

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 939 307**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/08 (2006.01)
C07K 14/33 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013 E 19159001 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2023 EP 3513806**

(54) Título: **Composición inmunogénica**

(30) Prioridad:

05.12.2012 GB 201221875

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

20.04.2023

(73) Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

(72) Inventor/es:

**BOUTRIAU, DOMINIQUE;
GERMAIN, SOPHIE MARIE JEANNE VALENTINE y
WALLEMACQ, HUGUES**

(74) Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 939 307 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende:

a) un polipéptido que comprende un fragmento de toxina A de *Clostridium difficile* aislado y un fragmento de toxina B de *C. difficile* aislado, comprendiendo el polipéptido un fragmento de dominio de repetición de toxina A y un fragmento de dominio de repetición de toxina B; y

b) un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicha emulsión de aceite en agua un aceite metabolizable, un tocol y un emulsionante;

15 estando la composición inmunogénica en un volumen adecuado para una dosis humana, volumen que es de 0,5 ml o mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml, o de entre 1 ml y 1,5 ml. La invención se refiere también a composiciones de vacuna y al uso de las vacunas y composiciones inmunogénicas de la invención en la profilaxis o terapia o en la fabricación de un medicamento.

20 ANTECEDENTES

C. difficile es la causa más importante de infecciones intestinales nosocomiales y es la causa principal de colitis pseudomembranosa en humanos (Bartlett *et al* Am. J. Clin. Nutr. 11 supl.: 2521-6 (1980)). Se calculó que la tasa de mortalidad asociada global para individuos infectados con *C. difficile* era del 5,99% en el plazo de 3 meses desde el diagnóstico, con una mortalidad mayor asociada con una edad avanzada, siendo del 13,5% en pacientes mayores de 80 años (Karas *et al* Journal of Infection 561:1-9 (2010)). El tratamiento actual para la infección por *C. difficile* es la administración de antibióticos (metronidazol y vancomicina), sin embargo, ha habido evidencia de cepas que son resistentes a estos antibióticos (Shah *et al.*, Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8(5), 555-564 (2010)). Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones inmunogénicas capaces de inducir anticuerpos para, y/o una respuesta inmunitaria protectora frente a, *C. difficile*.

La enterotoxicidad de *C. difficile* se debe principalmente a la acción de dos toxinas, la toxina A ("ToxA") y la toxina B ("ToxB"). Los dominios C-terminales de la toxina A y la toxina B comprenden unidades de repetición, por ejemplo, el dominio C-terminal de la toxina A está constituido por unidades de repetición contiguas (Dove *et al* Infect. Immun. 58:480-499 (1990)). Por este motivo, el dominio C-terminal puede denominarse "dominio de repetición". Estas porciones de repetición pueden separarse en repeticiones cortas (SR) y repeticiones largas (LR) tal como se describe en Ho *et al* (PNAS 102:18373-18378 (2005)).

40 Se han descrito composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos de *C. difficile*. Los documentos WO96/12802 y WO00/61762 y Lyerly *et al* (Current Microbiology 21:29-32 (1990)) se refieren a fragmentos de toxina A, en particular, fragmentos del dominio C-terminal, para inducir una respuesta inmunitaria protectora en hámsteres. El documento WO9920304 se refiere a una mezcla de toxina A y toxina B purificadas conjuntamente inactivadas mediante incubación en formaldehído. El documento WO00/61762 se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden o bien el dominio C-terminal de longitud completa o bien fragmentos del dominio C-terminal de la toxina A y la toxina B de *C. difficile*.

Se necesitan nuevas composiciones o vacunas con una inmunogenicidad mejorada.

50 Los documentos WO2012028741, XP055060922 Foglia *et al*. Y XP055102029 Wang *et al*. Son referencias útiles para proteínas de *C. difficile*.

Como una estrategia, se han usado adyuvantes para intentar y mejorar la respuesta inmunitaria creada frente a cualquier antígeno dado. Por ejemplo, el documento WO2009035707 describe una composición que comprende un toxoide de las toxinas A y B de *C. difficile* y un adyuvante tal como un compuesto de hidróxido de aluminio.

60 Se han dado a conocer previamente adyuvantes que contienen combinaciones de lipopolisacárido y saponinas de Quillaja, por ejemplo, en el documento EP0671948. Las emulsiones de aceite en agua se conocen en sí ampliamente en la técnica y se ha sugerido que son útiles como composiciones adyuvantes (documentos EP 399843; WO 95/17210; WO2008043774).

Existe todavía la necesidad de composiciones de vacuna e inmunogénicas que proporcionen una respuesta inmunitaria adecuada frente a *C. difficile*.

SUMARIO

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende:

- 5 a) un polipéptido que comprende un fragmento de toxina A de *Clostridium difficile* aislado y un fragmento de toxina B de *C. difficile* aislado, comprendiendo el polipéptido un fragmento de dominio de repetición de toxina A y un fragmento de dominio de repetición de toxina B; y
- 10 b) un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicha emulsión de aceite en agua un aceite metabolizable, un tocol y un emulsionante;
- estando la composición inmunogénica en un volumen adecuado para una dosis humana, volumen que es de 0,5 ml o mayor de 0,5 ml, por ejemplo, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml, o de entre 1 ml y 1,5 ml.
- 15 15 En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que comprende un fragmento de toxina A de *C. difficile* y un fragmento de toxina B de *C. difficile* y un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicha emulsión de aceite en agua un aceite metabolizable, un tocol y un emulsionante. El aceite metabolizable puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5,35 mg. El tocol puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5,94 mg. De manera adecuada, el agente emulsionante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2,425 mg. De manera adecuada, el aceite metabolizable es escualeno, el tocol es alfa-tocoferol y el agente emulsionante es monooleato de polioxietileno-sorbitano.
- 20 De manera adecuada, la composición inmunogénica según cualquier aspecto de la invención comprende un fragmento de dominio de repetición de toxina A de *C. difficile* y un fragmento de dominio de repetición de toxina B de *C. difficile* y provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A y la toxina B. De manera adecuada, la composición inmunogénica según cualquier aspecto de la invención comprende una variante polipeptídica de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 o SEQ ID NO:27.
- 25 30 De manera adecuada, la composición inmunogénica según cualquier aspecto de la invención comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35 o una variante o un fragmento de cualquiera de estas secuencias.
- 35 40 45 Las composiciones inmunogénicas según la invención pueden comprender antígenos adicionales tales como antígenos derivados de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumonia*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), *Clostridium tetani* (*C. tetani*), *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*), *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), enterococos y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).
- En un aspecto, la invención se refiere a una vacuna que comprende la composición inmunogénica según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 En un aspecto, la invención se refiere a la composición inmunogénica o la vacuna según la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad por *C. difficile*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 50 Figura 1 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres inmunizados con F2 formulada con adyuvante A; adyuvante A sin QS21 y adyuvante A sin MPL.
- Figura 2 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres inmunizados con F2 no adyuvada o F2 formulada con adyuvante A, adyuvante B y alumbre.
- Figura 3 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para sueros Post I de hámsteres macho y hembra inmunizados con un rango de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C.
- 60 Figura 4 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para sueros Post II de hámsteres macho y hembra inmunizados con un rango de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C.

Figura 5 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para sueros Post III de hámsteres macho y hembra inmunizados con un rango de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C.

5 Figura 6 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para sueros del día 87 Post III de hámsteres macho y hembra inmunizados con un rango de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C.

10 Figura 7 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres macho inmunizados con un rango de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C en sueros Post I, II y III.

15 Figura 8 - Gráficos que muestran resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres macho y hembra inmunizados con una mezcla (ToxA+ToxB) o con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o adyuvante A.

Figura 9 - Gráfico que muestra la inmunogenicidad anti-ToxA en ratones inmunizados con un fragmento del extremo C-terminal de toxina A (aa 2387-2706), un fragmento del extremo C-terminal de toxina B (aa 1750-2360) o fusiones 1, 2, 3, 4 o 5 formuladas en adyuvante B.

