for allergic asthma and rhinitis. Drugs Today (Barc.) 40:367-376.

76. Holgate, S. T., R. Djukanovic, T. Casale e J. Bousquet. 2005. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic

diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. Clin Exp Allergy 35:408-416.

77. Presta, L. G., S. J. Lahr, R. L. Shields, J. P. Porter, C. M. Gorman, B. M. Fendly e P. M. Jardieu. 1993. Humanization of an antibody directed against IgE. The Journal of Immunology 151:2623-2632.

78. Jordan, J. K. 2005. Efalizumab for the treatment of moderate to severe plaque psoriasis. Ann. Pharmacother 39:1476-1482.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

93. WO2005US0047100 to Diversa

94. Cheknis, AK. e outros. Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005-2007. Anaerobe 15: 230-233

(2009).

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

[000355] Embora a invenção tenha sido descrita em detalhes com a finalidade de ilustração, deve ser entendido que tais detalhes são unicamente para tal finalidade e variações podem ser feitas pelos peritos na arte sem sair do espírito e do âmbito da invenção que é definido pelas reivindicações a seguir.

[000356] Os conteúdos de todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicados citados ao longo de todo este pedido de patente são incorporados aqui como referência.

[000357] A listagem de qualquer referência não é uma admissão de que a referência é a arte anterior.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo:

(a) se liga especificamente à toxina A de *C. difficile* e compreende uma região determinante de complementaridade (CDR) 1 de cadeia pesada que compreende os resíduos de aminoácidos 31 a 35 da SEQ ID NO: 1, uma CDR2 de cadeia pesada que compreende os resíduos de aminoácidos 50 a 65 da SEQ ID NO: 1 e uma CDR3 da cadeia pesada que compreende resíduos de aminoácidos 95 a 102 da SEQ ID NO: 1 na cadeia pesada, e uma CDR1 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 24 a 34 da SEQ ID NO: 3, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 50 a 56 da SEQ IDNO: 3, e uma CDR3 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 89 a 97 da SEQ ID NO: 3 na cadeia leve; ou

(b) se liga especificamente à toxina A de *C. difficile* e compreende uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácidos 31 a 35 da SEQ ID NO: 5, uma CDR2 de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácidos 50 a 55 da SEQ ID NO: 3, e uma CDR3 de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO: 95 a 102 da SEQ ID NO: 5 na cadeia pesada, e uma CDR1 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 24 a 33 da SEQ ID NO: 7, uma CDR2 da cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 49 a 55 de SEQ ID NO: 7, e uma CDR3 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 88 a 94 da SEQ ID NO: 7 na cadeia leve; ou

(c) se liga especificamente à toxina B de *C. difficile* e compreende uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácidos 31 a 36 da SEQ ID NO: 8, uma CDR2 de

cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácidos 50 a 66 da SEQ ID NO: 8, e uma CDR3 de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácidos 99 a 108 da SEQ ID NO: 8 na cadeia pesada, e uma CDR1 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 24 a 34 da SEQ ID NO: 10, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 50 a 56 da SEQ ID NO: 10, e uma CDR3 de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácidos 89 a 97 da SEQ ID NO: 10 na cadeia leve.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste em

(a) um anticorpo produzido pela linhagem celular de hibridoma depositada sob o Nº de Acesso ATCC PTA-9692;

(b) um anticorpo produzido pela linhagem celular de hibridoma depositada sob o Nº de Acesso ATCC PTA-9694;

(c) um anticorpo produzido pela linhagem celular de hibridoma depositada sob o Nº de Acesso ATCC PTA-9888; e

(d) um anticorpo produzido pela linhagem celular de hibridoma depositada sob o Nº de Acesso ATCC PTA-9693.

3. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno neutraliza a toxicidade *in vivo* da toxina A ou da toxina B, ou ambas, de *C. difficile*.

4. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo:

(i) é, ou é de, um anticorpo monoclonal;

(ii) está na forma humanizada;

(iii) é humano; ou

(iv) está na forma quimérica.

5. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado a partir de um fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$ ou um fragmento Fv.

6. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um anticorpo de cadeia única.

7. Anticorpo biespecífico ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) uma primeira região de ligação ao antígeno compreendendo um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à toxina B de *C. difficile*, como definido na reivindicação 1 (c); e

(ii) uma segunda região de ligação ao antígeno compreendendo um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à toxina A de *C. difficile*, como definido na reivindicação 1 (a) ou 1 (b).

8. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido na reivindicação 1 ou 2, e um veículo, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a composição compreende ainda um agente terapêutico adicional.

10. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende (i) um anticorpo ou fragmento de antígeno do mesmo que se liga especificamente à toxina B de *C. difficile*, como definido na reivindicação 1 (c); e (ii), um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à toxina A de *C.*

difficile, como definido na reivindicação 1 (a) ou 1 (b).

11. Anticorpo biespecífico ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo biespecífico ou fragmento de ligação ao antígeno neutraliza a toxicidade da toxina A e da toxina B de *C. difficile*.

12. Linhagem celular de hibridoma, caracterizada pelo fato de que produz um anticorpo, como definido na reivindicação 2, em que a linhagem celular de hibridoma é depositada sob o Nº de Acesso ATCC PTA-9692, PTA-9693, PTA-9494 ou PTA-9888.

13. Uso de pelo menos um anticorpo ou de um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é para preparar uma composição farmacêutica para o tratamento de infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile* ou diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) em um indivíduo.

14. Uso da composição, como definida na reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é para preparar um medicamento para o tratamento de infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile* ou diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) em um indivíduo.

15. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido na reivindicação 1 ou 2, e as instruções de uso.

16. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo neutraliza a toxina A de uma cepa hipervirulenta de *C. difficile* conforme determinado por um valor de EC_{50} variando de $7,7^{-12}$ M a $4,8^{-8}$ M e/ou neutraliza a toxina B de uma cepa hipervirulenta de *C. difficile* conforme determinado por um valor de EC_{50} variando de $1,1^{-11}$ M a $6,5^{-10}$M.

17. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma região CH selecionada de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgE ou IgM, e uma região CL humana selecionada a partir do isotipo κ ou λ.

18. Anticorpo anti-toxina A de *C. difficile*, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente à toxina A de *C. difficile* e em que:

(i) a região V da cadeia L compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 e/ou a região V da cadeia H compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2; ou

(ii) a região V da cadeia L compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7 e/ou a região V da cadeia H compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6.

19. Anticorpo anti-toxina B de *C. difficile*, ou um fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga especificamente à toxina A de *C. difficile*, e em que:

a região V da cadeia L compreende uma sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 10, e/ou

a região V da cadeia H compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9.

20. Anticorpo isolado, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inibe, bloqueia ou previne a toxicidade da toxina A de *C. difficile* ao

inibir, bloquear ou prevenir a internalização e toxicidade citocelular da toxina A e/ou inibe, bloqueia ou previne a toxicidade da toxina B de *C. difficile* ligando-se a um sítio epitópico na região enzimática N-terminal da toxina B.

21. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) SEQ ID NO:15 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam o polipeptídeo de cadeia pesada com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:14;

(b) SEQ ID NO:17 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam o polipeptídeo de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:16;

(c) SEQ ID NO:19 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam o polipeptídeo de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:18;

(d) SEQ ID NO:21 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam o polipeptídeo de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20;

(e) SEQ ID NO:23 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam o polipeptídeo de cadeia pesada com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:22; ou

(f) SEQ ID NO:25 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam o polipeptídeo de cadeia leve com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:24.

22. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende um ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 21.

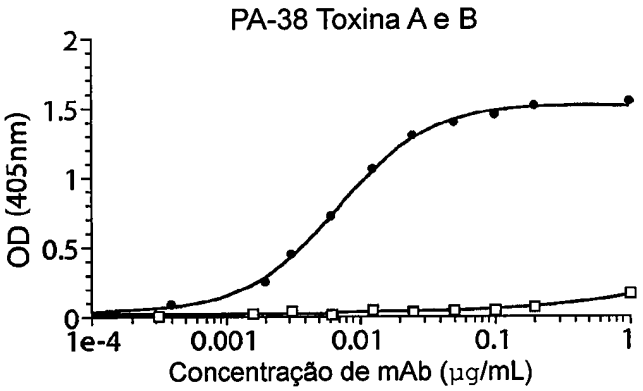


Fig. 1A

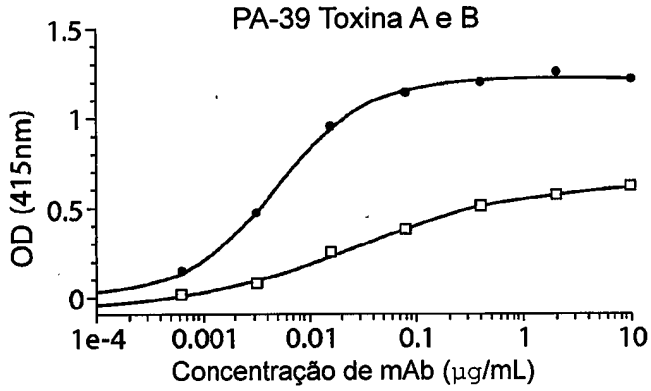


Fig. 1B

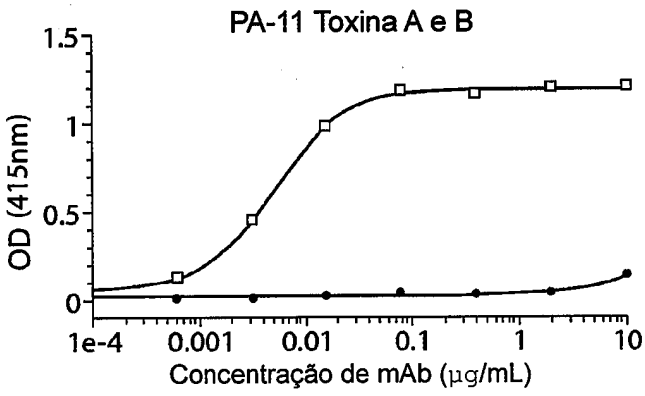


Fig. 1C

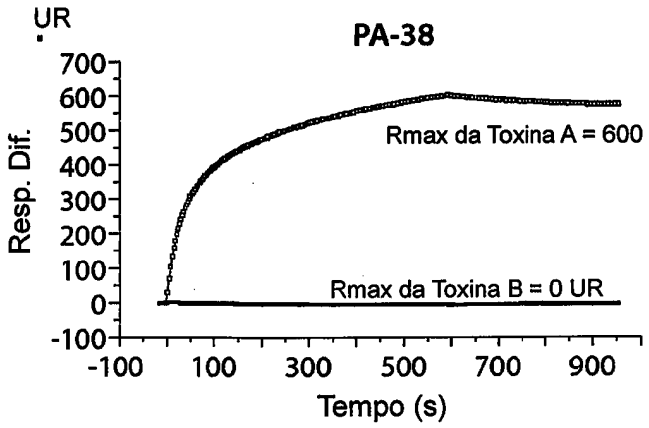

UR
PA-38
Resp. Dif.
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
Rmax da Toxina A = 600
Rmax da Toxina B = 0 UR
-100
100
300
500
700
900
Tempo (s)

Fig. 2A

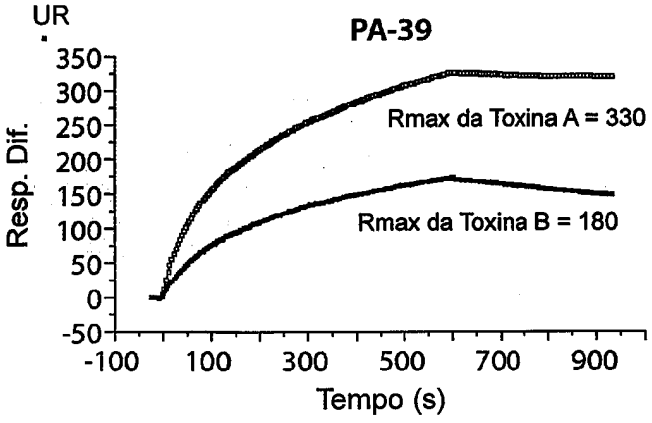

UR
PA-39
Resp. Dif.
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
Rmax da Toxina A = 330
Rmax da Toxina B = 180
-100
100
300
500
700
900
Tempo (s)

Fig. 2B

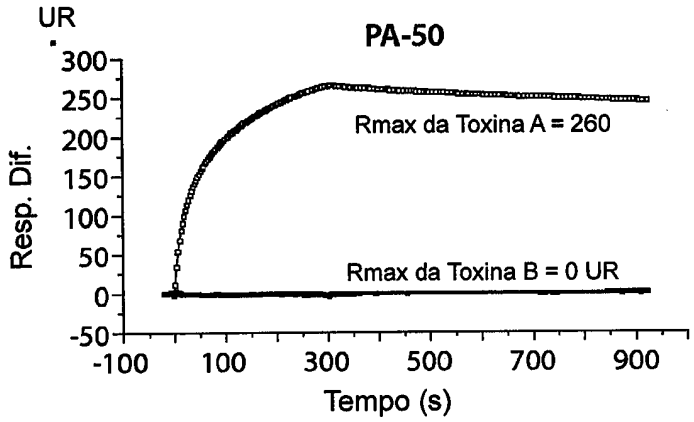

UR
PA-50
Resp. Dif.
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100
100
300
500
700
900
Tempo (s)
Rmax da Toxina A = 260
Rmax da Toxina B = 0 UR

Fig. 2C

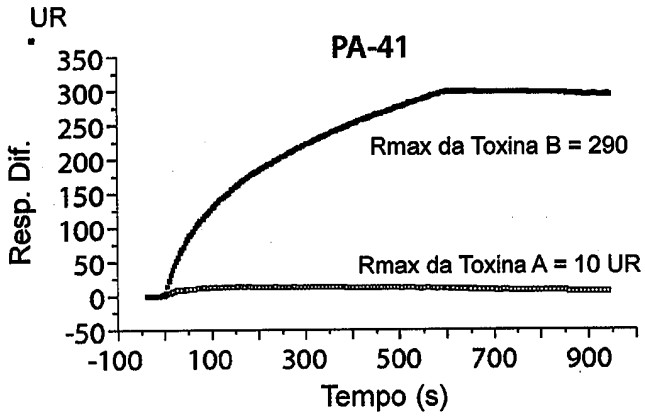

UR
PA-41
Resp. Dif.
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100
100
300
500
700
900
Tempo (s)
Rmax da Toxina B = 290
Rmax da Toxina A = 10 UR

Fig. 2D

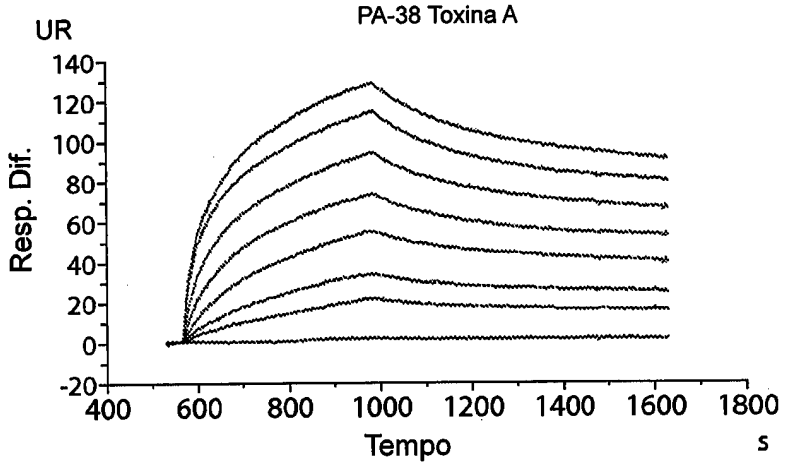

PA-38 Toxina A
UR
Resp. Dif.
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Tempo
s

Fig. 3A

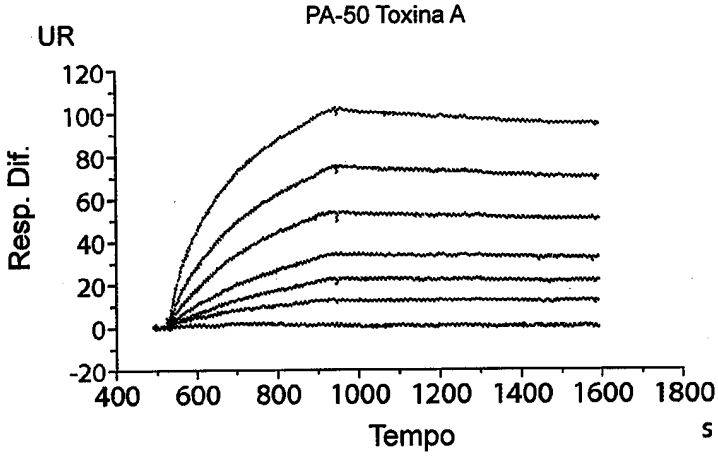

PA-50 Toxina A
UR
Resp. Dif.
120
100
80
60
40
20
0
-20
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Tempo
s

Fig. 3B

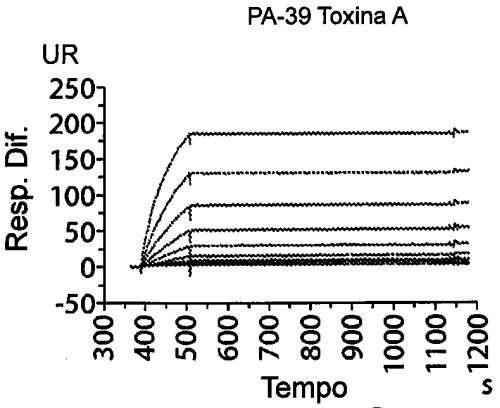


Fig. 3C

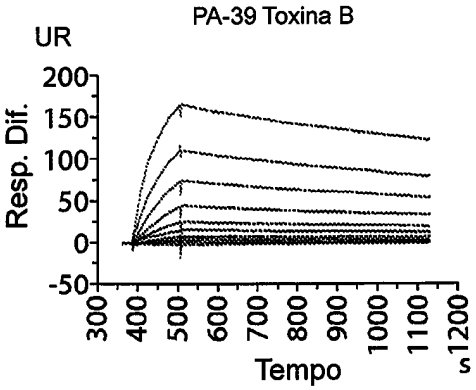


Fig. 3D

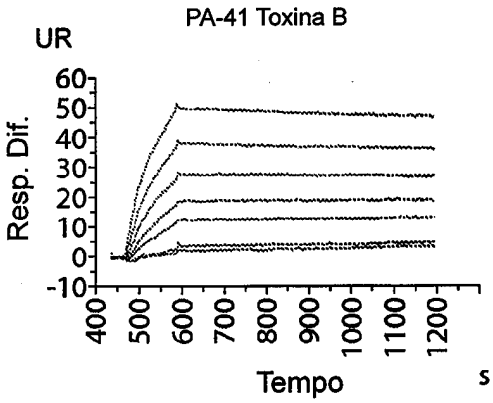


Fig. 3E

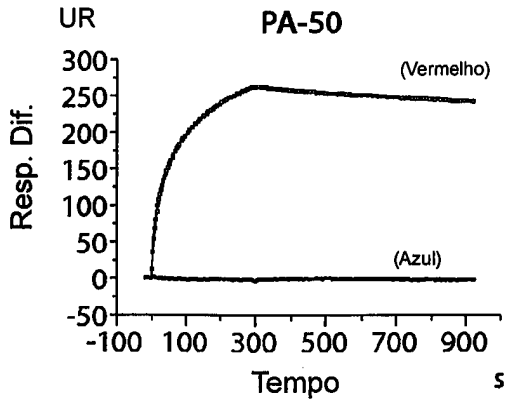


Fig. 3F

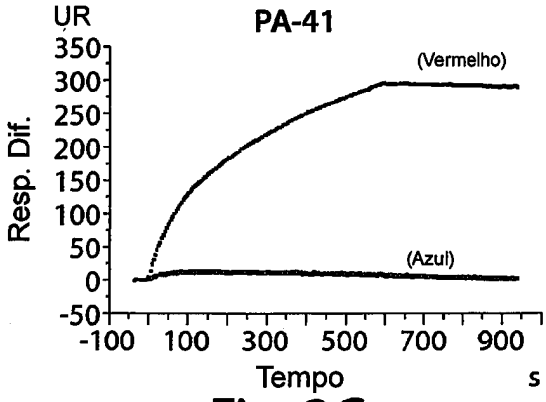


Fig. 3G

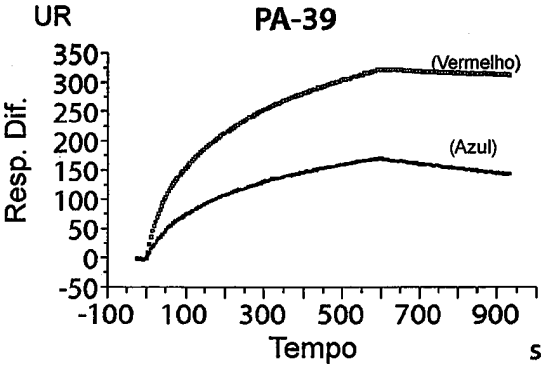


Fig. 3H

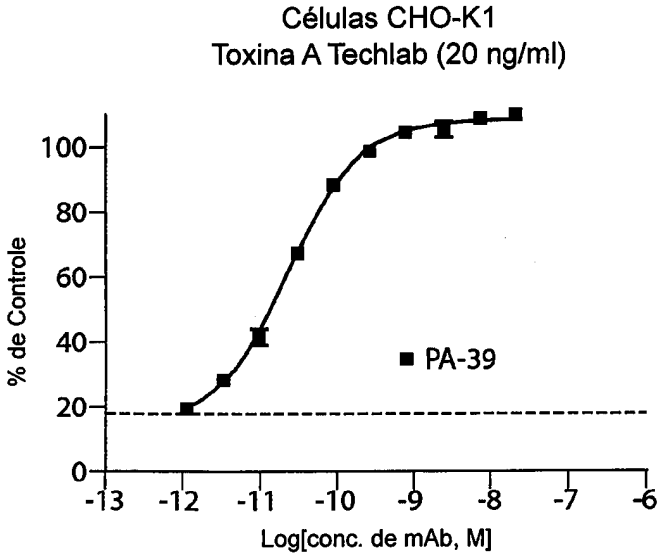

Células CHO-K1
Toxina A Techlab (20 ng/ml)
% de Controle
100
80
60
40
20
0
PA-39
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 4

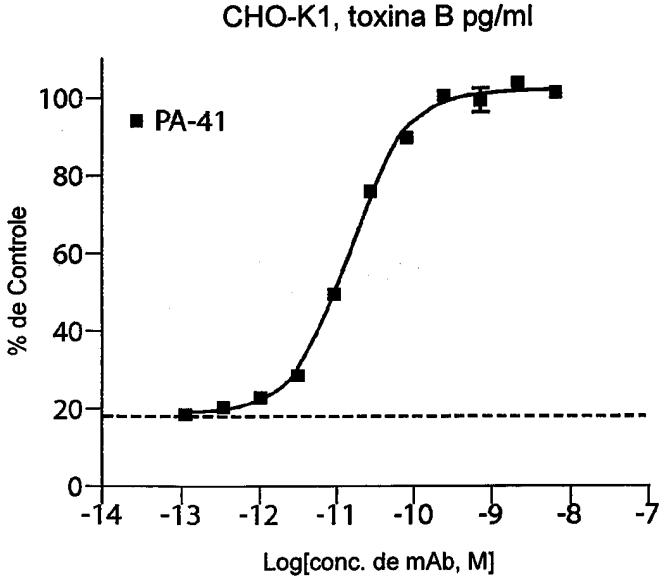

CHO-K1, toxina B pg/ml
% de Controle
100
80
60
40
20
0
PA-41
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 5

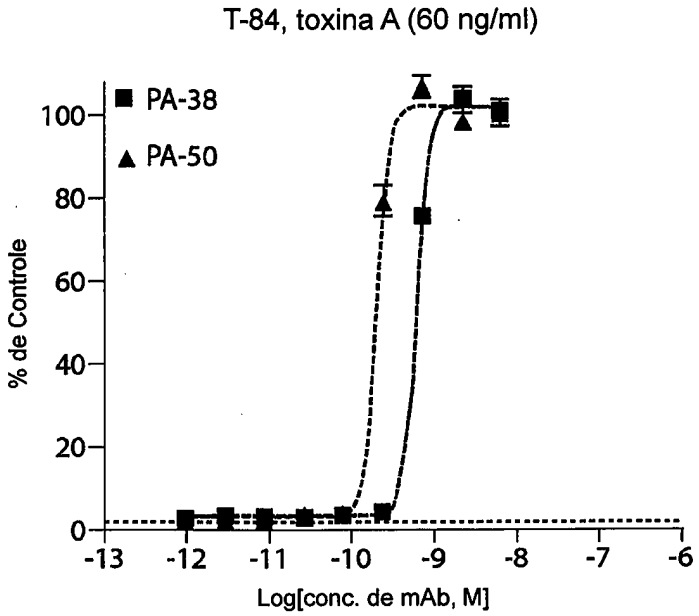

T-84, toxina A (60 ng/ml)
PA-38
PA-50
% de Controle
100
80
60
40
20
0
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 6

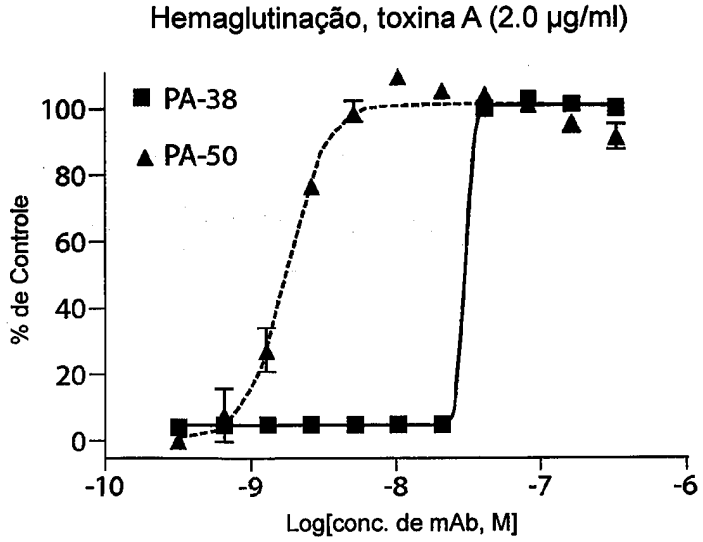

Hemaglutinação, toxina A (2.0 µg/ml)
PA-38
PA-50
% de Controle
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 7

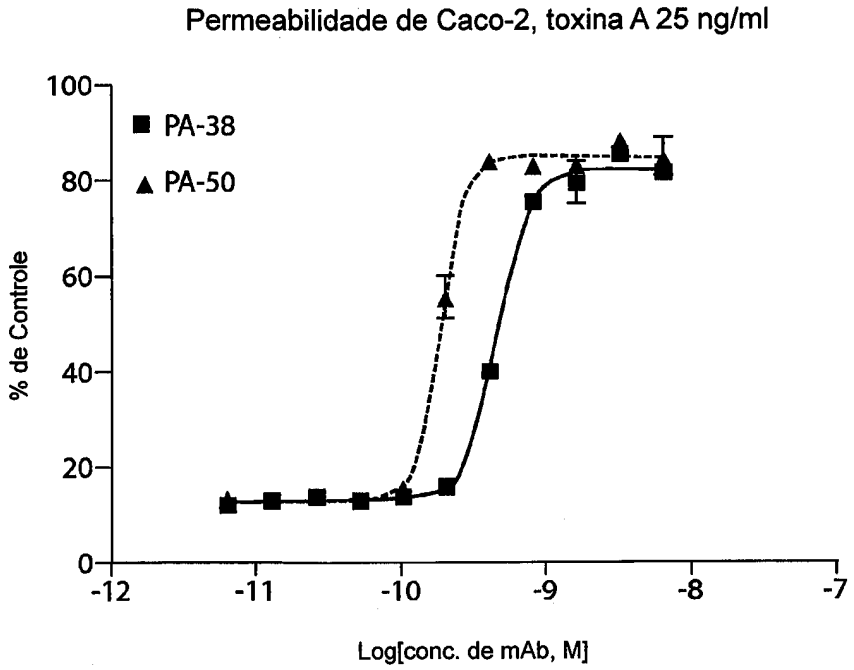

Permeabilidade de Caco-2, toxina A 25 ng/ml
PA-38
PA-50
% de Controle
100
80
60
40
20
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 8

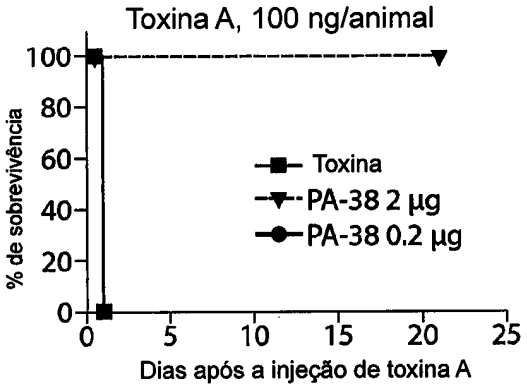


Fig. 9A

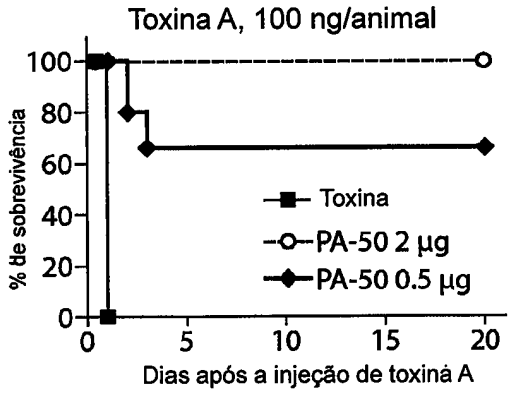


Fig. 9B

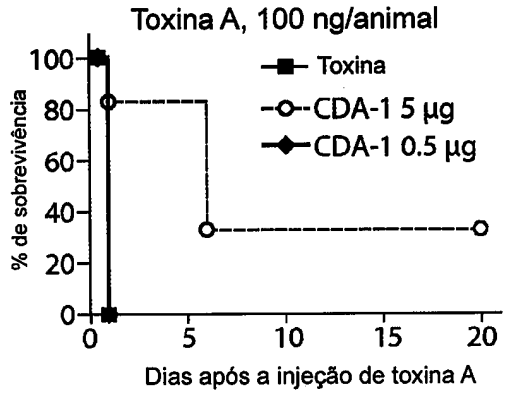


Fig. 9C

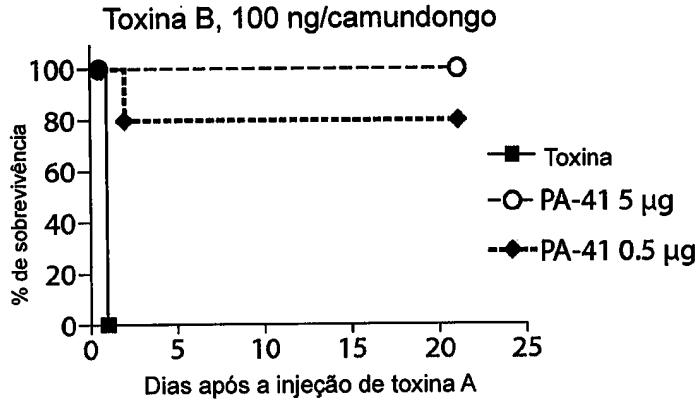

Toxina B, 100 ng/camundongo
% de sobrevivência
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
Dias após a injeção de toxina A
Toxina
PA-41 5 µg
PA-41 0.5 µg

Fig. 10

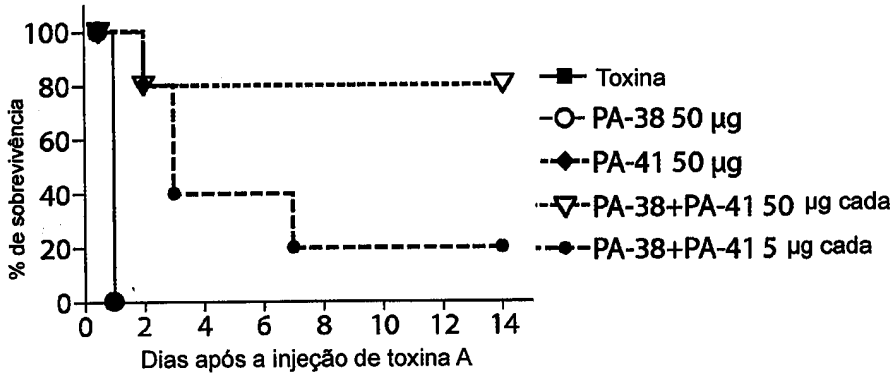

% de sobrevivência
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Dias após a injeção de toxina A
Toxina
PA-38 50 µg
PA-41 50 µg
PA-38+PA-41 50 µg cada
PA-38+PA-41 5 µg cada