20 Figura 10 - Gráfico que muestra la inhibición de la hemaglutinación en ratones inmunizados con un fragmento del extremo C-terminal de toxina A (aa 2387-2706), un fragmento del extremo C-terminal de toxina B (aa 1750-2360) o fusiones 1, 2, 3, 4 o 5 formuladas en adyuvante B.

25 Figura 11 - Gráfico que muestra la inmunogenicidad anti-ToxB en ratones inmunizados con un fragmento del extremo C-terminal de toxina A (aa 2387-2706), un fragmento del extremo C-terminal de toxina B (aa 1750-2360) o fusiones 1, 2, 3, 4 o 5 formuladas en adyuvante B.

30 Figura 12 - Títulos de inhibición de la citotoxicidad de ratones inmunizados con un fragmento del extremo C-terminal de toxina A (aa 2387-2706), un fragmento del extremo C-terminal de toxina B (aa 1750-2360) o fusiones 1, 2, 3, 4 o 5 formuladas en adyuvante B.

Figura 13 - Gráfico que muestra resultados de ELISA anti-ToxA para ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, G54New o F5 ToxB formuladas en adyuvante B.

35 Figura 14 - Gráfico que muestra resultados de ELISA anti-ToxB para ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB formuladas en adyuvante B.

Figura 15 - Gráfico que muestra la inhibición de la hemaglutinación en ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB formuladas en adyuvante B.

40 Figura 16 - Gráfico que muestra títulos de citotoxicidad en células HT29 de ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB formuladas en adyuvante B.

Figura 17 - Gráfico que muestra títulos de citotoxicidad en células IMR90 de ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB formuladas en adyuvante B.

Figura 18 - Gráfico que muestra resultados de ELISA anti-ToxA para ratones inmunizados con ToxA-Cter (aa 2387-2706), ToxB-Cter (aa 1750-2360) y proteínas de fusión (no adyuvadas) de *C. difficile*.

50 Figura 19 - Gráfico que muestra resultados de ELISA anti-ToxB para ratones inmunizados con ToxA-Cter (aa 2387-2706), ToxB-Cter (aa 1750-2360) y proteínas de fusión (no adyuvadas) de *C. difficile*.

Figura 20 - Gráfico que muestra resultados de ELISA anti-ToxA para ratones inmunizados con ToxA-Cter (aa 2387-2706), ToxB-Cter (aa 1750-2360) y proteínas de fusión formuladas en adyuvante B: sueros Post II, III, prerefuerzo, Post IV, de *C. difficile*.

Figura 21 - Gráfico que muestra resultados de ELISA anti-ToxB para ratones inmunizados con ToxA-Cter (aa 2387-2706), ToxB-Cter (aa 1750-2360) y proteínas de fusión formuladas en adyuvante B: sueros Post II, III, prerefuerzo, Post IV, de *C. difficile*.

60 Figura 22 - Gráfico que describe el espectro UV lejano de las fusiones 2, 3, 4 y 5 medido usando dicroísmo circular. El espectro para la fusión 2 se representa mediante una línea con los puntos representados como cuadrados pequeños, el espectro para la fusión 3 se representa mediante una línea con los puntos representados como formas de diamante pequeñas, la fusión 4 se representa mediante una línea con los puntos representados como círculos y la

fusión 5 se representa mediante una línea con los puntos representados como formas de cruz.

Figura 23 - Gráfico que describe el espectro UV cercano de las fusiones 2, 3, 4 y 5 medido usando dicroísmo circular.
 5 El espectro para la fusión 2 se representa mediante una línea con los puntos representados como formas de cruz, el
 espectro para la fusión 3 se representa mediante una línea con los puntos representados como círculos, el espectro
 para la fusión 4 se representa mediante una línea con los puntos representados como triángulos y el espectro para la
 fusión 5 se representa mediante una línea con los puntos representados como formas de diamante pequeñas.

Figura 24 - Gráfico que describe el espectro UV lejano de las fusiones F52New, F54Gly, F54New y F5ToxB medido
 10 usando dicroísmo circular. El espectro para F52New se representa mediante una línea con los puntos representados
 como cruces dobles, el espectro para F54Gly se representa mediante una línea con los puntos representados como
 triángulos, F54New se representa mediante una línea con los puntos representados como cuadrados y F5ToxB se
 representa mediante una línea con los puntos representados como formas de cruz.

15 Figura 25 - Gráfico que describe el espectro UV cercano de las fusiones F52New, F54Gly, F54New y F5ToxB medido
 usando dicroísmo circular. El espectro para F52New se representa mediante una línea con los puntos representados
 como cruces dobles, el espectro para F54Gly se representa mediante una línea con los puntos representados como
 triángulos, F54New se representa mediante una línea con los puntos representados como cuadrados y F5ToxB se
 representa mediante una línea con los puntos representados como formas de cruz.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los inventores han mostrado que composiciones inmunogénicas que comprenden un polipéptido que comprende un
 fragmento de toxina A de *C. difficile* y/o un fragmento de toxina B de *C. difficile* formuladas con un adyuvante que
 25 comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicha emulsión de aceite en agua un aceite
 metabolizable, un tocol y un emulsionante, y estando la composición inmunogénica en un volumen adecuado para
 una dosis humana, volumen que es de 0,5 ml o mayor de 0,5 ml, por ejemplo, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml, o de entre 1 ml
 y 1,5 ml, proporcionan una respuesta inmunitaria mejorada frente a *C. difficile* en comparación con composiciones que
 30 contienen polipéptido de *C. difficile* no adyuvadas. Las composiciones inmunogénicas según la invención pueden
 proporcionar también una respuesta inmunitaria mejorada frente a *C. difficile* en comparación con polipéptidos de *C. difficile*
 formulados con alumbre.

POLIPÉPTIDOS

35 El polipéptido que comprende un fragmento de toxina A de *C. difficile* y/o un fragmento de toxina B de *C. difficile* puede
 ser una mezcla de toxina A y toxina B purificadas conjuntamente que se han inactivado, de manera adecuada mediante
 incubación en formaldehído, tal como aquellas descritas en el documento WO9920304.

40 El polipéptido puede comprender un fragmento N-terminal de toxina A de *C. difficile* y un fragmento de dominio de
 repetición de toxina B de *C. difficile*. El polipéptido puede contener un fragmento de dominio de repetición de toxina A
 de *C. difficile* y un fragmento N-terminal de toxina B de *C. difficile*. El polipéptido puede comprender un fragmento de
 dominio de repetición de toxina A de *C. difficile* y un fragmento de dominio de repetición de toxina B de *C. difficile*.

45 El polipéptido puede comprender o bien el dominio N-terminal y/o C-terminal de longitud completa de toxina A y toxina
 B de *C. difficile* o fragmentos de los mismos.

En una realización, el polipéptido en las composiciones inmunogénicas según la invención no contiene el dominio N-
 terminal de longitud completa de toxina A y/o toxina B de *C. difficile*. En una realización, el polipéptido en las
 50 composiciones inmunogénicas según la invención no contiene un fragmento de dominio N-terminal de toxina A y/o
 toxina B de *C. difficile*.

El polipéptido puede ser una proteína de fusión. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender una secuencia
 de fusión tal como las Seq ID NO: 36 y 37 u otras secuencias descritas en el documento WO2012/028741.

55 El polipéptido puede comprender un primer fragmento y un segundo fragmento, en el que

(i) el primer fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina A;

(ii) el segundo fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina B;

60

(iii) el primer fragmento comprende un primer extremo proximal dentro de una primera porción de repetición;

(iv) el segundo fragmento comprende un segundo extremo proximal dentro de una segunda porción de repetición; y

siendo el primer fragmento y el segundo fragmento adyacentes entre sí y teniendo la primera porción de repetición y la segunda porción de repetición similitud estructural.

El término polipéptido se refiere a una secuencia de aminoácidos contiguos.

5 El término "dominio de repetición de toxina A" se refiere al dominio C-terminal de la proteína de toxina A de *C. difficile* que comprende secuencias repetidas. Por ejemplo, el dominio C-terminal de la proteína de toxina A puede ser los aminoácidos 1832-2710 de la toxina A de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Los aminoácidos 1832-2710 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) corresponden a los aminoácidos 1832-2710 de SEQ ID NO:1.

10 El término "dominio de repetición de toxina B" se refiere al dominio C-terminal de la proteína de toxina B de *C. difficile*. Por ejemplo, el dominio C-terminal de la proteína de toxina B puede ser los aminoácidos 1834-2366 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Los aminoácidos 1834-2366 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) corresponden a los aminoácidos 1834-2366 de SEQ ID NO:2.

15 El dominio N-terminal de longitud completa de la toxina A puede ser los aminoácidos 1-542 de la toxina A de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Por tanto, el término "un fragmento N-terminal de toxina A de *C. difficile*" o "un fragmento de dominio N-terminal de toxina A" se refiere a un fragmento de los aminoácidos 20 1-542 de la toxina A de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Los aminoácidos 1-542 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) corresponden a los aminoácidos 1-542 de SEQ ID NO: 1.

25 El dominio N-terminal de longitud completa de la toxina B puede ser los aminoácidos 1-543 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Por tanto, el término "un fragmento N-terminal de toxina B de *C. difficile*" o "un fragmento de dominio N-terminal de toxina B" se refiere a un fragmento de los aminoácidos 1-543 de la toxina B de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Los aminoácidos 1-543 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) corresponden a los aminoácidos 1-543 de SEQ ID NO: 2.

30 Las toxinas A y B de *C. difficile* son proteínas conservadas. Sin embargo, la secuencia difiere en una pequeña cantidad entre cepas. Además, la secuencia de aminoácidos para las toxinas A y B en diferentes cepas puede diferir en el número de aminoácidos.

35 En una realización, el dominio de repetición de toxina A y/o dominio de repetición de toxina B puede ser una secuencia que es una variante con una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% con los aminoácidos 1832-2710 de SEQ ID NO:1 o una variante con una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% con los aminoácidos 1834-2366 de SEQ ID NO:2.

40 En una realización, el dominio N-terminal de toxina A puede ser una secuencia que es una variante con una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% con los aminoácidos 1-542. En una realización, el dominio N-terminal de toxina B puede ser una secuencia que es una variante con una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% con los aminoácidos 1-543 de SEQ ID NO: 2.

45 Una "variante" es un polipéptido que varía con respecto a los polipéptidos de referencia mediante sustituciones de aminoácido conservativas, mediante las cuales un residuo se sustituye por otro con las mismas propiedades físico-químicas. Normalmente tales sustituciones son entre Ala, Val, Leu y Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln, y entre los residuos básicos Lys y Arg; o residuos aromáticos Phe y Tyr.

50 Además, la numeración de aminoácido puede diferir entre los dominios C-terminales o dominios N-terminales de toxina A (o toxina B) de una cepa y la toxina A (o toxina B) de otra cepa. Por este motivo, el término "equivalente en una cepa diferente" se refiere a aminoácidos que corresponden a aquellos de una cepa de referencia (e.g., *C. difficile* VPI10463), pero que se encuentra en una toxina de una cepa diferente y que, por tanto, pueden estar numerados de manera diferente. Una región de aminoácidos "equivalentes" puede determinarse alineando las secuencias de las toxinas de las diferentes cepas. Los números de los aminoácidos proporcionados en todo el documento hacen referencia a aquellos de la cepa VPI10463.

55 El término "fragmento" de un polipéptido o proteína se refiere a una porción contigua, tal como al menos 100, 150, 180, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos, desde ese polipéptido o proteína.

60 "Fragmento de toxina A de dominio N-terminal" de *C. difficile* se refiere a una porción contigua, tal como al menos 100, 150, 180, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500 o 530 aminoácidos, desde el dominio N-terminal de longitud completa de toxina A. "Fragmento de toxina B de dominio N-terminal" de *C. difficile* se refiere a una porción contigua, tal como al menos 100, 150, 180, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500 o 530 aminoácidos, desde el dominio N-terminal de longitud completa de toxina B.

- El fragmento de dominio de repetición de toxina A puede ser una porción contigua de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos desde el dominio de repetición de toxina A. El fragmento de dominio de repetición de toxina A puede ser una porción contigua de menos de 750, menos de 700, menos de 650, menos de 600 o menos de 580 aminoácidos. El fragmento de dominio de repetición de toxina B puede ser una porción contigua de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos desde el dominio de repetición de toxina B. El fragmento de dominio de repetición de toxina B puede ser una porción contigua de menos de 530, menos de 500, menos de 480 o menos de 450 aminoácidos.
- El término “primer fragmento” se refiere a una porción contigua de al menos 100, tal como 150, 180, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600, aminoácidos del dominio de repetición de toxina A. El término “segundo fragmento” se refiere a una porción contigua de al menos 100, tal como 200, 230, 250, 280, 300, 350, 400, 450 o 500, aminoácidos del dominio de repetición de toxina B.
- El término “primer extremo proximal” se refiere al extremo del primer fragmento (fragmento de Tox A) que está ligado covalentemente al segundo fragmento (fragmento de Tox B) o ligado covalentemente a una secuencia ligadora entre el primer y el segundo fragmento. El término “segundo extremo proximal” se refiere al extremo del segundo fragmento que está más próximo al primer fragmento en la estructura primaria (secuencia de aminoácidos).
- El dominio C-terminal de la toxina A está constituido por 8 porciones de repetición (designadas porción de repetición I, porción de repetición II, porción de repetición III, porción de repetición IV, porción de repetición V, porción de repetición VI, porción de repetición VII y porción de repetición VIII). Cada una de estas porciones de repetición puede dividirse adicionalmente en repeticiones cortas (SR) y repeticiones largas (LR) (excepto la porción de repetición VIII de Tox A que no tiene una repetición larga). Cada una de las repeticiones largas tiene algo de similitud estructural y de secuencia con las otras repeticiones largas. De manera similar, las repeticiones cortas tienen algo de similitud de secuencia y estructural entre sí. De manera similar, el dominio C-terminal de toxina B está constituido por 5 porciones de repetición subdivididas en SR y LR. Cada porción de repetición contiene una LR y entre 2 y 5 SR (excepto la porción de repetición V de Tox B que no tiene una repetición larga). Para los propósitos de la divulgación una “porción de repetición” se refiere a una de las ocho porciones de repetición de ToxA (designadas I, II, III, IV, V, VI, VII o VIII) o una de las cinco porciones de repetición de ToxB (designadas I, II, III, IV o V) o una porción de repetición parcial del dominio de repetición de toxina A o toxina B. Tal como se usa en el presente documento, el término “primera porción de repetición” se refiere a una porción de repetición (o porción de repetición parcial) del dominio de repetición de toxina A. El término “segunda porción de repetición” se refiere a una porción de repetición (o porción de repetición parcial) del dominio de repetición de toxina B.
- Por ejemplo, la porción de repetición I de ToxA contiene tres SR y una LR, a las que puede hacerse referencia como la primera SRI de ToxA, la segunda SRI de ToxA, la tercera SRI de ToxA y la LRI de ToxA, respectivamente.
- Se considera que el primer extremo proximal está dentro de una “porción de repetición” si el primer fragmento termina en un aminoácido que está dentro de esa porción de repetición (es decir, el primer extremo proximal contiene solo parte de la secuencia de la porción de repetición). De manera similar, se considera que el segundo extremo proximal está dentro de una “porción de repetición” si el segundo fragmento termina en un aminoácido que está dentro de esa porción de repetición. Por ejemplo, el primer extremo proximal está dentro de la “porción de repetición I de ToxA” si el primer fragmento termina con uno cualquiera de los aminoácidos 1833-1923 (inclusive) de VPI10463 o su equivalente en otra cepa. El primer extremo proximal está dentro de una “repetición larga” o una “repetición corta” si el primer fragmento termina en un aminoácido que está dentro de una “repetición larga” o una “repetición corta”, de manera similar el segundo extremo proximal está dentro de una “repetición larga” o una “repetición corta” si el segundo fragmento termina en un aminoácido que está dentro de una “repetición larga” o una “repetición corta”.
- Las posiciones de aminoácido de cada dominio se han definido para la toxina A y la toxina B de la cepa VPI10463 (ATCC43255). Estas son tal como sigue (tabla 1)

| Nombre | | Posición inicial | Posición final |
|---------|-----|------------------|----------------|
| ToxA_I | SR1 | 1832 | 1852 |
| | SR2 | 1853 | 1873 |
| | SR3 | 1874 | 1893 |
| | LR | 1894 | 1924 |
| ToxA_II | SR1 | 1925 | 1944 |
| | SR2 | 1945 | 1965 |
| | SR3 | 1966 | 1986 |
| | SR4 | 1987 | 2007 |