Fig. 11

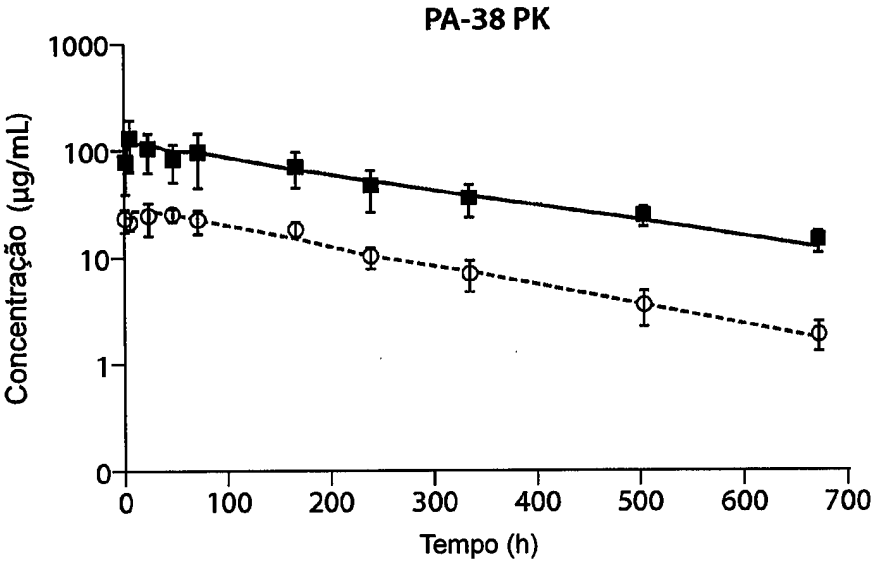


Fig. 12A

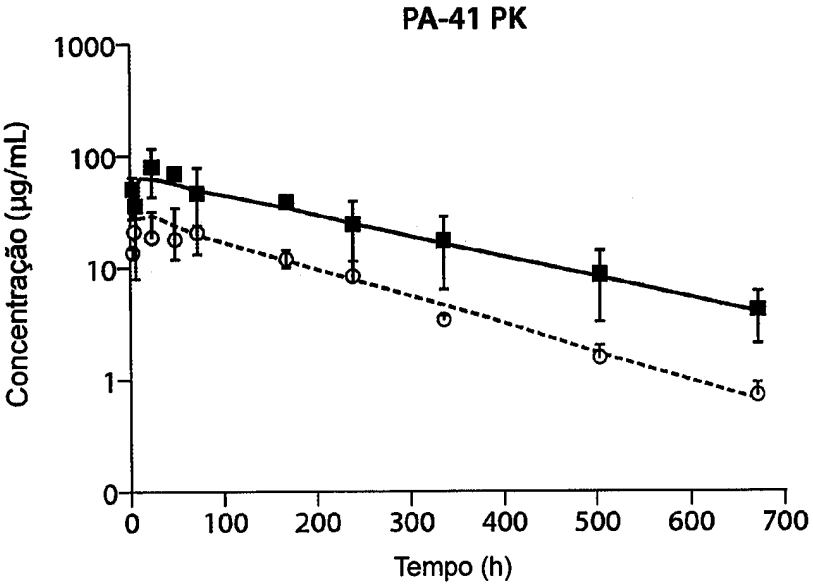


Fig. 12B

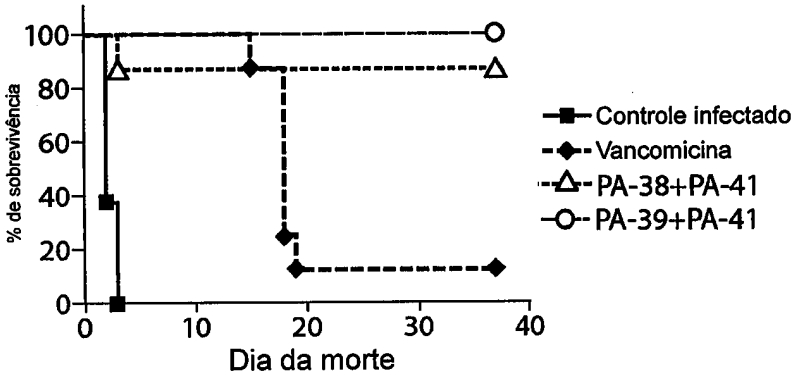

100
80
60
40
20
0
% de sobrevivência
0
10
20
30
40
Dia da morte
Controle infectado
Vancomicina
PA-38+PA-41
PA-39+PA-41

Fig. 13

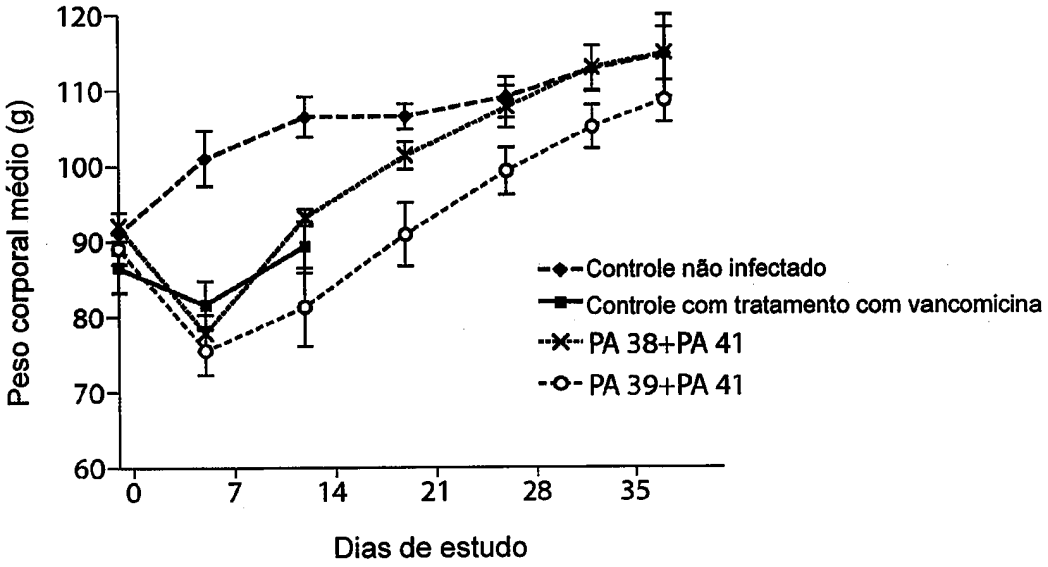

120
110
100
90
80
70
60
Peso corporal médio (g)
0
7
14
21
28
35
Dias de estudo
Controle não infectado
Controle com tratamento com vancomicina
PA 38+PA 41
PA 39+PA 41

Fig. 14

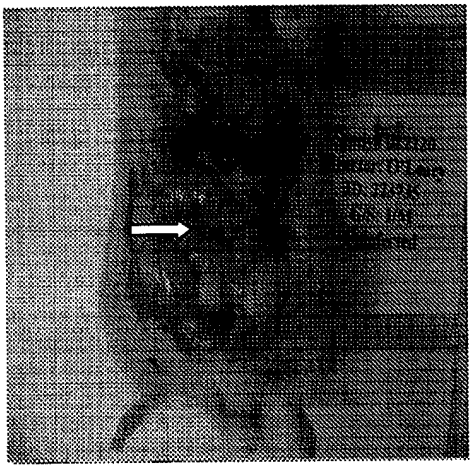


Fig. 15A

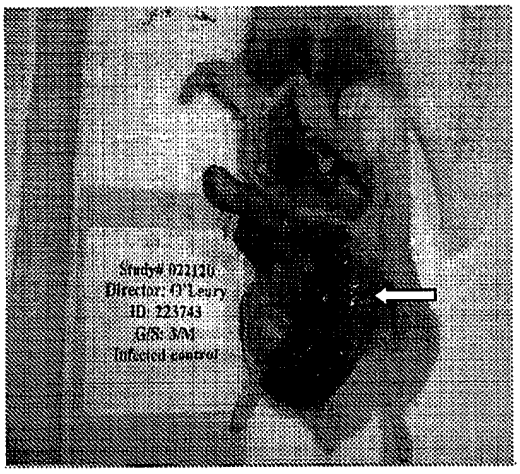


Fig. 15B

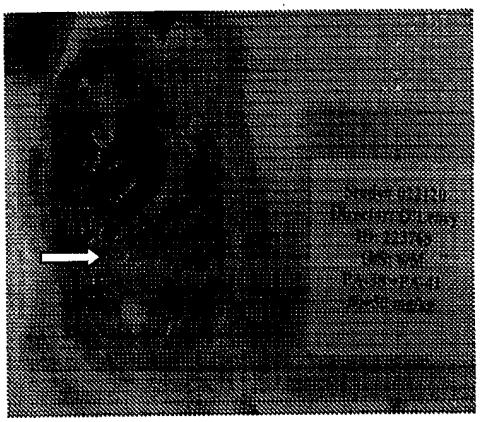


Fig. 15C

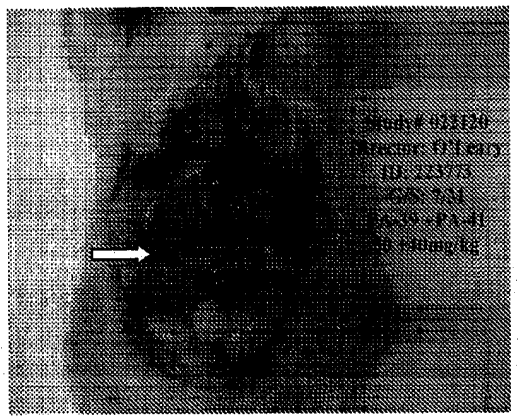


Fig. 15D

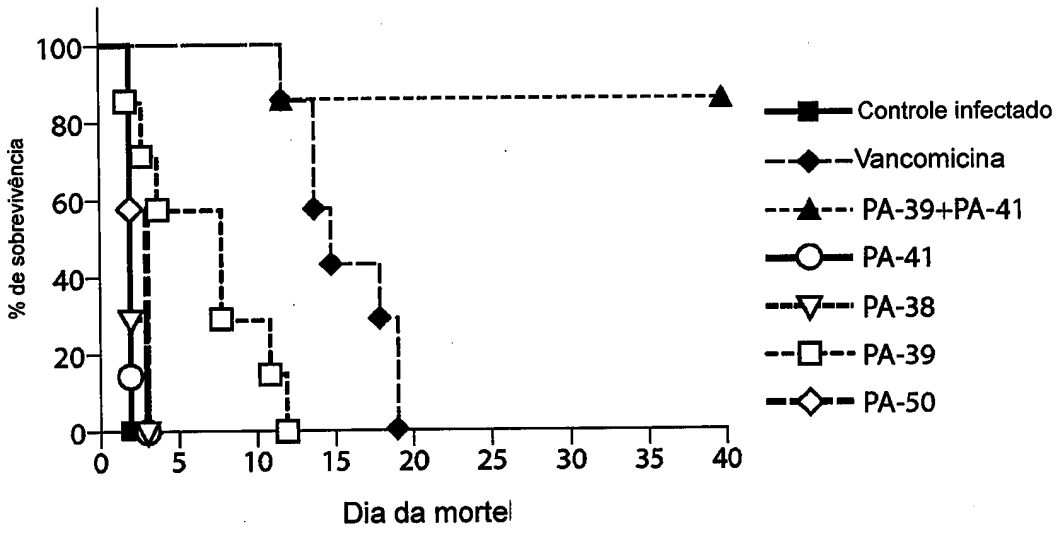

100
80
60
40
20
0
% de sobrevivência
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dia da morte
Controle infectado
Vancomicina
PA-39+PA-41
PA-41
PA-38
PA-39
PA-50