ES 2 939 307 T3

| Nombre | | Posición inicial | Posición final |
|---------------|-----|-------------------------|-----------------------|
| | SR5 | 2008 | 2027 |
| | LR | 2028 | 2058 |
| ToxA_III | SR1 | 2059 | 2078 |
| | SR2 | 2079 | 2099 |
| | SR3 | 2100 | 2120 |
| | SR4 | 2121 | 2141 |
| | SR5 | 2142 | 2161 |
| | LR | 2162 | 2192 |
| ToxA_IV | SR1 | 2193 | 2212 |
| | SR2 | 2213 | 2233 |
| | SR3 | 2234 | 2253 |
| | SR4 | 2254 | 2275 |
| | LR | 2276 | 2306 |
| ToxA_V | SR1 | 2307 | 2326 |
| | SR2 | 2327 | 2347 |
| | SR3 | 2348 | 2368 |
| | SR4 | 2369 | 2389 |
| | SR5 | 2390 | 2409 |
| | LR | 2410 | 2440 |
| ToxA_VI | SR1 | 2441 | 2460 |
| | SR2 | 2461 | 2481 |
| | SR3 | 2482 | 2502 |
| | SR4 | 2503 | 2522 |
| | LR | 2523 | 2553 |
| ToxA_VII | SR1 | 2554 | 2573 |
| | SR2 | 2574 | 2594 |
| | SR3 | 2595 | 2613 |
| | LR | 2614 | 2644 |
| ToxA_VIII | SR1 | 2645 | 2664 |
| | SR2 | 2665 | 2686 |
| | SR3 | 2687 | 2710 |
| ToxB_I | SR1 | 1834 | 1854 |
| | SR2 | 1855 | 1876 |
| | SR3 | 1877 | 1896 |
| | LR | 1897 | 1926 |
| ToxB_II | SR1 | 1927 | 1946 |
| | SR2 | 1947 | 1967 |
| | SR3 | 1968 | 1987 |
| | SR4 | 1988 | 2007 |
| | SR5 | 2008 | 2027 |
| | LR | 2028 | 2057 |
| ToxB_III | SR1 | 2058 | 2078 |
| | SR2 | 2079 | 2099 |
| | SR3 | 2100 | 2119 |

| Nombre | | Posición inicial | Posición final |
|---------|-----|------------------|----------------|
| | SR4 | 2120 | 2139 |
| | SR5 | 2140 | 2159 |
| | LR | 2160 | 2189 |
| ToxB_IV | SR1 | 2190 | 2212 |
| | SR2 | 2213 | 2233 |
| | SR3 | 2234 | 2253 |
| | SR4 | 2254 | 2273 |
| | SR5 | 2274 | 2293 |
| | LR | 2294 | 2323 |
| ToxB_V | SR1 | 2324 | 2343 |
| | SR2 | 2344 | 2366 |

En una realización, la porción de repetición de toxina A se refiere a los aminoácidos 1832-1924, 1925-2058, 2059-2192, 2193-2306, 2307-2440, 2441-2553, 2554-2644 o 2645-2710 de la toxina A (SEQ ID NO:1) o un equivalente en una cepa diferente de *C. difficile*. En otra realización, la porción de repetición de toxina B se refiere a los aminoácidos 1834-1926, 1927-2057, 2058-2189, 2190-2323 o 2324-2366 de la toxina B (SEQ ID NO:2) o un equivalente en una cepa diferente de *C. difficile*.

El término “repetición corta” puede hacer referencia a los aminoácidos 1832-1852, 1853-1873, 1874-1893, 1925-1944 1945-1965, 1966-1986, 1987-2007, 2008-2027, 2059-2078, 2079-2099, 2100-2120, 2121-2141, 2142-2161, 2193-2212, 2213-2233, 2234-2253, 2254-2275, 2307-2326, 2327-2347, 2348-2368, 2369-2389, 2390-2409, 2441-2460, 2461-2481, 2482-2502, 2503-2522, 2554-2573, 2574-2594, 2595-2613, 2645-2664, 2665-2686 o 2687-2710 de la toxina A (SEQ ID NO:1) o los aminoácidos 1834-1854, 1855-1876, 1877-1896, 1927-1946, 1947-1967, 1968-1987, 1988-2007, 2008-2027, 2058-2078, 2079-2099, 2100-2119, 2120-2139, 2140-2159, 2190-2212, 2213-2233, 2234-2253, 2254-2273, 2274-2293, 2324-2343 o 2344-2366 de la toxina B (SEQ ID NO:2) o sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*.

De manera similar, el término “repetición larga” puede hacer referencia a los aminoácidos 1894-1924, 2028-2058, 2162-2192, 2276-2306, 2410-2440, 2523-2553 o 2614-2644 de la toxina A (SEQ ID NO:1) o los aminoácidos 1897-1926, 2028-2057, 2160-2189 o 2294-2323 de la toxina B (SEQ ID NO:2) o sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*.

Los polipéptidos de la invención pueden formar parte de una proteína más grande tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias que ayuda en la purificación, tal como múltiples residuos histidina, o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante. Además, también se considera la adición de un polipéptido exógeno o una cola lipídica o secuencias de polinucleótido para aumentar el potencial inmunogénico de la molécula final.

La palabra “adyacente” significa separado por menos de o exactamente 20, 15, 10, 8, 5, 2, 1 o 0 aminoácidos en la estructura primaria.

Los fragmentos pueden estar situados de modo que el extremo N-terminal del primer fragmento sea adyacente al extremo C-terminal del segundo fragmento, alternativamente el extremo C-terminal del primer fragmento puede ser adyacente al extremo N-terminal del segundo fragmento, o el extremo C-terminal del primer fragmento puede ser adyacente al extremo C-terminal del segundo fragmento, o el extremo N-terminal del primer fragmento puede ser adyacente al extremo N-terminal del segundo fragmento.

Dos secuencias tendrán “similitud de secuencia entre sí” si tienen más del 30%, del 50%, del 70%, del 75%, del 80%, del 85%, del 90%, del 95%, del 98%, del 99% o del 100% de identidad de secuencia.