Fig. 16A

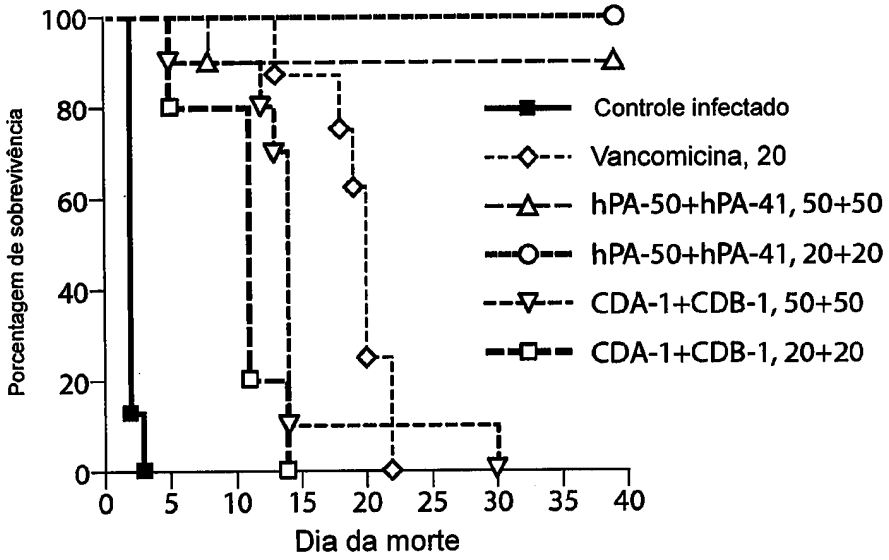


Fig. 16B-1

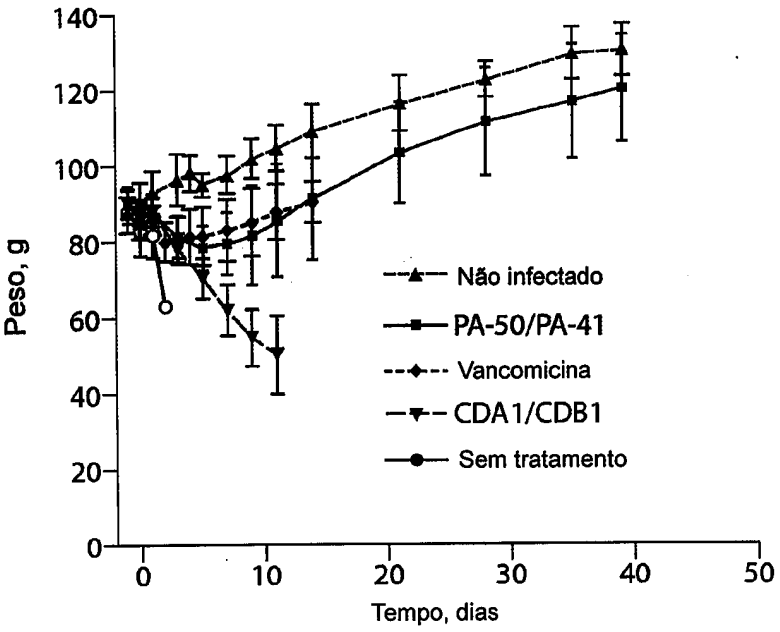


Fig. 16B-2

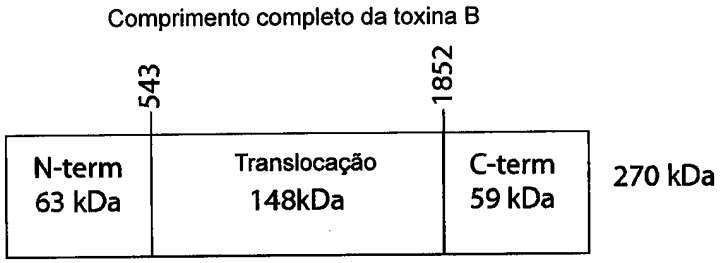


Fig. 17A

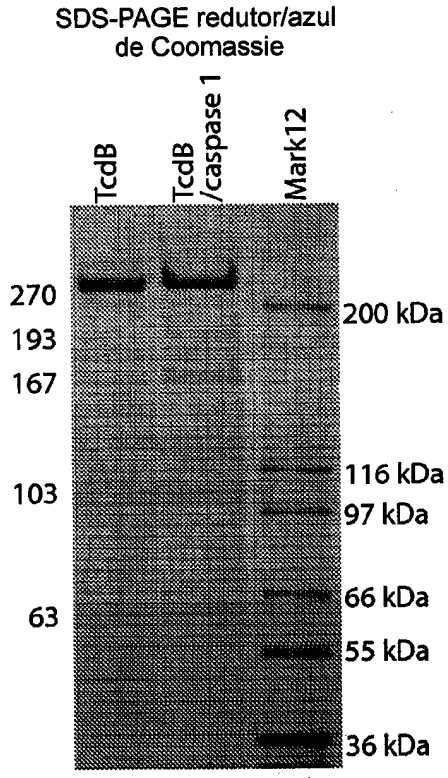


Fig. 17B

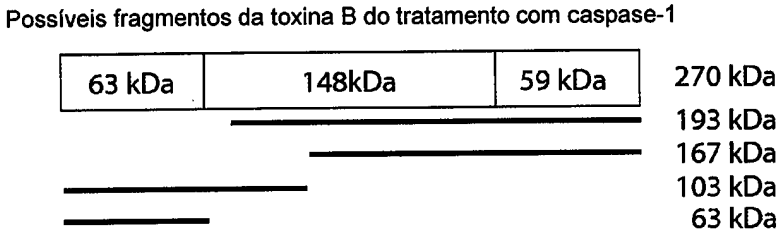


Fig. 17C

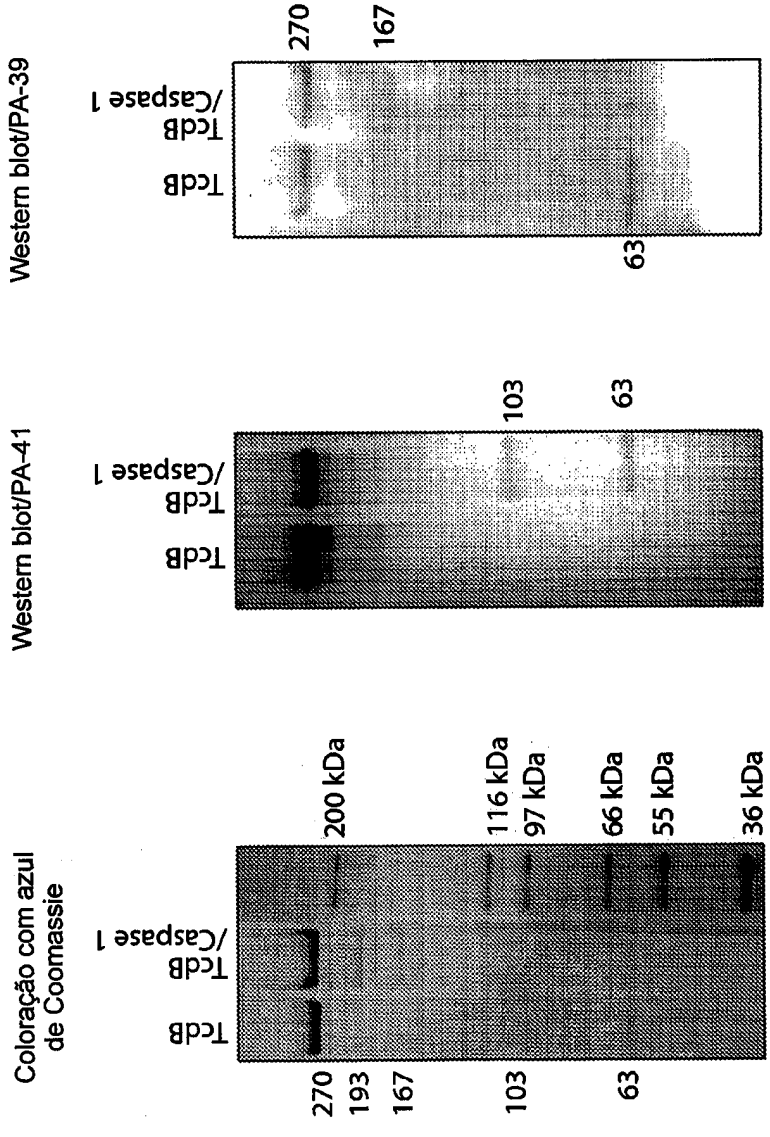


Fig. 18A

Fig. 18B

Fig. 18C

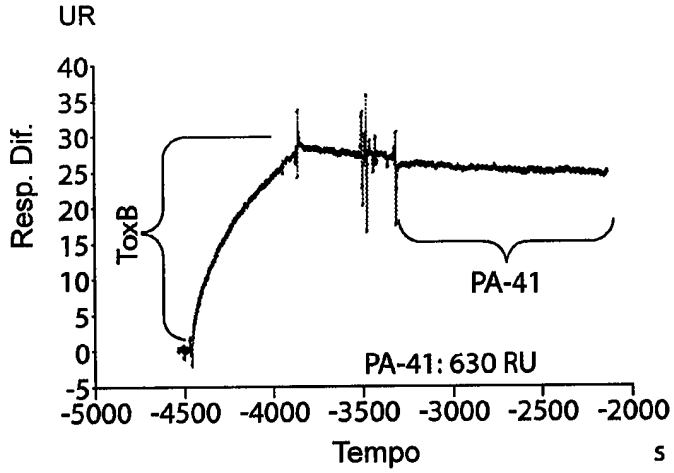


Fig. 19A

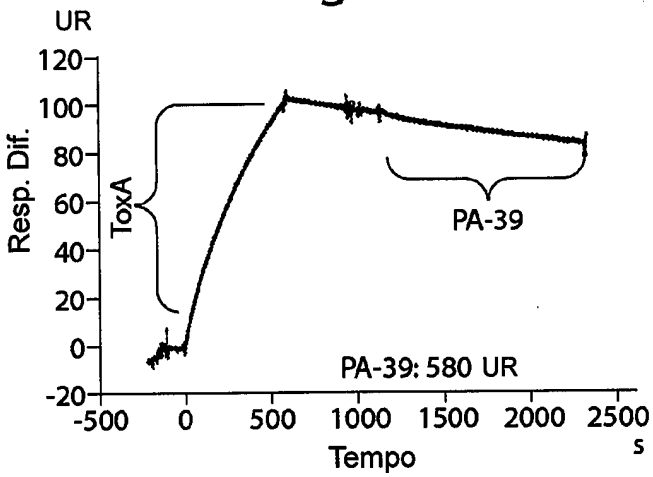


Fig. 19B

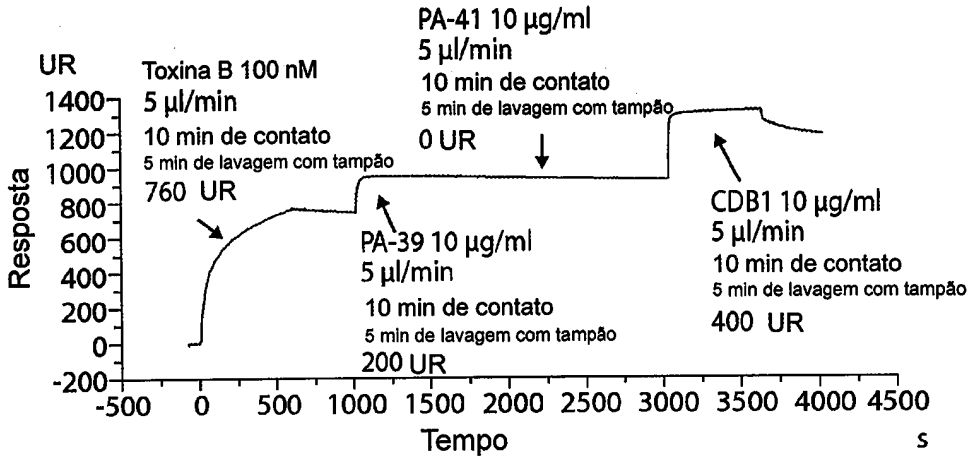


Fig. 19C

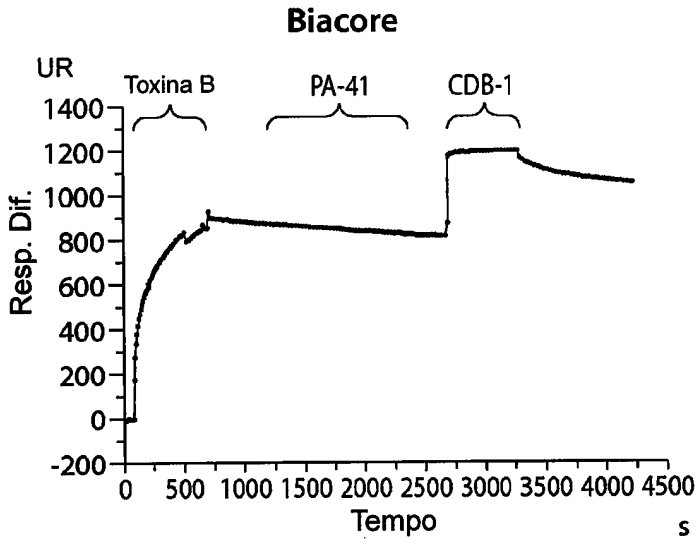


Fig. 19D

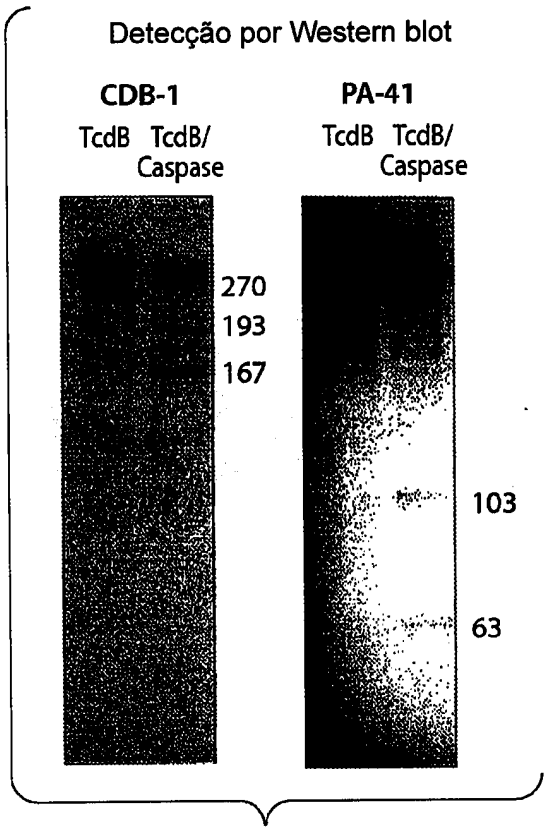


Fig. 19E

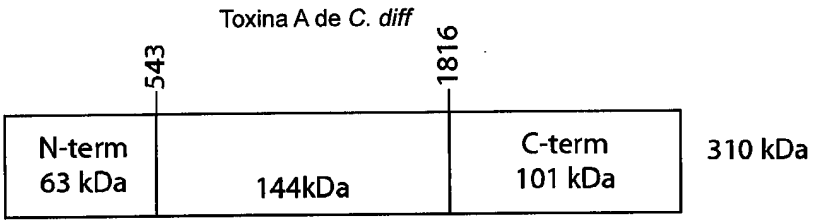


Fig. 20A

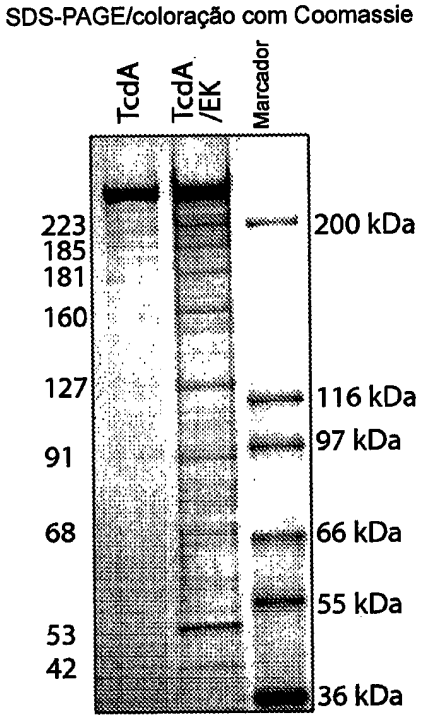
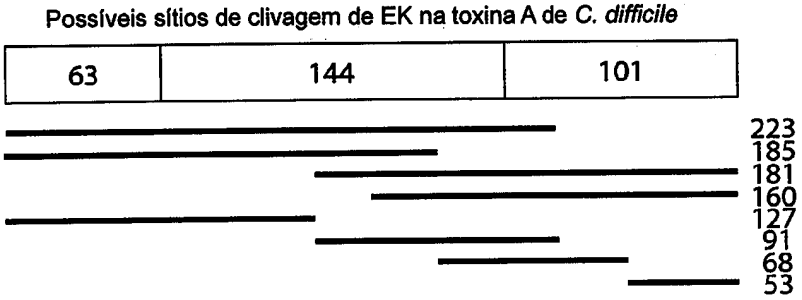


Fig. 20B



- Fragmentos contendo C-term: 223, 181, 160, 91 e 68 kDa
- Fragmentos contendo N-term: 223, 185 e 127 kDa
- Fragmentos que necessitam identificação adicional: 160, 53 e 42 kDa

Fig. 20C

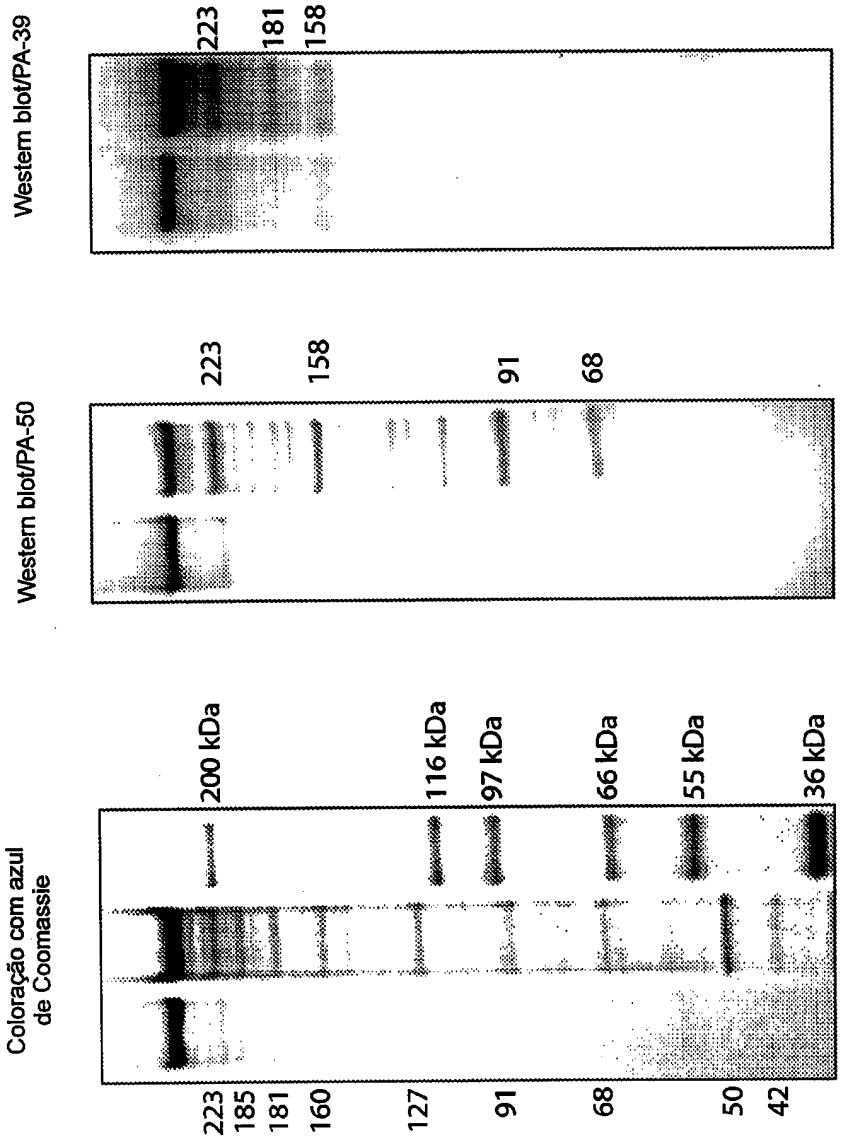


Fig. 21A

Fig. 21B

Fig. 21C

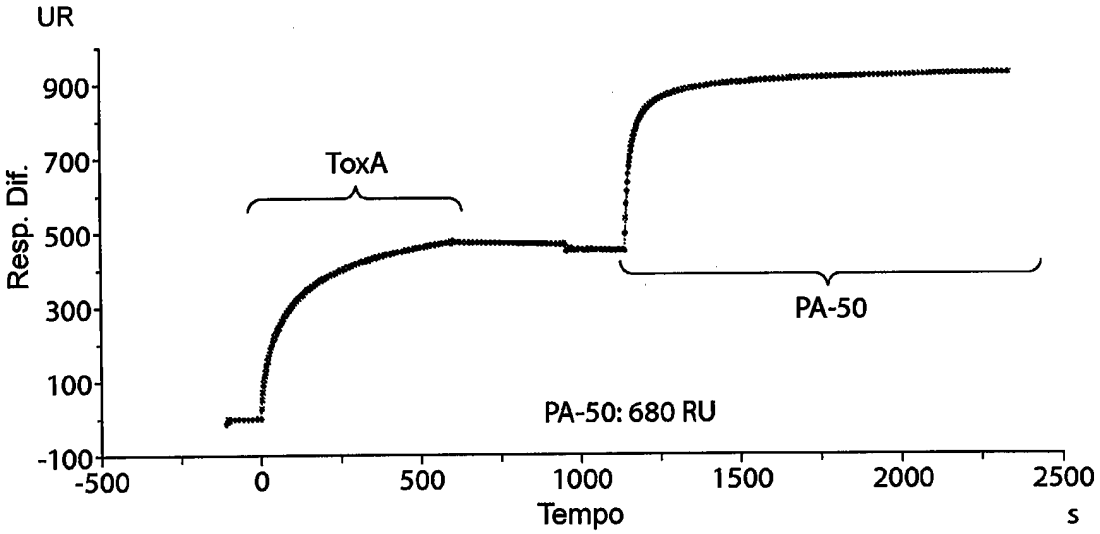


Fig. 22A-1

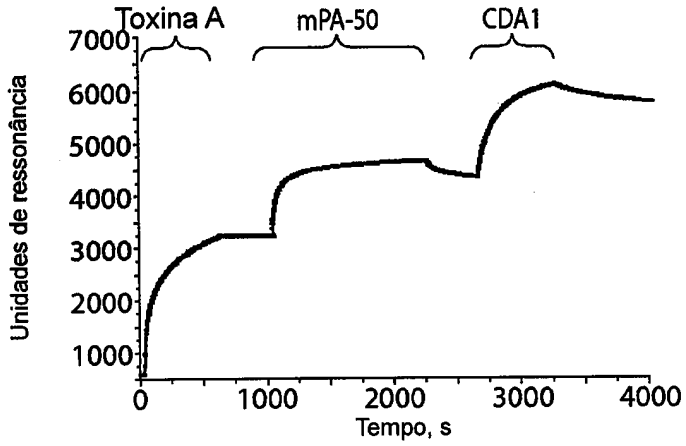


Fig. 22A-2

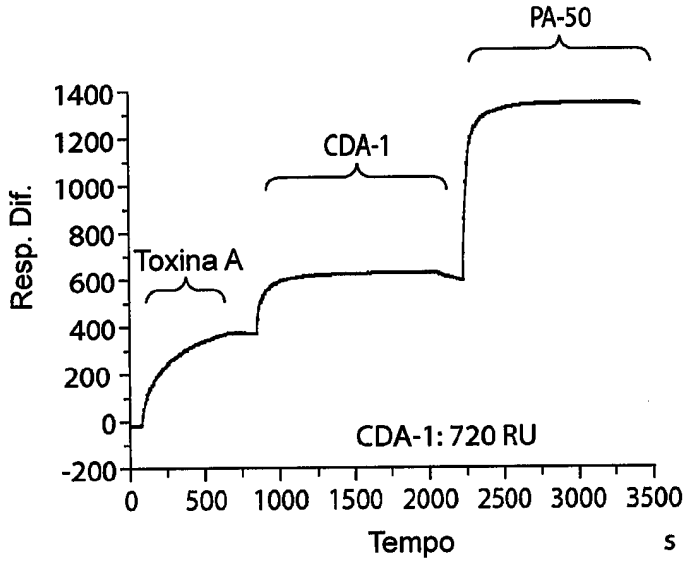


Fig. 22B

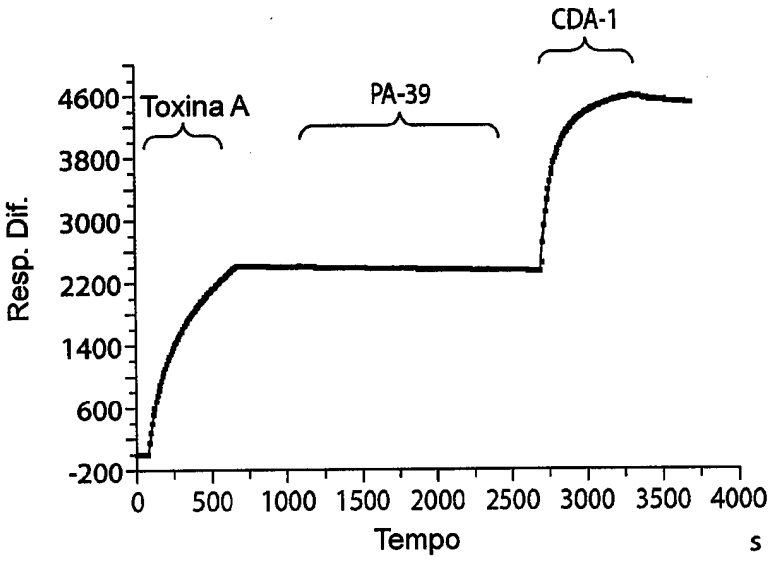


Fig. 22C

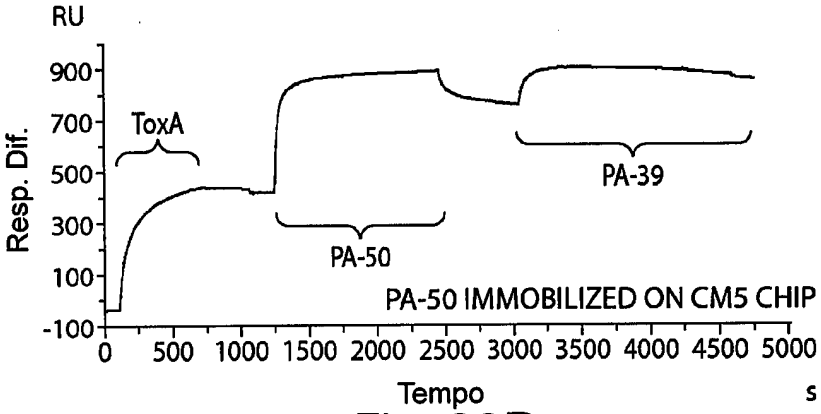


Fig. 22D

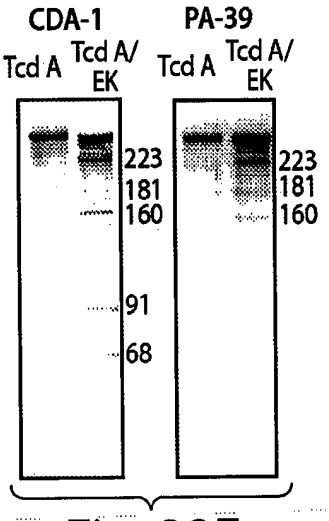


Fig. 22E

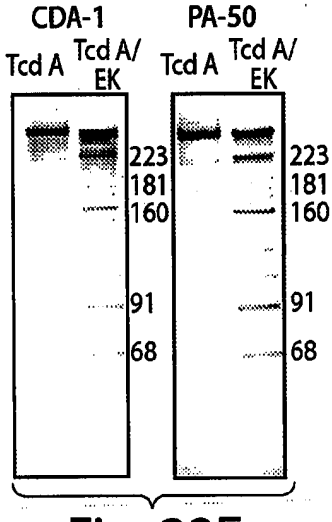


Fig. 22F

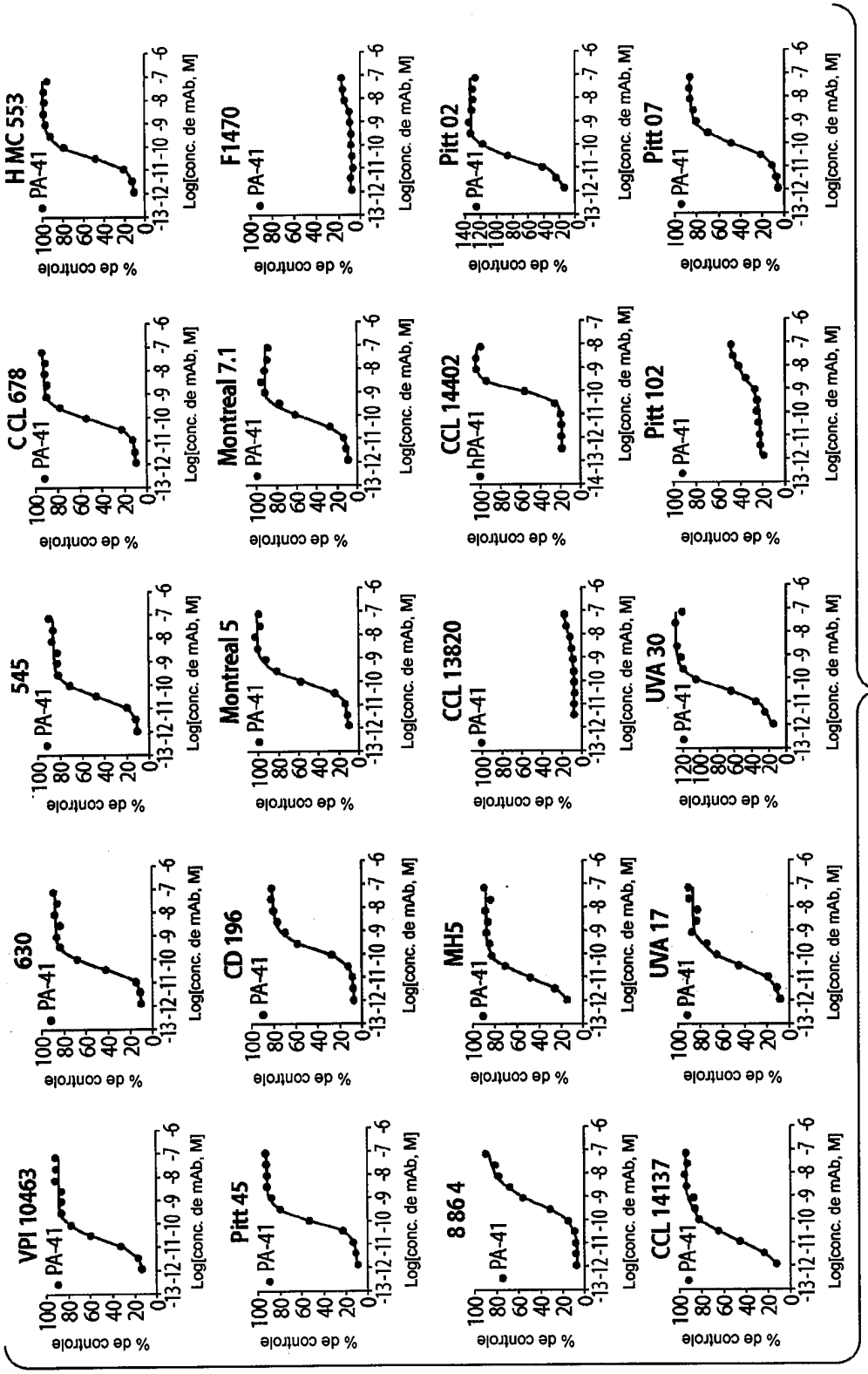

VPI 10463
630
545
C CL 678
H MC 553
Pitt 45
CD 196
Montreal 5
Montreal 7.1
F1470
8 86 4
MH5
CCL 13820
CCL 14402
Pitt 02
CCL 14137
UVA 17
UVA 30
Pitt 102
Pitt 07
PA-41
hPA-41
% de controle
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 23A

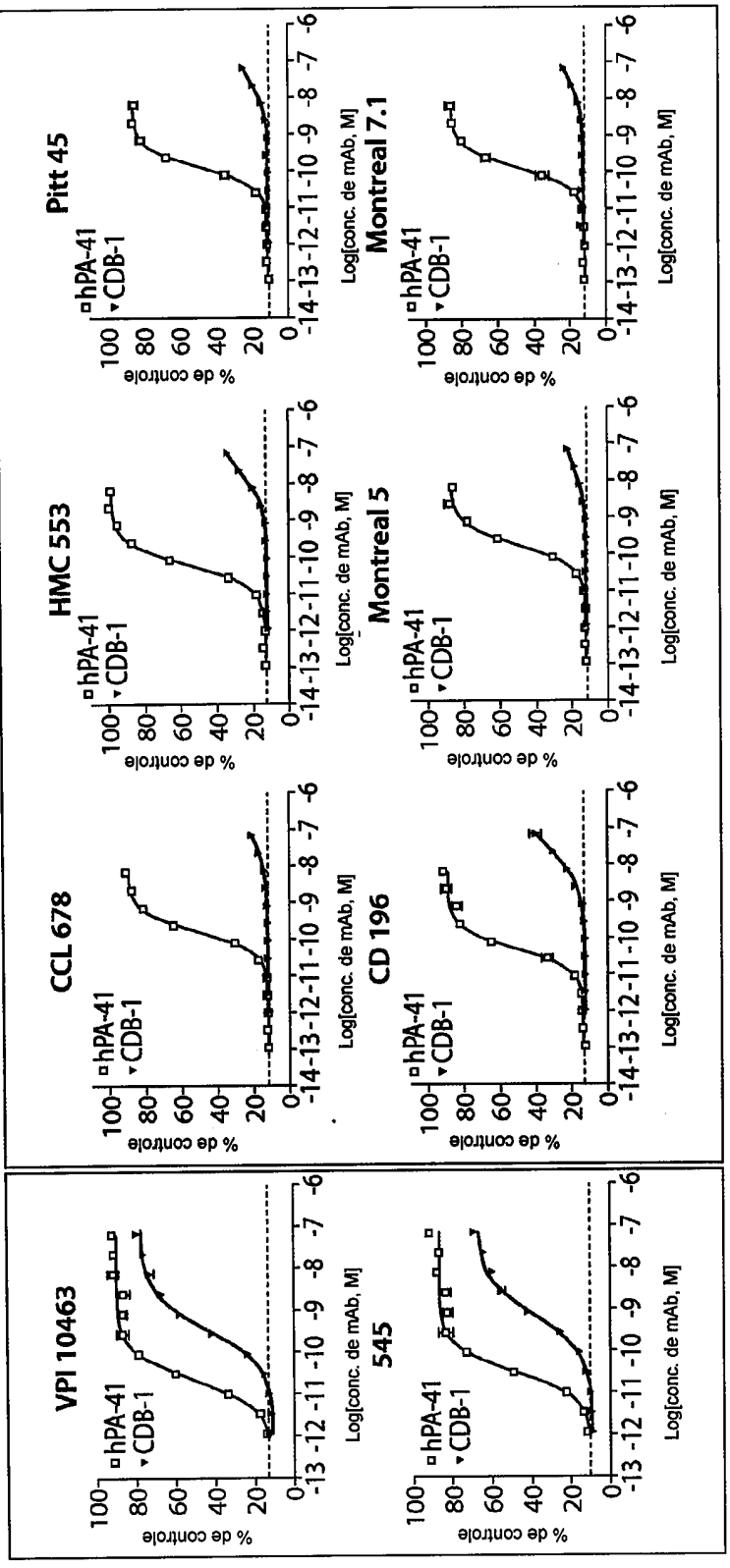
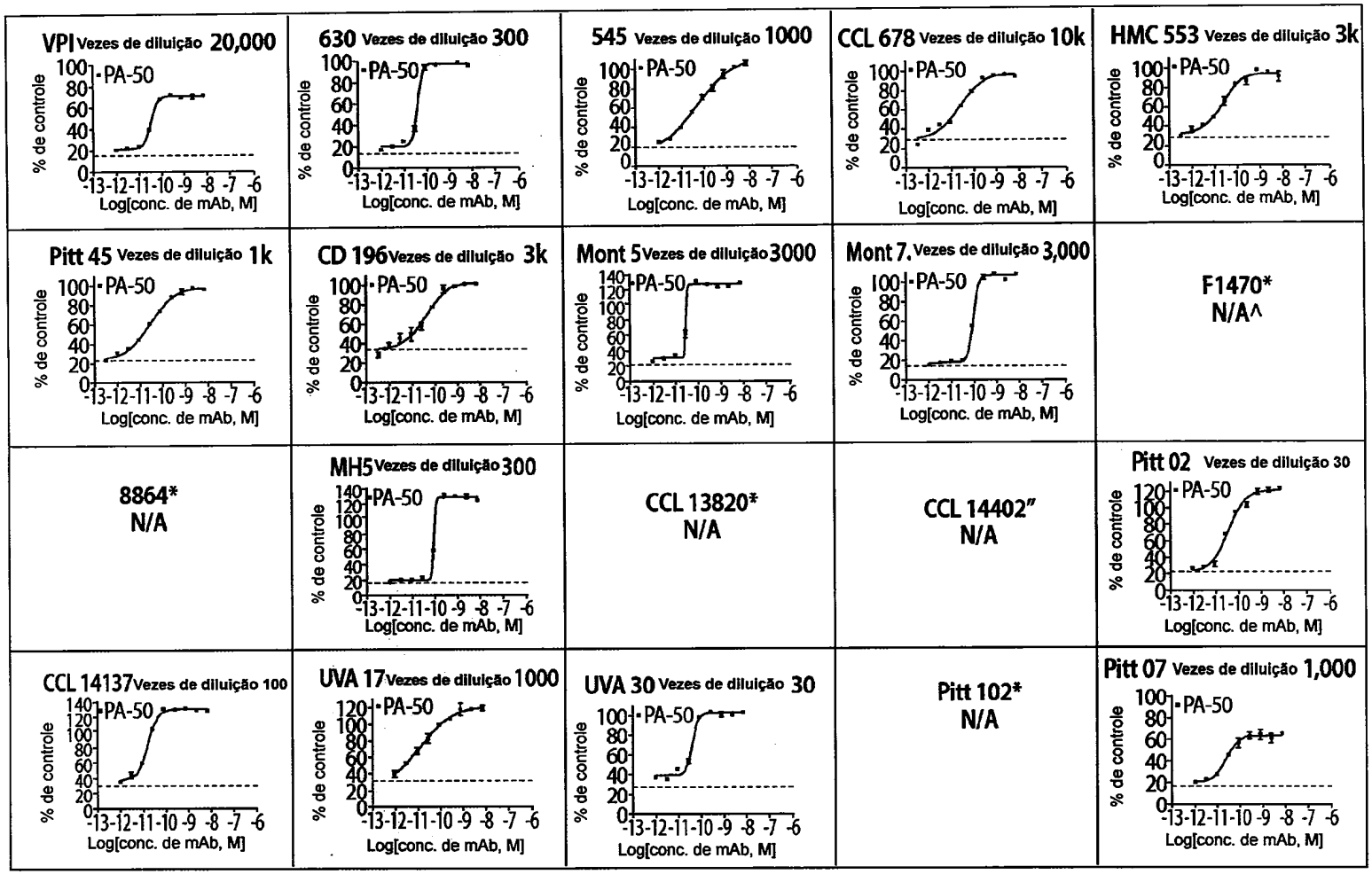

Cepas de ref
Cepas BI/NAP1/027
VPI 10463
545
CCL 678
CD 196
HMC 553
Montreal 5
Pitt 45
Montreal 7.1
hPA-41
CDB-1
% de control
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 23B



*N/A: Não aplicável; nenhuma toxina A foi produzida partindo das cepas de toxina A-/B+ F1470, 8864, CCL 13820 e CCL 14402

" O título da toxina A era muito baixo; nenhuma citotoxicidade mensurável em T-84 utilizando sobrenadante

^Não aplicável; nenhuma toxina A foi produzida partindo das cepas de toxina A-/toxina B+ ou a concentração era muito baixa