El término “identidad” se conoce en la técnica. La identidad es una relación entre dos o más secuencias de polipéptido o dos o más secuencias de polinucleótido, según sea el caso, tal como se determina comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de secuencia entre el polipéptido o las secuencias de polinucleótido, según sea el caso, tal como se determina mediante la coincidencia entre las cadenas de tales secuencias. La “identidad” puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a aquellos descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence

- Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los métodos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Además, los métodos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programa informático para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el programa Needle, BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. *et al.*, J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990)), y FASTA Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988)). La familia BLAST de programas está disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). El algoritmo de Smith Waterman ampliamente conocido también puede usarse para determinar la identidad.
- En un ejemplo, los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptido incluyen los siguientes:
- Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)
- Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)
- Penalización de hueco: 10
Penalización de extensión de hueco: 0,5
- Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como programa “Needle” del paquete EMBOSS (Rice P.*et al.*, Trends in Genetics 2000 col.16(6):276-277). Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con ninguna penalización para los huecos de extremo).
- En una realización, la primera porción de repetición y la segunda porción de repetición tienen una alta similitud estructural entre sí. Puede considerarse que dos secuencias tienen una alta similitud estructural cuando su porcentaje de identidad es mayor del 40%, del 45%, del 50% o del 60% (M.Marty-Renom *et al.* Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct. 2000 vol.29:291-325). La presencia de una alta similitud estructural puede determinarse comparando las dos secuencias usando los softwares SwissModel y SwissPDB Viewer.
- En una realización, el polipéptido de la invención desencadena anticuerpos que neutralizan la toxina A o la toxina B. En una realización adicional, el polipéptido desencadena anticuerpos que neutralizan la toxina A. En una realización adicional, el polipéptido desencadena anticuerpos que neutralizan la toxina B. En una realización adicional, el polipéptido desencadena anticuerpos que neutralizan la toxina A y la toxina B. La frase “desencadena anticuerpos neutralizantes” significa que cuando las composiciones se usan para inmunizar un mamífero, por ejemplo un ratón, una cobaya o un humano, el mamífero genera anticuerpos neutralizantes.
- Si un polipéptido desencadena anticuerpos neutralizantes frente a una toxina puede medirse inmunizando ratones con una composición immunogénica que comprende el polipéptido, recogiendo sueros y analizando los títulos antitoxina de los sueros usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Los sueros podrían compararse con una muestra de referencia obtenida de ratones que no se han inmunizado. Un ejemplo de esta técnica puede encontrarse en el ejemplo 6. El polipéptido de la invención desencadena anticuerpos que neutralizan toxina A si los sueros frente al polipéptido dan una lectura de ELISA de más del 10%, del 20%, del 30%, del 50%, del 70%, del 80%, del 90% o del 100% mayor que la muestra de referencia.
- En una realización adicional, el polipéptido de la invención desencadena una respuesta inmunitaria protectora en un huésped mamífero frente a cepas de *C. difficile*. La frase “desencadenar una respuesta inmunitaria protectora” significa que cuando la composición immunogénica de la invención se usa para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, cobaya o humano, el mamífero genera anticuerpos capaces de proteger al mamífero frente a la muerte provocada por *C. difficile*. En una realización, el huésped mamífero se selecciona del grupo que consiste en ratón, conejo, cobaya, mono, primate no humano o humano. En una realización, el huésped mamífero es un ratón. En una realización adicional, el huésped mamífero es un humano.
- Si un polipéptido desencadena una respuesta inmunitaria protectora en un huésped mamífero frente a cepas de *C. difficile* puede determinarse usando un ensayo de exposición. En un ensayo de este tipo, el huésped mamífero se vacuna con el polipéptido y se expone mediante exposición a *C. difficile*. El tiempo que el mamífero sobrevive tras la exposición se compara con el tiempo que un mamífero de referencia que no se ha inmunizado con el polipéptido sobrevive. Un polipéptido desencadena una respuesta inmunitaria protectora si un mamífero inmunizado con el polipéptido sobrevive al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 50%, un 70%, un 80%, un 90% o un 100% más tras la exposición con *C. difficile* que un mamífero de referencia que no se ha inmunizado con el polipéptido. En una realización, el polipéptido de la invención desencadena una respuesta inmunitaria protectora frente a *C. difficile* en un

mamífero seleccionado del grupo que consiste en ratón, cobaya, mono o humano. En una realización, el mamífero es un ratón, en una realización adicional el mamífero es un humano.

La estructura nativa de los dominios (de repetición) C-terminales de las toxinas A y B consiste en una estructura de tipo solenoide β extendida. Esta estructura consiste en estructuras principalmente de lámina β , con una minoría de estructuras helicoidales α como puede verse en Ho *et al* (PNAS 102:18373-18378 (2005)). Las estructuras secundarias presentes pueden determinarse usando dicroísmo circular (CD). Por ejemplo, la estructura secundaria puede determinarse midiendo la forma y la magnitud de los espectros de CD en la región UV lejana (190-250 nm) y comparando los resultados con aquellos de estructuras conocidas. Esto puede llevarse a cabo usando una ruta óptica de 0,01 cm desde 178 hasta 250 nm, con un ancho de banda y una resolución de 1 nm en un espectropolarímetro Jasco J-720, por ejemplo, como puede verse en el ejemplo 5 más adelante.

En una realización, el primer fragmento comprende menos del 28%, del 25%, del 23%, del 20%, del 18%, del 15%, del 10% o del 7% de estructura secundaria helicoidal alfa. En una realización, el segundo fragmento comprende menos del 28%, del 25%, del 23%, del 20%, del 18%, del 15%, del 10% o del 7% de estructura secundaria helicoidal alfa. En una realización adicional, tanto el primer fragmento como el segundo fragmento comprenden menos del 28%, del 25%, del 23%, del 20%, del 18%, del 15%, del 10% o del 7% de estructura secundaria helicoidal alfa.

En una realización, el primer fragmento comprende más del 20%, del 25%, del 28%, del 30%, del 33%, del 35%, del 38%, del 40% o del 42% de estructura de lámina beta. En una realización, el segundo fragmento comprende más del 20%, del 25%, del 28%, del 30%, del 33%, del 35%, del 38%, del 40% o del 42% de estructura de lámina beta. En una realización adicional, tanto el primer fragmento como el segundo fragmento comprenden más del 20%, del 25%, del 28%, del 30%, del 33%, del 35%, del 38%, del 40% o del 42% de estructura de lámina beta.

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición V (aminoácidos 2307-2440 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente), la porción de repetición VI (aminoácidos 2441-2553 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente), la porción de repetición VII (aminoácidos 2554-2644 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) o la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A. En una realización adicional, el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VII (aminoácidos 2554-2644 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A. En una realización adicional, el primer extremo proximal porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A.

En una realización, el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834-1926 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente), la porción de repetición II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) o la porción de repetición III (aminoácidos 2058-2189 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional, el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional, el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834-1926 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B.

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de una repetición larga. El primer extremo proximal puede estar dentro de la repetición larga V de la toxina A (aminoácidos 2410-2440 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga VI de la toxina A (aminoácidos 2523-2553 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga VII de la toxina A (aminoácidos 2614-2644 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente).

En una realización, el segundo extremo proximal está dentro de una repetición larga. El segundo extremo proximal puede estar dentro de la repetición larga I de la toxina B (aminoácidos 1897-1926 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga II de la toxina B (aminoácidos 2028-2057 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga III de la toxina B (aminoácidos 2160-2189 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente).

En una realización adicional, el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal están ambos dentro de repeticiones largas. En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición larga V de la toxina A (aminoácidos 2410-2440 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga VI de la toxina A (aminoácidos 2523-2553 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga VII de la toxina A (aminoácidos 2614-2644 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición larga de la toxina B (aminoácidos 1897-1926 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga II de la toxina B (aminoácidos 2028-2057 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga III de la toxina B (aminoácidos 2160-2189 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición larga VII de la toxina A (aminoácidos 2614-2644 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición larga II de la toxina B (aminoácidos 2028-

2057 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente).

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2620-2660 de la toxina A. En una realización, el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2030-2050 de la toxina B. En una realización adicional, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2620-2660 de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2030-2050 de la toxina B.

En una realización, el primer fragmento comprende al menos 100, 150, 180, 200, 240, 250, 280, 300, 330, 350, 380, 400, 430, 450, 480, 500 o 530 aminoácidos. En una realización, el segundo fragmento comprende al menos 100, 130, 150, 180, 200, 230, 250, 270, 300, 330, 350, 390 o 400 aminoácidos.

En una realización, el polipéptido comprende además un ligador. Este ligador puede estar entre el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal, alternativamente el ligador puede ligar los extremos distales del primer fragmento y/o del segundo fragmento a una secuencia de aminoácidos adicional.

Puede emplearse una secuencia ligadora de péptido para separar el primer fragmento y el segundo fragmento. Una secuencia ligadora de péptido de este tipo se incorpora a la proteína de fusión usando técnicas convencionales ampliamente conocidas en la técnica. Las secuencias ligadoras de péptido adecuadas pueden elegirse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interaccionar con epítopos funcionales en el primer fragmento y/o los segundos fragmentos; y (3) la ausencia de residuos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítopos funcionales de ToxA y/o ToxB. Las secuencias ligadoras de péptido pueden contener residuos glicina (Gly), asparagina (Asn) y serina (Ser). También pueden usarse otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, en la secuencia ligadora. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como ligadores incluyen aquellas dadas a conocer en Maratea *et al.*, Gene 40:39-46 (1985); Murphy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); la patente estadounidense n.º 4.935.233 y la patente estadounidense n.º 4.751.180. La secuencia ligadora puede tener generalmente desde 1 hasta aproximadamente 50 aminoácidos de longitud.

En una realización, el ligador comprende 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-2, 5-20, 5-15, 5-15, 10-20 o 10-15 aminoácidos. En una realización, el ligador es un ligador de glicina, el ligador puede comprender múltiples residuos glicina contiguos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 o 20), o alternativamente el ligador puede comprender algunos residuos glicina y algunos residuos de otros aminoácidos tales como alanina. En una realización adicional, el ligador comprende un único residuo glicina.

En una realización, el polipéptido de la invención forma parte de una proteína de fusión más grande. Las proteínas de fusión pueden comprender además aminoácidos que codifican para una porción inmunogénica de un antígeno de proteína adicional. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender además una porción inmunogénica de un antígeno de proteína obtenido o derivado de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E. coli*, *M. cattarhalis*, *C. tetanii*, *C. diphtheriae*, *B. pertussis*, *S. epidermidis*, enterococos, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. En este caso, el ligador puede estar entre el primer fragmento o el segundo fragmento y una porción inmunogénica adicional de un antígeno de proteína.

El término “porción inmunogénica del mismo” o “fragmento inmunogénico” se refiere a un fragmento de un polipéptido, comprendiendo el fragmento un epítopo que es reconocido por linfocitos T citotóxicos, linfocitos T auxiliares o células B. De manera adecuada, la porción inmunogénica comprenderá al menos el 30%, de manera adecuada al menos el 50%, especialmente al menos el 75% y en particular al menos el 90% (e.g. el 95% o el 98%) de los aminoácidos en la secuencia de referencia. En una realización, la porción inmunogénica comprenderá todas las regiones de epítopo de la secuencia de referencia.

También se espera que las composiciones inmunogénicas según la invención que comprenden las proteínas de fusión específicas de un fragmento de dominio de repetición de toxina A de *C. difficile* y un fragmento de dominio de repetición de toxina B de *C. difficile* descritos en el presente documento proporcionen una respuesta inmunitaria mejorada frente a *C. difficile* en comparación con composiciones que comprenden polipéptidos o fragmentos *C. difficile* conocidos.

55 ADYUVANTES

Las composiciones inmunogénicas dadas a conocer en el presente documento incluyen al menos un polipéptido de *C. difficile* en combinación con un adyuvante libre de aluminio. Los polipéptidos se formulan con un adyuvante que está libre de aluminio o sales de aluminio, es decir, un adyuvante o sistema adyuvante libre de aluminio.

En determinadas realizaciones que no forman parte de la invención, el polipéptido de *C. difficile* se formula con un adyuvante que comprende una fracción de saponina inmunológicamente activa presentada en forma de un liposoma. El adyuvante puede comprender además un lipopolisacárido. El adyuvante puede incluir QS21. Por ejemplo, en una realización, el adyuvante contiene QS21 en una formulación liposomal. En una realización, el sistema adyuvante

incluye 3D-MPL y QS21. Por ejemplo, en una realización, el adyuvante contiene 3D-MPL y QS21 en una formulación liposomal. Opcionalmente, el sistema adyuvante contiene también colesterol. En una realización específica, el adyuvante incluye QS21 y colesterol. Opcionalmente, el sistema adyuvante contiene 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC). Por ejemplo, en un sistema adyuvante específico contiene colesterol, DOPC, 3D-MPL y QS21.

- 5 En un ejemplo específico que no forma parte de la invención, la composición inmunogénica incluye un adyuvante formulado en una dosis que incluye: desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 mg de colesterol; desde aproximadamente 0,25 hasta aproximadamente 2 mg de DOPC; desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 100 µg de 3D-MPL; y desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 100 µg de QS21. En una realización específica adicional, la composición inmunogénica incluye un adyuvante formulado en una dosis que incluye: desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 mg de colesterol, desde aproximadamente 0,25 hasta aproximadamente 2 mg de DOPC, desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 100 µg de 3D-MPL y desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 100 µg de QS21. En una formulación específica, el adyuvante se formula en una única dosis que contiene: aproximadamente 0,25 mg de colesterol; aproximadamente 1,0 mg de DOPC; aproximadamente 50 µg de 3D-MPL; y aproximadamente 50 µg de QS21. En otras realizaciones, la composición inmunogénica se formula con una dosis fraccionada (es decir, una dosis que es una fracción de las formulaciones de única dosis precedentes, tal como la mitad de la cantidad precedente de componentes (colesterol, DOPC, 3D-MPL y QS21), ¼ de la cantidad precedente de componentes u otra dosis fraccionada (e.g., 1/3, 1/6, etc.) de la cantidad precedente de componentes.
- 10 20 En una realización que no forma parte de la invención, las composiciones inmunogénicas según la invención incluyen un adyuvante que contiene combinaciones de lipopolisacárido y saponinas de Quillaja que se han dado a conocer previamente, por ejemplo en el documento EP0671948. Esta patente demostró una fuerte sinergia cuando se combinó un lipopolisacárido (3D-MPL) con una saponina de Quillaja (QS21).
- 15 25 El adyuvante puede comprender además oligonucleótidos inmunoestimulantes (por ejemplo, CpG) o un portador.

Una saponina particularmente adecuada para su uso que no forma parte de la presente invención e Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de Sudamérica *Quillaja saponaria Molina* y se describió por primera vez por Dalsgaard *et al.* en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, vol. 44, Springer Verlag, Berlín, págs. 243-254) que tenía actividad adyuvante. Se han aislado fragmentos purificados de Quil A mediante HPLC que conservan actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria Molina*, que induce células T citotóxicas CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

En una realización específica que no forma parte de la invención, QS21 se proporciona en su composición menos reactogénica, en la que se extingue con un esterol exógeno, tal como colesterol por ejemplo. Existen varias formas particulares de composiciones menos reactogénicas en las que QS21 se extingue con un colesterol exógeno. En una realización específica, la saponina/esterol está en forma de una estructura de liposoma (documento WO 96/33739, ejemplo 1). En esta realización, los liposomas contienen de manera adecuada un lípido neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que de manera adecuada es no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) o dilaurilfosfatidilcolina. Los liposomas pueden contener también un lípido cargado que aumenta la estabilidad de la estructura liposoma-QS21 para liposomas compuestos de lípidos saturados. 40 45 En estos casos, la cantidad de lípido cargado es de manera adecuada del 1-20% p/p, preferiblemente del 5-10%. La razón de esterol con respecto a fosfolípido es del 1-50% (mol/mol), de manera adecuada del 20-25%.

Los esteroides adecuados incluyen β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. En una realización particular que no forma parte de la invención, la composición adyuvante comprende colesterol como esterol. Estos esteroides se conocen ampliamente en la técnica, por ejemplo el colesterol se da a conocer en el Merck Index, 11^a ed., página 341, como un esterol que se produce de manera natural encontrado en la grasa animal.