Fig. 24A

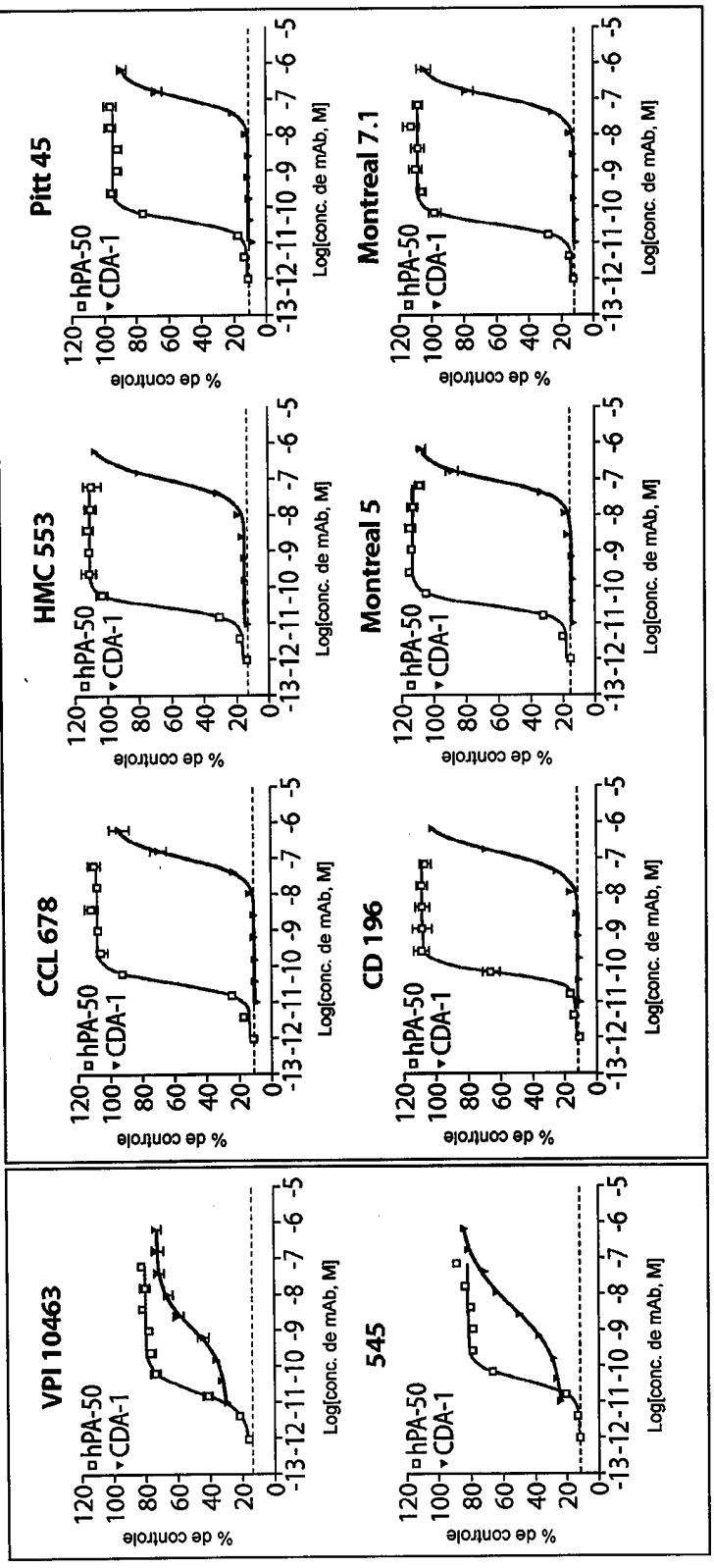
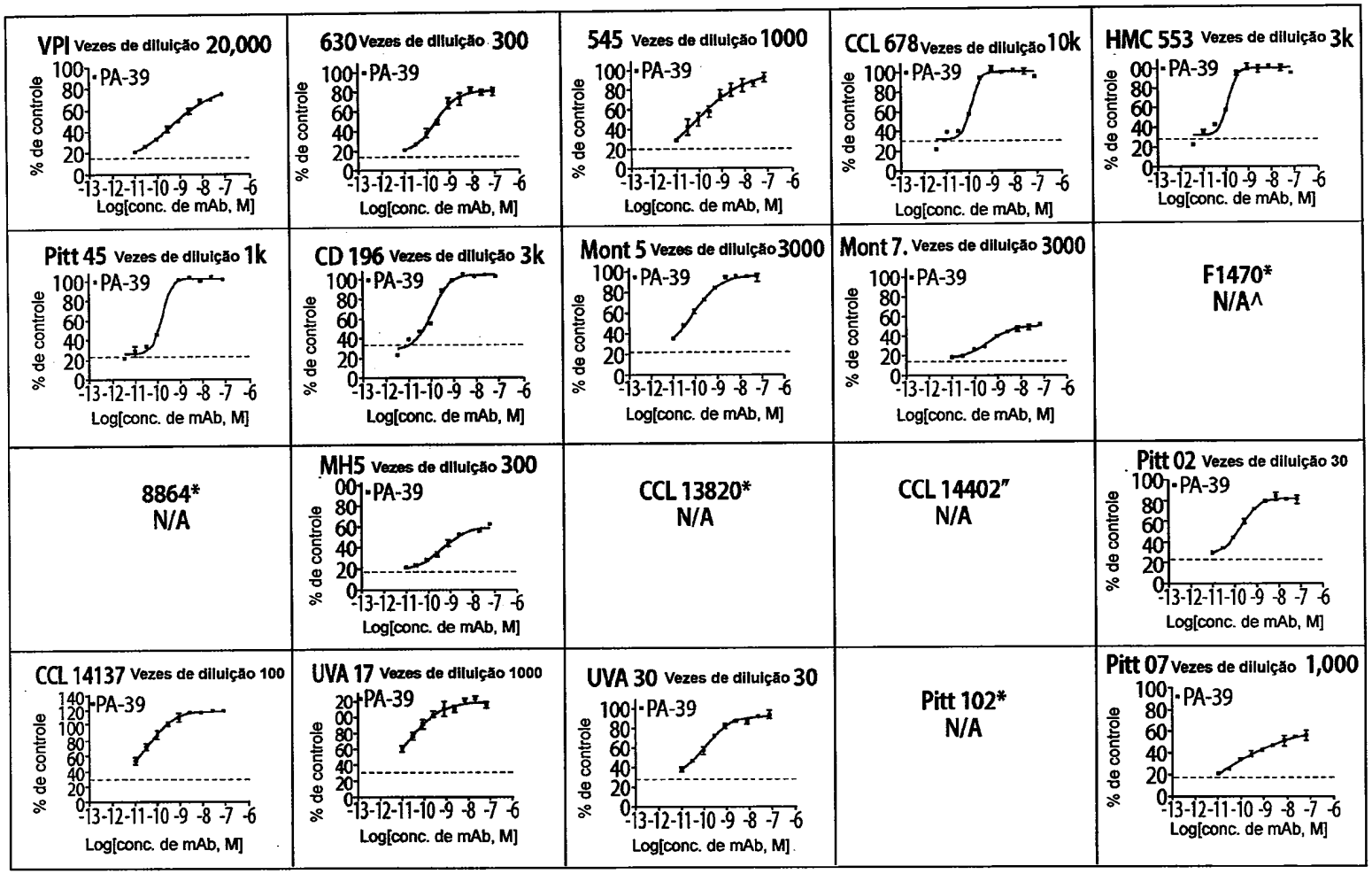

Cepas de ref
Cepas BI/NAP1/027
VPI 10463
545
CCL 678
CD 196
HMC 553
Montreal 5
Pitt 45
Montreal 7.1
hPA-50
CDA-1
% de control
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 24B



*N/A: Não aplicável; nenhuma toxina A foi produzida partindo das cepas de toxina A-/B+ F1470, 8864, CCL 13820 e CCL 14402

" O título da toxina A era muito baixo; nenhuma citotoxicidade mensurável em T-84 utilizando sobrenadante

^Não aplicável; nenhuma toxina A foi produzida partindo das cepas de toxina A-/toxina B+ ou a concentração era muito baixa

Fig. 25A

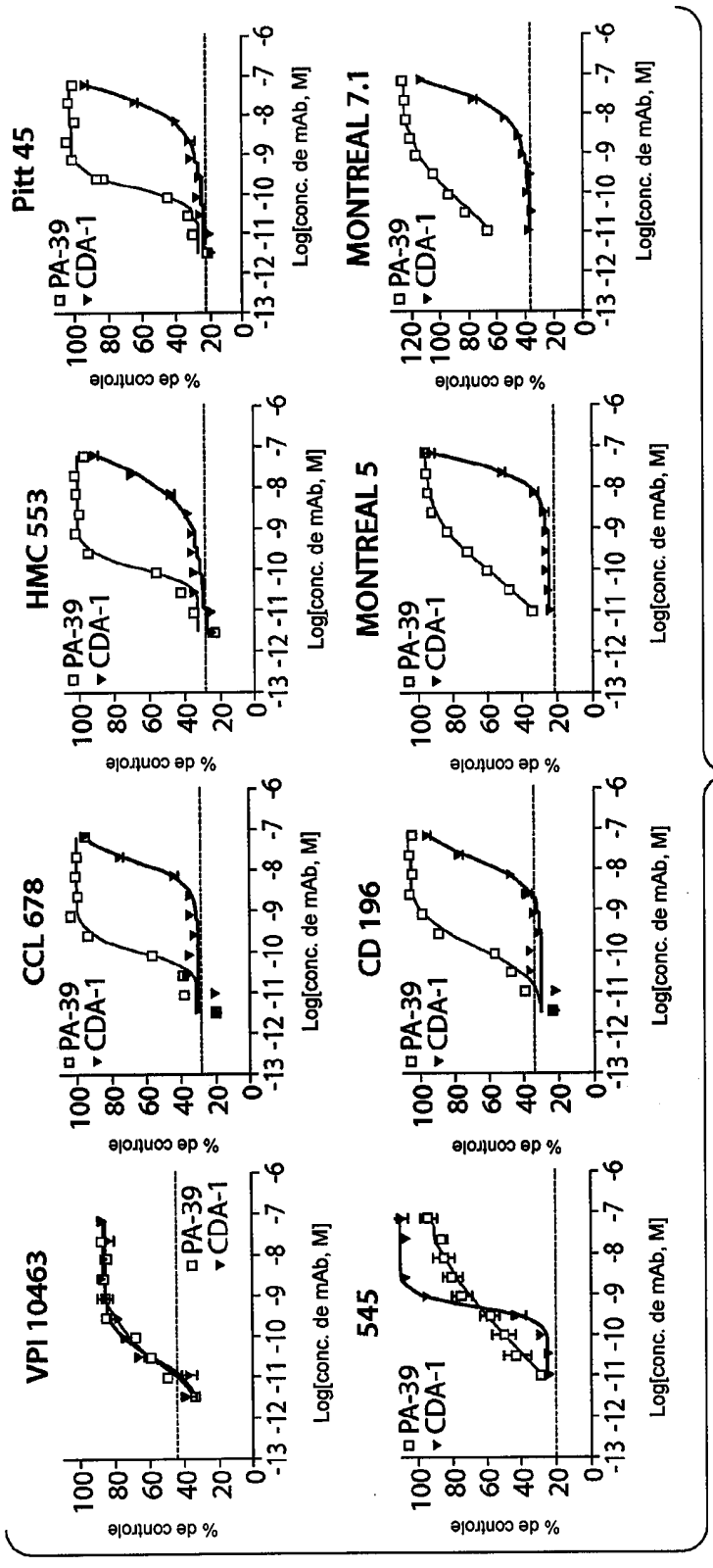

VPI 10463
CCL 678
HMC 553
Pitt 45
545
CD 196
MONTREAL 5
MONTREAL 7.1
PA-39
CDA-1
% de controle
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 25B

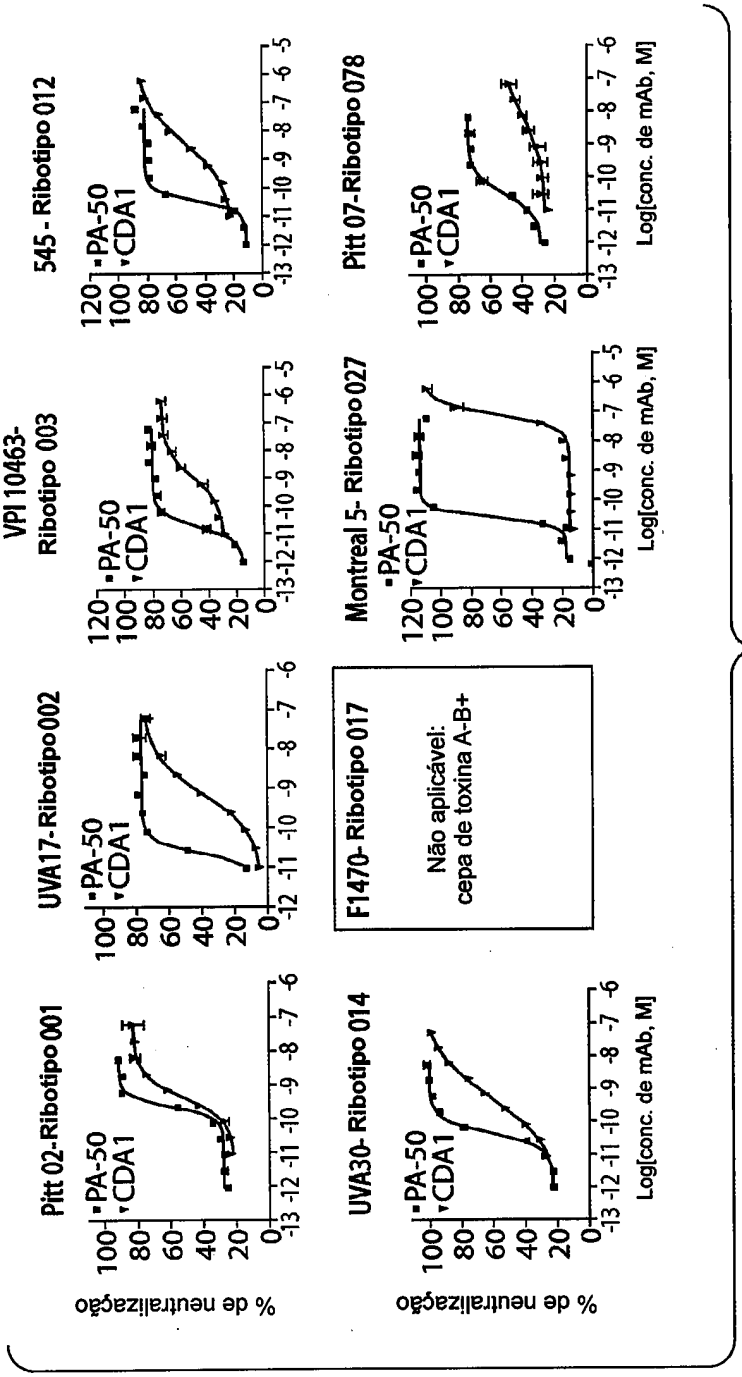

Pitt 02-Ribotipo 001
UVA17-Ribotipo 002
VPI 10463-Ribotipo 003
545 - Ribotipo 012
UVA30- Ribotipo 014
F1470- Ribotipo 017
Não aplicável: cepa de toxina A-B+
Montreal 5- Ribotipo 027
Pitt 07-Ribotipo 078
PA-50
CDA1
% de neutralização
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 25C

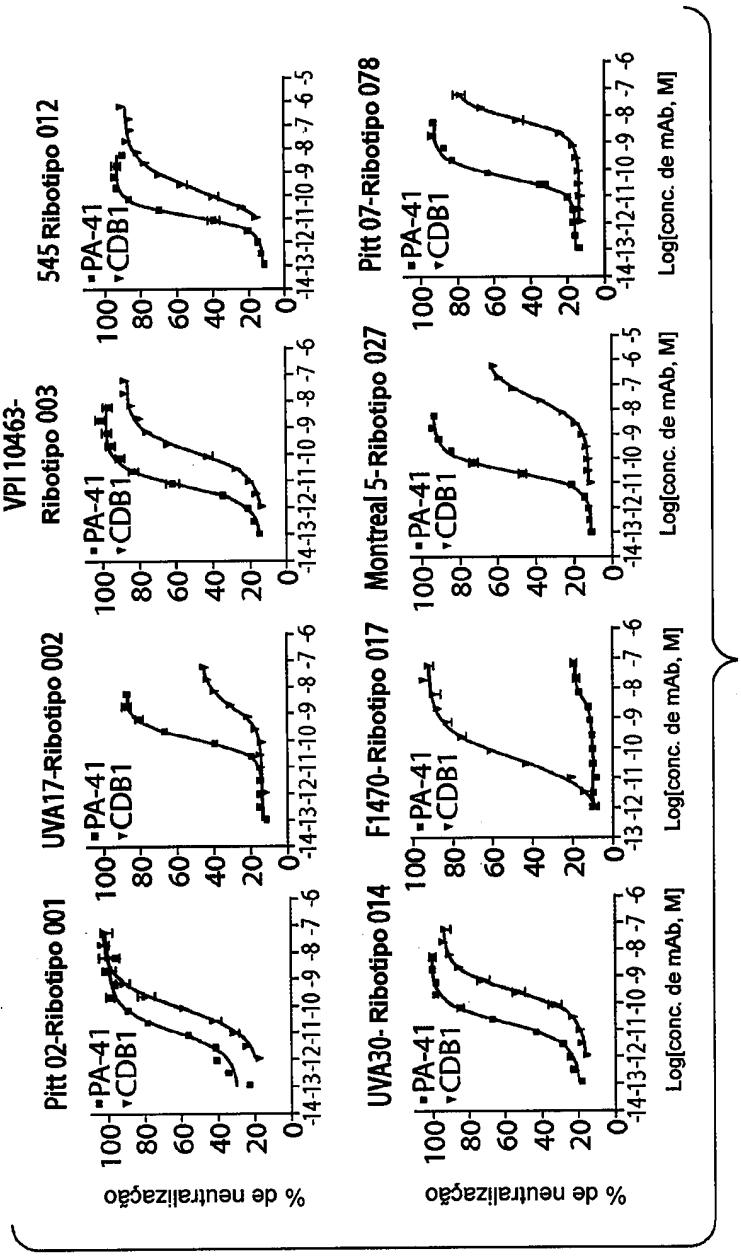
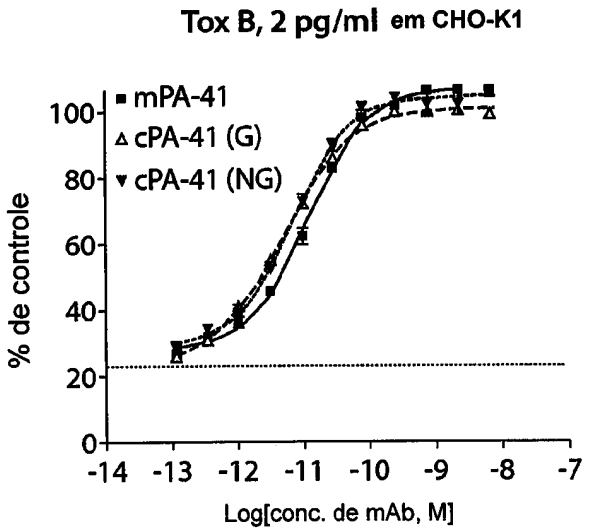
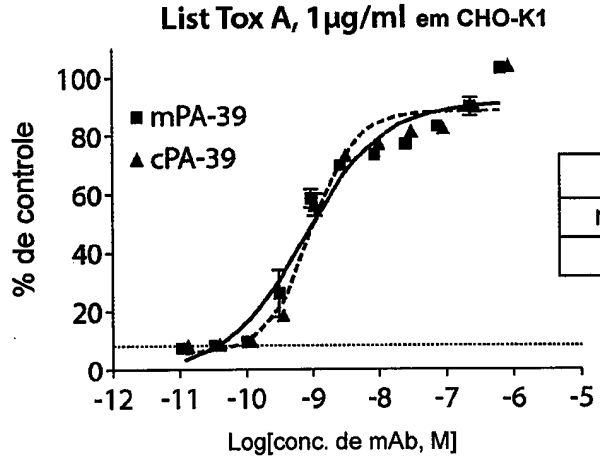