Cuando la fracción de saponina activa es QS21, la relación de QS21:esterol será normalmente del orden de 1:100 a 1:1 (p/p), de manera adecuada entre 1:10 y 1:1 (p/p), y preferiblemente entre 1:5 y 1:1 (p/p). De manera adecuada 55 está presente esterol en exceso, siendo la relación de QS21:esterol de al menos 1:2 (p/p). En una realización que no forma parte de la invención, la relación de QS21:esterol es de 1:5 (p/p). El esterol es de manera adecuada colesterol.

Una realización que no forma parte de la invención proporciona una dosis de una composición inmunogénica que comprende saponina inmunológicamente activa, preferiblemente QS21, a un nivel de 60 µg o menos, por ejemplo 60 entre 1 y 60 µg. En una realización que no forma parte de la invención, la dosis de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de aproximadamente alrededor de 50 µg, por ejemplo entre 45 y 55 µg, de manera adecuada entre 46 - 54 µg o entre 47 y 53 µg o entre 48 y 52 µg o entre 49 y 51 µg, o 50 µg por dosis.

En otra realización que no forma parte de la invención, la dosis de la composición inmunogénica comprende QS21 a

un nivel de alrededor de 25 µg, por ejemplo entre 20 - 30 µg, de manera adecuada entre 21 - 29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, o 25 µg.

5 En otra realización que no forma parte de la invención, la dosis de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de alrededor de 10 µg por, por ejemplo entre 5 y 15 µg, de manera adecuada entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg, o 10 µg.

10 En una realización que no forma parte de la invención, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 25 µg o 50 µg de QS21 por dosis. En otra realización que no forma parte de la invención, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 50 µg de QS21 por dosis.

El lipopolisacárido puede ser un derivado no tóxico de lípido A, particularmente monofosforil-lípido A o más particularmente monofosforil-lípido A 3-desacilado (3D - MPL).

15 3D-MPL se vende con el nombre MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y se denomina a lo largo del documento MPL o 3D-MPL. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094. 3D-MPL fomenta principalmente respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-γ (Th1). 3D-MPL puede producirse según los métodos dados a conocer en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil-lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En realizaciones que no forman parte de la invención, se usa 20 3D-MPL de partículas pequeñas. 3D-MPL de partículas pequeñas tiene un tamaño de partícula tal, que puede filtrarse de manera estéril a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en el documento WO 94/21292.

Una realización que no forma parte de la invención proporciona una dosis de una composición inmunogénica que 25 comprende lipopolisacárido, preferiblemente 3D-MPL, a un nivel de 75 µg o menos, por ejemplo entre 1 y 60 µg. En una realización que no forma parte de la invención, el lipopolisacárido está presente en una cantidad de aproximadamente 50 µg por dosis.

En una realización que no forma parte de la invención, la dosis de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de alrededor de 50 µg, por ejemplo entre 45 - 55 µg, de manera adecuada entre 46 - 54 µg o entre 47 y 30 53 µg o entre 48 y 52 µg o entre 49 y 51 µg, o 50 µg.

En una realización que no forma parte de la invención, la dosis de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de alrededor de 25 µg, por ejemplo entre 20 - 30 µg, de manera adecuada entre 21 - 29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, o 25 µg.

35 En otra realización que no forma parte de la invención, la dosis de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de alrededor de 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, de manera adecuada entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg, o 10 µg.

40 En una realización, el volumen de la dosis es de 0,5 ml. En una realización adicional, la composición inmunogénica está en un volumen adecuado para una dosis, volumen que es mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En una realización adicional, la dosis humana es de entre 1 ml y 1,5 ml.

En una realización que no forma parte de la invención, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 25 µg o 45 50 µg de 3D-MPL por dosis. En otra realización que no forma parte de la invención, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 50 µg de 3D-MPL por dosis.

La dosis de la composición inmunogénica según cualquier aspecto de la invención de manera adecuada se refiere a 50 dosis humana. Con el término "dosis humana" quiere decirse una dosis que está en un volumen adecuado para uso en humanos. En una realización, una dosis humana es de 0,5 ml. En una realización adicional, una dosis humana es de más de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En una realización adicional, una dosis humana es de entre 1 ml y 1,5 ml.

55 En algunas realizaciones que no forman parte de la invención, las composiciones son con liposomas que se preparan inicialmente sin MPL (tal como se describe en el documento WO 96/33739), y entonces se añade MPL, de manera adecuada como partículas pequeñas de partículas de menos de 100 nm o partículas que son susceptibles a filtración estéril a través de una membrana de 0,22 µm. Por tanto, el MPL no está contenido dentro de la membrana vesicular (conocido como MPL externo). Las composiciones en las que el MPL está contenido dentro de la membrana vesicular (conocido como MPL interno) también forman un aspecto que no forma parte de la invención. El polipéptido que comprende un fragmento de toxina A de *C. difficile* y/o un fragmento de toxina B de *C. difficile* puede estar contenido dentro de la membrana vesicular o contenido fuera de la membrana vesicular.

En una realización específica que no forma parte de la invención, QS21 y 3D-MPL están presentes en la misma

concentración final por dosis de la composición inmunogénica. En un aspecto de esta realización que no forma parte de la invención, una dosis de composición inmunogénica comprende un nivel final de 25 µg de 3D-MPL y 25 µg de QS21 o 50 µg de 3D-MPL y 50 µg de QS21.

- 5 En una realización, el adyuvante incluye una emulsión de agua en aceite. Por ejemplo, la emulsión de agua en aceite incluye una fase de aceite que incorpora un aceite metabolizable, y un componente de fase de aceite adicional, tal como un tocol. La emulsión de agua en aceite puede contener también un componente acuoso, tal como una solución salina tamponada (e.g., solución salina tamponada con fosfato). Además, la emulsión de agua en aceite contiene un emulsionante. En una realización, el aceite metabolizable es escualeno. En una realización, el tocol es alfa-tocoferol.
- 10 10 En una realización, el emulsionante es un emulsionante tensioactivo no iónico (tal como monooleato de polioxietileno-sorbitano, TWEEN80™). En realizaciones a modo de ejemplo, la emulsión de agua en aceite contiene escualeno y alfa-tocoferol en una relación que es igual a o menor de 1 (p/p).

El aceite metabolizable en la emulsión de agua en aceite puede estar presente en una cantidad de 0,5-10 mg. El tocol en la emulsión de agua en aceite puede estar presente en una cantidad de 0,5 - 11 mg. El agente emulsionante puede estar presente en una cantidad de 0,4 - 4 mg,

Con el fin de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para la administración humana, la fase de aceite del sistema de emulsión tiene que comprender un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable se conoce ampliamente en la técnica. Metabolizable puede definirse como "que puede transformarse mediante metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25^a edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y pueda transformarse mediante metabolismo. Los frutos secos, las semillas y los cereales son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también forman parte de esta invención y pueden incluir aceites disponibles comercialmente tales como NEOBEE® (triglicéridos caprílicos/cápricos elaborados usando glicerol de fuentes de aceite vegetal y ácidos grasos de cadena media (MCT) de aceites de coro o de semilla de palma) y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en menores cantidades en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura, y es un aceite particularmente preferido para su uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable debido al hecho de que es un producto intermedio en la biosíntesis de colesterol (Merck index, 10^a edición, entrada n.º 8619).

De manera adecuada, el aceite metabolizable está presente en la composición adyuvante en una cantidad de 0,5-10 mg, preferiblemente 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7 o 5-6 mg (e.g. 2-3, 5-6 o 9-10 mg), de manera específica aproximadamente 5,35 mg.

Los tocoles se conocen ampliamente en la técnica y se describen en el documento EP0382271. De manera adecuada, el tocol es alfa-tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). Dicho tocol está presente de manera adecuada en una cantidad de 0,5-11 mg, preferiblemente 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6 mg (e.g. 10-11, 5-6, 2,5-3,5 o 1-3 mg). En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad de aproximadamente 5,94 mg.