Pitt 02-Ribotipo 001
UVA17-Ribotipo 002
VPI 10463-Ribotipo 003
545 Ribotipo 012
UVA30- Ribotipo 014
F1470-Ribotipo 017
Montreal 5-Ribotipo 027
Pitt 07-Ribotipo 078
PA-41
CDB1
% de neutralização
Log[conc. de mAb, M]

Fig. 25D



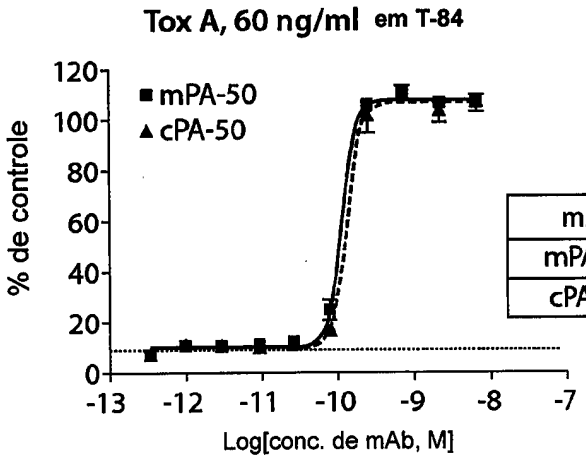
mAb	EC_{50} (pM)
mPA-41	4.2
cPA-41 (G)	2.2
cPA-41 (NG)	2.7

Fig. 26



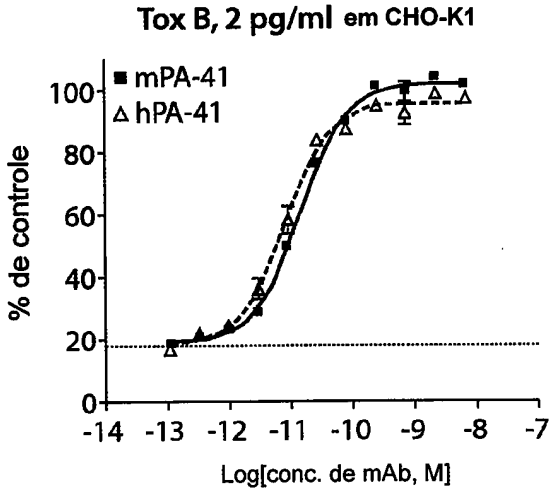
mAb	EC_{50} (nM)
mPA-39	1.0
cPA-39	1.1

Fig. 27



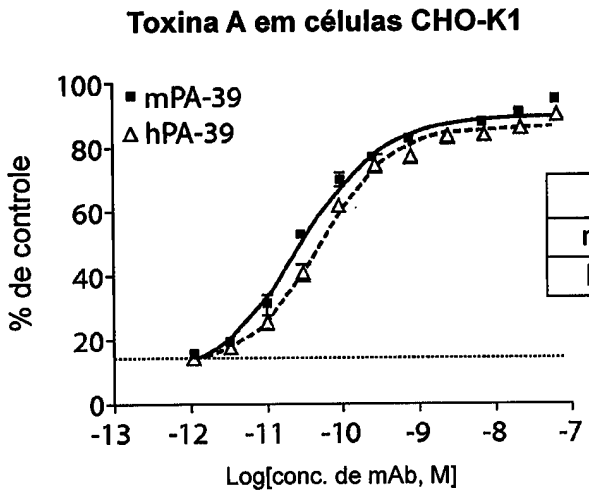
mAb	EC_{50} (pM)
mPA-50	110
cPA-50	120

Fig. 28



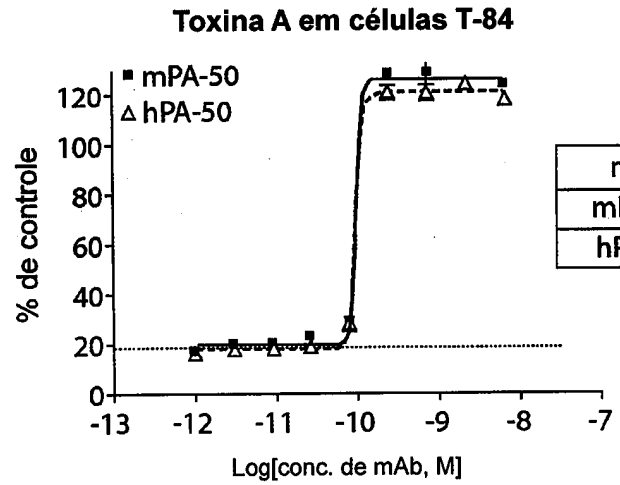
mAb	EC_{50} (pM)
mPA-41	9
hPA-41	6

Fig. 29



mAb	EC_{50} (pM)
mPA-39	30
hPA-39	50

Fig. 30



mAb	EC_{50} (pM)
mPA-50	90 pM
hPA-50	90 pM

Fig. 31A

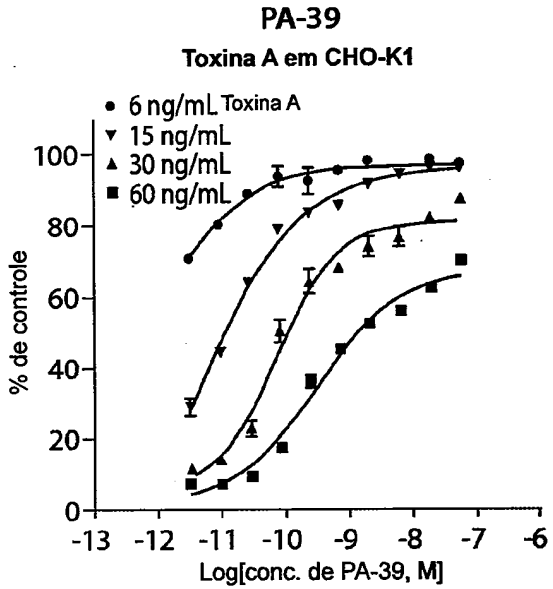


Fig. 31B

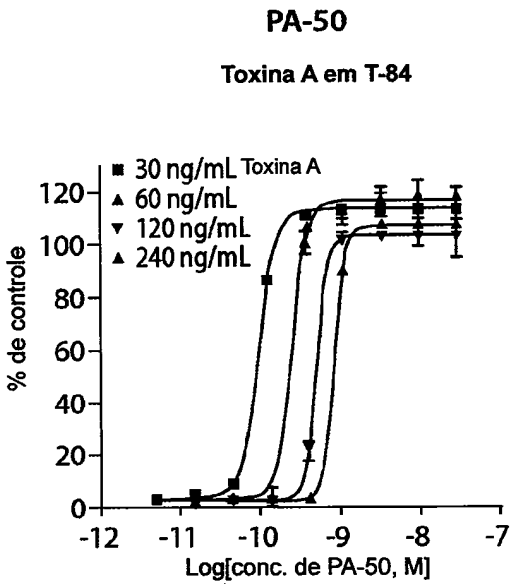


Fig. 31C

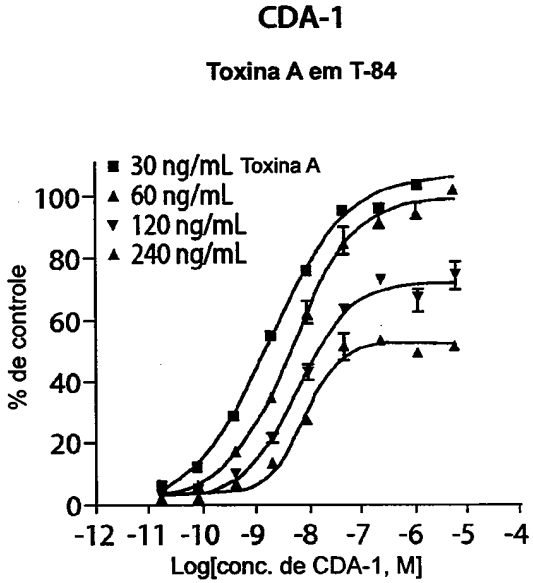


Fig. 31D

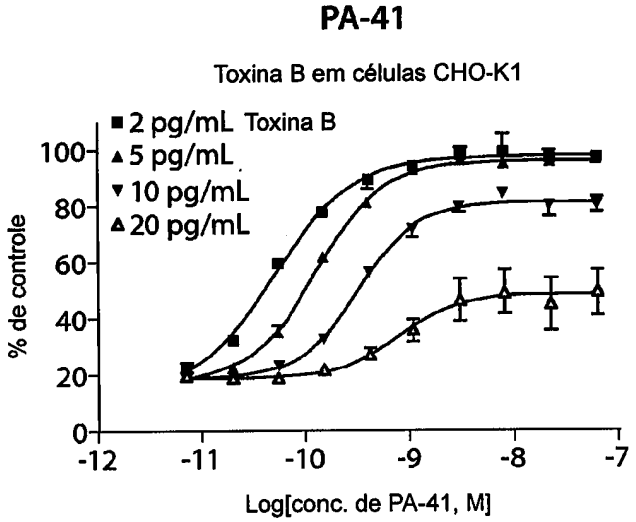


Fig. 31E

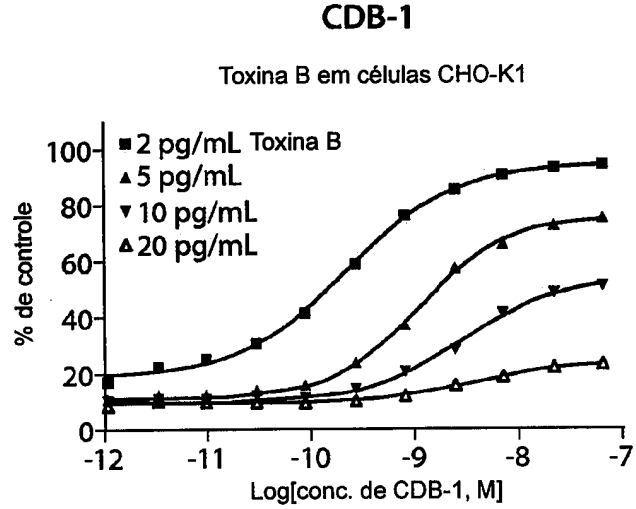


Fig. 31F

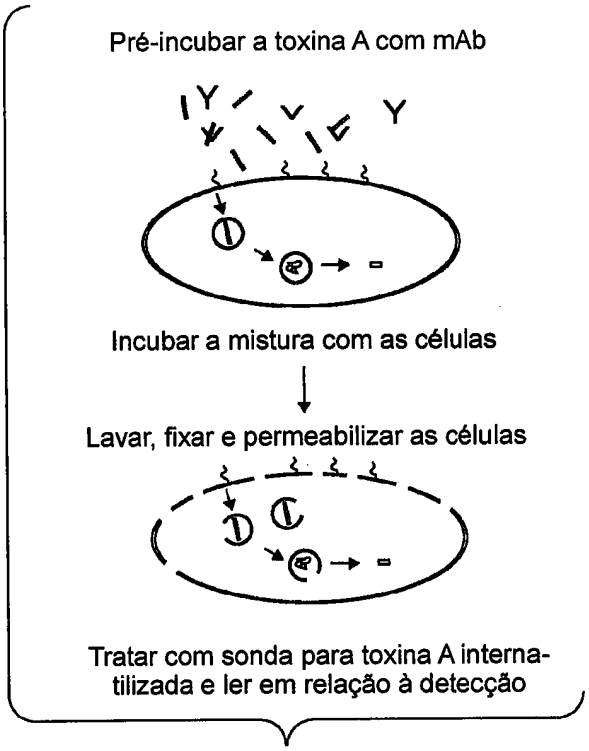


Fig. 31G

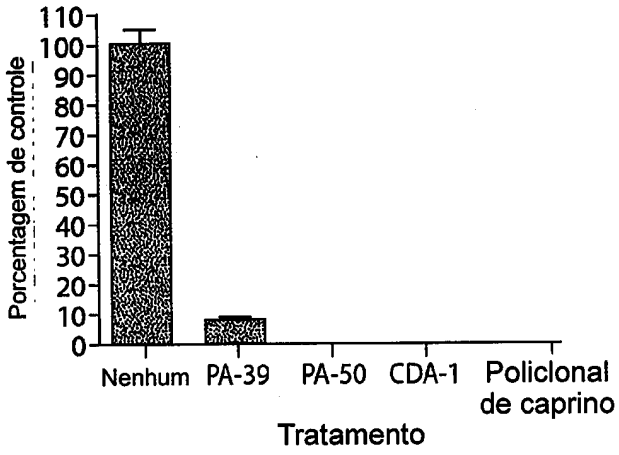


Fig. 31H

```
          1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF NDHNIHWVRQ

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

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

Fig. 32A

```
          1           2           3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF NDHNIHWVRQ

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

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

Fig. 32B

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQNV GTNVAWYQQK

4          5          6          7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGKAPKALIY SASYRYSGVS SRFSGSGSGT DFTLTISSLQ

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

Fig. 33A

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQNV GTNVAWYQQK

4          5          6          7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGKAPKVLIY SASYRYSGVS SRFSGSGSGT DFTLTISSLQ

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

Fig. 33B

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TDYNMDWVRQ

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

                           1          1
8              9           0          1
01222234567890 123456789 00123456789 0123
MELSSLRSEDTAV YYCARSDRGW YFDVWGQGTLV TVSS
(SEQ ID NO:5)
```

Fig. 34A

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TDYNMDWVRQ

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

                           1          1
8              9           0          1
01222234567890 123456789 00123456789 0123
MELSSLRSEDTAV YYCARSDRGW YFDVWGQGTLV TVSS
(SEQ ID NO:6)
```

Fig. 34B

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASSSV NYMNWYQQKP

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

                      1
8          9          0
0123456789 0123456789 01234
EDFAVYYCQQ WSSRTFGGGT KVEIK
(SEQ ID NO:7)
```

Fig. 35

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYPF TNYFMHWVRQ

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

                      1          1
8          9          0          1
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
YMELSSLRSE DTAVYYCARS TITSPLLDFW GQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:8)
```

Fig. 36A

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYPF TNYFMHWVRQ

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

                      1          1
8          9          0          1
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
YMELSSLRSE DTAVYYCARS TITSPLLDFW GQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:9)
```

Fig. 36B

```
          1          2          3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASQSV GTSIHWYQQK

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

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

Fig. 37

```
  1 atg gat ttt caa gtt cag ata ttc tcc ttt ctt ctc att agc gcc
      M   D   F   Q   V   Q   I   F   S   F   L   L   I   S   A

 46 agt gtg att atg tca aga ggg gag att gtc ctg aca cag agt ccc
      S   V   I   M   S   R   G   E   I   V   L   T   Q   S   P

 91 gcc aca ctt agc ctg tcc ccc gga gag cgt gct aca ctc tct tgt
      A   T   L   S   L   S   P   G   E   R   A   T   L   S   C

136 cgc gct tcc agc tct gtc aac tac atg aac tgg tat cag cag aaa
      R   A   S   S   S   V   N   Y   M   N   W   Y   Q   Q   K

181 ccc ggt cag gcc cct aga ccc cgg atc tat gcc aca tct aat ctt
      P   G   Q   A   P   R   P   R   I   Y   A   T   S   N   L

226 gcc tcc gga gtg cct gcc cga ttc agc ggg agc gga agt ggt acc
      A   S   G   V   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T

271 gat tac acc ctc aca atc tct agc ttg gaa cca gag gac ttt gca
      D   Y   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A

316 gtc tat tac tgc caa cag tgg tct agt cgc act ttc ggt ggt ggc
      V   Y   Y   C   Q   Q   W   S   S   R   T   F   G   G   G

361 acc aaa ttg gag atc aag agg act gtc gct gcc cca agt gtg ttc
      T   K   L   E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F

406 atc ttt cct cca tcc gat gag cag ctg aag agt gga acc gca tcc
      I   F   P   P   S   D   E   Q   L   K   S   G   T   A   S

451 gtg gtt tgc ctg ctg aac aac ttt tac cct cgg gaa gct aaa gtg
      V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R   E   A   K   V

496 cag tgg aag gtg gac aat gca ctg cag tcc ggc aat agc cag gag
      Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S   Q   E

541 tca gta acc gaa caa gat tcc aag gac tcc acc tac tct ctc tca
      S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S

586 tct acc ttg acc ctg tca aag gcc gac tat gaa aaa cac aag gtt
      S   T   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V

631 tac gca tgt gag gta act cat caa ggg ctt agc tct cca gtc act
      Y   A   C   E   V   T   H   Q   G   L   S   S   P   V   T

676 aag agc ttt aac agg ggc gaa tgc tag  (SEQ ID NO:17)
      K   S   F   N   R   G   E   C      (SEQ ID NO:16)
```

Fig. 38A

```
  1 atg gaa tgg tcc ggc gtg ttc atc ttt ttg ctg tca gtc acc gct
      M   E   W   S   G   V   F   I   F   L   L   S   V   T   A

 46 ggc gtg cac tct caa gtc cag ctt gtt cag agc gga gca gaa gtg
      G   V   H   S   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V

 91 aag aag cca ggg gcc agc gtc aag gtt tct tgt aaa gcc agt ggt
      K   K   P   G   A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G

136 tat acc ttt act gat tac aac atg gat tgg gta cgt cag gca ccc
      Y   T   F   T   D   Y   N   M   D   W   V   R   Q   A   P

181 gga caa cgg ctg gag tgg att ggc gac atc aat ccc aaa tac gac
      G   Q   R   L   E   W   I   G   D   I   N   P   K   Y   D

226 att atc ggc cat aac cct aag ttt atg gga aag gct acc att aca
      I   I   G   H   N   P   K   F   M   G   K   A   T   I   T

271 gta gat aag tct gct tcc acc gct tac atg gag ctc tcc tct ctg
      V   D   K   S   A   S   T   A   Y   M   E   L   S   S   L

316 cgc agt gag gat acc gca gtg tac tat tgc gcc agg agt gac cga
      R   S   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   S   D   R

361 ggc tgg tat ttc gac gtt tgg ggg cag ggt aca ttg gtg act gtg
      G   W   Y   F   D   V   W   G   Q   G   T   L   V   T   V

406 tca agc gcc agc aca aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc
      S   S   A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P

451 tct agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg
      S   S   K   S   T   S   G   G   T   A   A   L   G   C   L

496 gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca
      V   K   D   Y   F   P   E   P   V   T   V   S   W   N   S

541 ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag
      G   A   L   T   S   G   V   H   T   F   P   A   V   L   Q

586 tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc
      S   S   G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T   V   P   S

631 agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag
      S   S   L   G   T   Q   T   Y   I   C   N   V   N   H   K

676 ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt
      P   S   N   T   K   V   D   K   R   V   E   P   K   S   C
```

Fig. 38B

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 38B Continuação

```
  1 atg gaa tct cag act caa gtg ttt gtg tac atg ttg ctg tgg ctg
      M   E   S   Q   T   Q   V   F   V   Y   M   L   L   W   L

 46 agc ggc gtt gac ggt gac att cag atg acc caa agc ccc tca agt
      S   G   V   D   G   D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S

 91 ctt tct gct agc gtg ggg gac agg gtg acc ata aca tgc aaa gcc
      L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   K   A

136 agc caa aat gtg ggg act aac gtt gcc tgg tat cag cag aaa cca
      S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y   Q   Q   K   P

181 ggt aaa gca ccc aag gct ctg atc tac agt gca agt tat cga tac
      G   K   A   P   K   A   L   I   Y   S   A   S   Y   R   Y

226 tcc ggc gtg tcc tct cgg ttt tct ggc tct ggg agc gga acc gat
      S   G   V   S   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D

271 ttc act ctg acc att agt tca ctc caa cca gaa gat ttc gca gtc
      F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   V

316 tac tat tgt cag cag tac tat agt tac cca tat aca ttt gga cag
      Y   Y   C   Q   Q   Y   Y   S   Y   P   Y   T   F   G   Q

361 ggc acc aag ctg gaa atc aag aga acc gtt gcc gct cct tca gta
      G   T   K   L   E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V

406 ttc atc ttc cct ccc tcc gat gag cag ttg aag tcc ggc aca gca
      F   I   F   P   P   S   D   E   Q   L   K   S   G   T   A

451 agc gtc gta tgc ctt ttg aac aat ttc tat cca cgc gag gcc aaa
      S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R   E   A   K

496 gtg caa tgg aag gtc gac aac gct ctg cag tca ggc aac tcc caa
      V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S   Q

541 gag tca gtc aca gag cag gac agc aaa gat tcc act tat tct ctc
      E   S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L

586 tct tct aca ctc act ctg agc aag gcc gac tat gag aag cat aag
      S   S   T   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K

631 gtt tac gcc tgc gaa gtg acc cac cag gga ttg agt tcc cct gtc
      V   Y   A   C   E   V   T   H   Q   G   L   S   S   P   V

676 act aag tcc ttt aac cgt ggg gag tgt tag     (SEQ ID NO:21)
      T   K   S   F   N   R   G   E   C         (SEQ ID NO:20)
```

Fig. 39A

```
  1 atg gag tgg tcc gga gtg ttc atc ttt ctg ctc tct gtt acc gct
      M   E   W   S   G   V   F   I   F   L   L   S   V   T   A

 46 ggc gta cat agc caa gtc cag ctt gtc cag tct ggc gcc gag gtc
      G   V   H   S   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V

 91 aag aaa cca ggg gcc agc gtg aaa gtt agt tgt aag gca tcc ggc
      K   K   P   G   A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G

136 tat acc ttc aac gat cac aat atc cac tgg gta cga cag gct cca
      Y   T   F   N   D   H   N   I   H   W   V   R   Q   A   P

181 ggc caa ggg ctg gaa tgg att ggt tac ata tac cct tac att gga
      G   Q   G   L   E   W   I   G   Y   I   Y   P   Y   I   G

226 aca aca gtg tat aac cag aag ttc aaa tcc aag gca act ctt act
      T   T   V   Y   N   Q   K   F   K   S   K   A   T   L   T

271 gtg gat aca tca acc tca act gcc tac atg gaa ttg aga tcc ctg
      V   D   T   S   T   S   T   A   Y   M   E   L   R   S   L

316 agg agt gac gac act gct gtc tat tac tgc agt cgg tgg gga cat
      R   S   D   D   T   A   V   Y   Y   C   S   R   W   G   H

361 cgc ggc ttt cct tat tgg ggt cag ggg aca ctc gtt act gtg agc
      R   G   F   P   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S

406 tct gcc agt acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tct
      S   A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P   S

451 agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc
      S   K   S   T   S   G   G   T   A   A   L   G   C   L   V

496 aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc
      K   D   Y   F   P   E   P   V   T   V   S   W   N   S   G

541 gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc
      A   L   T   S   G   V   H   T   F   P   A   V   L   Q   S

586 tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc
      S   G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T   V   P   S   S

631 agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc
      S   L   G   T   Q   T   Y   I   C   N   V   N   H   K   P

676 agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg cca gca cag
      S   N   T   K   V   D   K   R   V   G   E   R   P   A   Q

721 gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc tgc ctg
      G   G   R   V   S   A   G   S   Q   A   Q   R   S   C   L
```

Fig. 39B

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

 811 ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc act cat
       P   R   L   P   L   H   P   E   A   S   A   R   P   T   H
 856 gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag
       A   Q   G   E   G   L   L   A   F   S   P   G   S   G   Q

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(aa: SEQ ID NO:18)
(na: SEQ ID NO:19)

Fig. 39B Continuação

```
  1 atg tcc gtt cct act caa gtg ctg gga ctg ctt ctt ctg tgg ctc
      M   S   V   P   T   Q   V   L   G   L   L   L   L   W   L

 46 act gac gca agg tgt gag atc gtg ctg acc cag agt cca gcc aca
      T   D   A   R   C   E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T

 91 ctc agc ttg tca ccc ggg gaa cgg gct aca ctg tcc tgt cgt gca
      L   S   L   S   P   G   E   R   A   T   L   S   C   R   A

136 tca cag agc gtg ggt aca tca att cac tgg tat cag cag aag ccc
      S   Q   S   V   G   T   S   I   H   W   Y   Q   Q   K   P

181 ggt cag gct ccc aga ctc ctg ata aag ttt gcc tcc gaa tcc att
      G   Q   A   P   R   L   L   I   K   F   A   S   E   S   I

226 tct ggc att cca gcc cgc ttc tcc ggc tcc ggc agt gga act gat
      S   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D

271 ttc acc ctc acc att agt tct ttg gag cct gaa gat ttt gca gta
      F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V

316 tac tac tgt caa cag tct aac aag tgg cct ttt act ttt ggg cag
      Y   Y   C   Q   Q   S   N   K   W   P   F   T   F   G   Q

361 gga act aaa ctg gag atc aag cgc act gtc gct gct cca agc gta
      G   T   K   L   E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V

406 ttc atc ttt cct ccc tcc gac gag cag ttg aaa tca ggg aca gcc
      F   I   F   P   P   S   D   E   Q   L   K   S   G   T   A

451 tct gtg gtc tgc ctg ctg aac aat ttc tac cca agg gaa gcc aaa
      S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R   E   A   K

496 gtg cag tgg aag gtc gat aat gca ctt caa tca ggt aat tct caa
      V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S   Q

541 gag agt gtg acc gag cag gat tcc aag gac agt acc tac tct ctc
      E   S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L

586 agc tca acc ctg acc ctt tct aaa gct gac tat gaa aaa cat aaa
      S   S   T   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K

631 gtc tac gcc tgc gaa gtg aca cac cag ggt ctg agt agc cct gtt
      V   Y   A   C   E   V   T   H   Q   G   L   S   S   P   V

676 acc aag agc ttt aac cga ggc gag tgc tag     (SEQ ID NO:25)
      T   K   S   F   N   R   G   E   C       (SEQ ID NO:24)
```

Fig. 40A

```
  1  atg gga tgg agc tgg att ttc ttg ttc ctc ctt tcc ggg act gct
       M   G   W   S   W   I   F   L   F   L   L   S   G   T   A

 46  ggc gga ctg tcc caa gtc cag ttg gtg cag agc ggc gct gag gtt
       G   G   L   S   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V

 91  aag aag ccc ggt gcc tct gtc aaa gtt agt tgc aaa gca agt ggc
       K   K   P   G   A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G

136  tac cct ttc aca aac tac ttt atg cac tgg gtg cgc cag gcc cct
       Y   P   F   T   N   Y   F   M   H   W   V   R   Q   A   P

181  ggg caa aga ctc gaa tgg atc ggt cgt atc aat cca tac aat ggg
       G   Q   R   L   E   W   I   G   R   I   N   P   Y   N   G

226  gca act agt tat tct ctc aac ttc agg gat aag gct acc att aca
       A   T   S   Y   S   L   N   F   R   D   K   A   T   I   T

271  ctg gac aag tct gcc tct acc gcc tat atg gag ctg agc tcc ctg
       L   D   K   S   A   S   T   A   Y   M   E   L   S   S   L

316  cgg agt gaa gat act gct gtc tat tac tgt gca cga tcc acc ata
       R   S   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   S   T   I

361  acc tct ccc ctg ctg gac ttt tgg ggc cag ggc aca ctt gtg act
       T   S   P   L   L   D   F   W   G   Q   G   T   L   V   T

406  gta tca tca gca tcc aca aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca
       V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A

451  ccc tct agc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc
       P   S   S   K   S   T   S   G   G   T   A   A   L   G   C

496  ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac
       L   V   K   D   Y   F   P   E   P   V   T   V   S   W   N

541  tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta
       S   G   A   L   T   S   G   V   H   T   F   P   A   V   L

586  cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc
       Q   S   S   G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T   V   P

631  tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac
       S   S   S   L   G   T   Q   T   Y   I   C   N   V   N   H

676  aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg cca
       K   P   S   N   T   K   V   D   K   R   V   G   E   R   P

721  gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc
       A   Q   G   G   R   V   S   A   G   S   Q   A   Q   R   S

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

811  ggc agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc
       G   R   P   R   L   P   L   H   P   E   A   S   A   R   P
```

Fig. 40B

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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


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

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

1621 tga
```

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

Fig. 40B Continuação

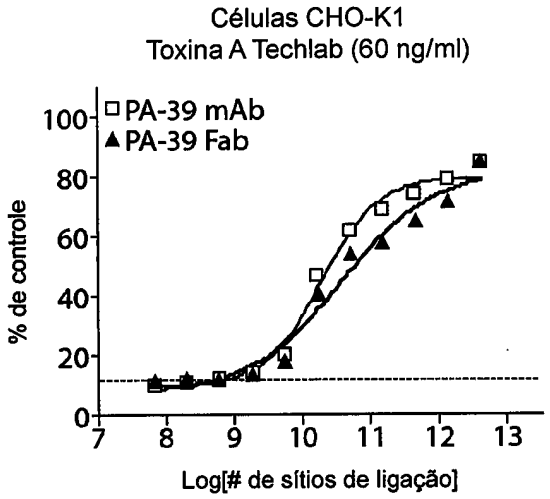


Fig. 41A

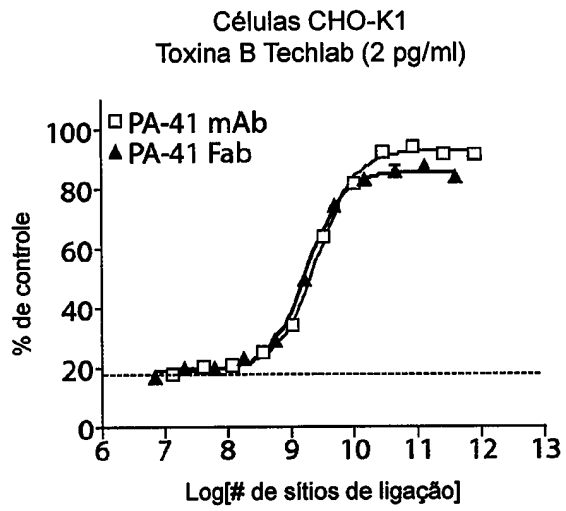


Fig. 41B

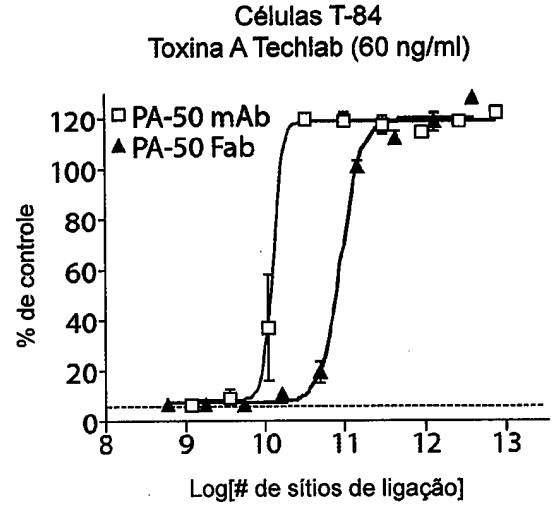


Fig. 41C

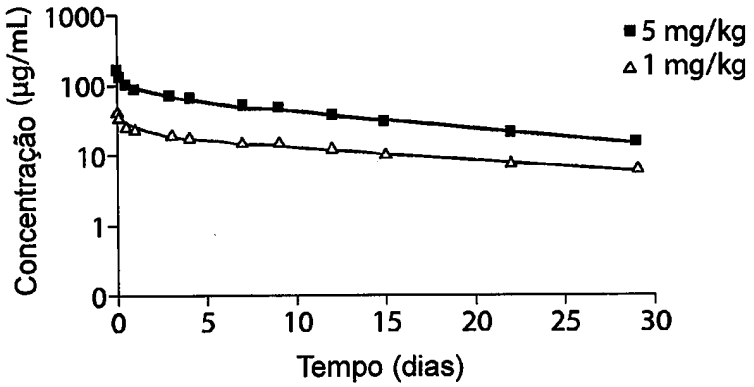


Fig. 42A

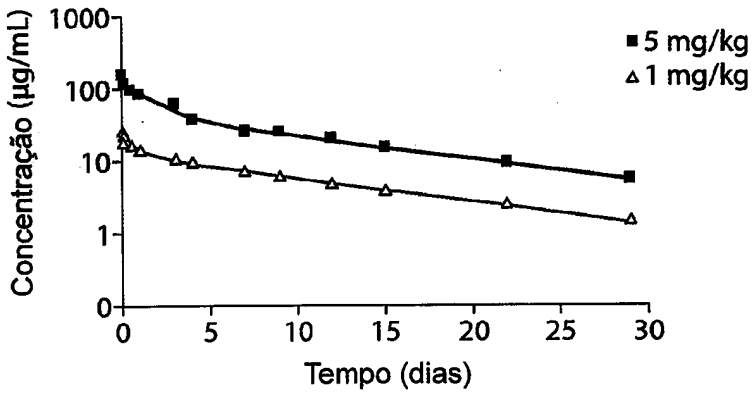


Fig. 42B