La emulsión de aceite en agua comprende además un agente emulsionante. El agente emulsionante puede ser de manera adecuada monooleato de polioxietileno-sorbitano. En una realización particular, el agente emulsionante puede ser Polysorbate® 80 (monooleato de polioxietileno (20)-sorbitano) o Tween® 80.

Dicho agente emulsionante está presente de manera adecuada en la composición adyuvante en una cantidad de 0,1-5, 0,2-5, 0,3-4, 0,4-3 o 2-3 mg (e.g. 0,4-1,2, 2-3 o 4-5 mg) de agente emulsionante. En una realización específica, el agente emulsionante está presente en una cantidad de aproximadamente 0,97 mg o aproximadamente 2,425 mg.

En una realización, las cantidades de componentes específicos presentes en la composición son las cantidades presentes en una dosis humana de 0,5 ml. En una realización adicional, la composición inmunogénica está en un volumen adecuado para una dosis humana, volumen que es mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En una realización adicional, la dosis humana es de entre 1 ml y 1,5 ml.

Cuando el adyuvante está en una forma líquida y debe combinarse con una forma líquida de una composición de polipéptido, la composición adyuvante en una dosis humana será una fracción del volumen final previsto de la dosis humana, por ejemplo, aproximadamente la mitad del volumen final previsto de la dosis humana, por ejemplo, un volumen de 350 µl para una dosis humana prevista de 0,7 ml, o un volumen de 250 µl para una dosis humana prevista de 0,5 ml. La composición adyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno de polipéptido para proporcionar la dosis humana final de la vacuna. El volumen final de tal dosis naturalmente variará dependiendo del volumen inicial de la composición adyuvante y el volumen de composición de antígeno de polipéptido añadido a la composición adyuvante. En una realización alternativa, se usa un adyuvante líquido para reconstituir una composición

de polipéptido liofilizada. En esta realización, la dosis humana de la composición adyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis humana. La composición adyuvante líquida se añade al vial que contiene la composición de polipéptido liofilizada. La dosis humana final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml.

- 5 El método de producción de emulsiones de agua en aceite se conoce ampliamente por el experto en la técnica. Comúnmente, el método comprende mezclar la fase de aceite que contiene tocol con un tensioactivo tal como una disolución de PBS/monooleato de polioxietileno-sorbitano, seguido de homogeneización usando un homogeneizador. Estaría claro para un experto en la técnica que un método que comprende hacer pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar volúmenes pequeños de líquido. Igualmente, el proceso 10 de emulsionamiento en un microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a un aporte de presión máximo de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar)) podría adaptarse por el experto en la técnica para producir volúmenes más pequeños o más grandes de emulsión. La adaptación podría conseguirse mediante experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta conseguir una preparación con gotitas de aceite del diámetro requerido.
- 15 En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante deben estar en un portador acuoso. El portador acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.
- 20 Preferiblemente, los sistemas de emulsión de agua en aceite de la presente invención tienen un tamaño de gotita de aceite pequeño en el rango submicrométrico. De manera adecuada, los tamaños de gotita estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, más preferiblemente tamaños de desde 120 hasta 600 nm de diámetro. Lo más preferiblemente, la emulsión de aceite en agua contiene gotitas de aceite de las que al menos el 70% en intensidad tienen menos de 500 nm de diámetro, más preferiblemente al menos el 80% en intensidad tienen menos de 300 nm de diámetro, más preferiblemente al menos el 90% en intensidad están en el intervalo de 120 a 200 nm de diámetro.
- 25 En una realización, la composición inmunogénica no es 3 µg o 10 µg de cualquiera de las SEQ ID No. 1 a 7 combinada con un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua que tiene 0,125 ml de emulsión SB62 (volumen total), 5,35 mg de escualeno, 5,94 mg de DL- α -tocoferol y 2,425 mg de polisorbato 80 por 0,5 ml de dosis. En una realización, la composición inmunogénica no es 3 µg o 10 µg de cualquiera de las SEQ ID No. 1 a 7 combinada con 30 un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, 5,35 mg de escualeno, 5,94 mg de DL- α -tocoferol y 2,425 mg de polisorbato 80 por 0,5 ml de dosis. En una realización, la composición inmunogénica no contiene un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua que tiene escualeno, DL- α -tocoferol y polisorbato 80.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y VACUNAS

- 35 En una realización, la composición inmunogénica comprende además antígenos adicionales. En una realización, los antígenos adicionales son antígenos derivados de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), *Clostridium tetani* (*C. tetani*), *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*), *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), enterococos y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). En una realización adicional, la composición inmunogénica de la invención puede comprender antígenos adicionales de *C. difficile*, por ejemplo las proteínas Slayer (documento WO01/73030). Opcionalmente, la composición inmunogénica comprende además un sacárido de *C. difficile*.
- 45 Se proporciona adicionalmente una vacuna que comprende la composición inmunogénica. Esta vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional de la invención se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención y un adyuvante.
- 50 Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger a un mamífero susceptible a infección por *C. difficile* o tratar un mamífero con una infección por *C. difficile*, por medio de la administración de dicha vacuna a través de una vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio de administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una única dosis, componentes de la misma también pueden 55 administrarse conjuntamente juntos al mismo tiempo o en tiempos diferentes (por ejemplo conjugados de sacáridos pneumocócicos podrían administrarse por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas tras la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para la coordinación de las respuestas inmunitarias unas con respecto a otras). Además de una única vía de administración, pueden usarse 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, sacáridos o conjugados de sacárido pueden administrarse por vía intramuscular (IM) o por vía 60 intradérmica (ID) y proteínas bacterianas pueden administrarse por vía intranasal (EN) o por vía intradérmica (ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse IM para dosis de cebado y EN para dosis de refuerzo.

El contenido de toxinas en la vacuna estará normalmente en el intervalo de 1-250 µg, preferiblemente 5-50 µg, lo más normalmente en el intervalo de 5 - 25 µg. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias

inmunizaciones de refuerzo espaciadas de manera adecuada. La preparación de vacunas se describe en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton, patente estadounidense 4.235.877.

5 En un aspecto de la invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende además un vial que contiene un adyuvante tal como se describe en el presente documento. Está previsto que en este aspecto de la invención, el adyuvante se usará para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

10 Un aspecto adicional es la composición inmunogénica o vacuna de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de infección por *C. difficile*, usando una dosis inmunoprotectora de dicha composición inmunogénica o vacuna de la invención. En una realización se proporciona la composición inmunogénica o vacuna de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de episodios primarios y/o recurrentes de infección por *C. difficile* usando una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna de la invención. En una realización, el sujeto 15 se selecciona del grupo que consiste en ratón, conejo, cobaya, mono, primate no humano o humano. En una realización, el sujeto es un ratón. En una realización adicional el sujeto es un humano.

Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de infección o enfermedad provocada por *C. difficile*. En una realización se proporciona 20 una composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de episodios primarios y/o recurrentes de enfermedad por *C. difficile*.

"Enfermedad por *C. difficile*" se refiere a cualquier infección o enfermedad provocada por toxinas liberadas por *C. difficile*. Ejemplos de enfermedad por *C. difficile* son diarrea asociada a antibióticos (AAD), colitis pseudomembranosa 25 y megacolon tóxico, que pueden ser potencialmente mortales.

"Alrededor de" o "aproximadamente" se definen como dentro del 10% más o menos del número facilitado para los propósitos de la invención.

30 Los inventores pretenden que los términos "que comprende(n)", "comprenden" y "comprende" en el presente documento puedan sustituirse opcionalmente por los términos "que consiste(n) en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cualquier caso. El término "comprende" significa "incluye". Por tanto, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" implica la inclusión de un compuesto o composición expresado (e.g., ácido nucleico, polipéptido, antígeno) 35 o etapa, o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de ningún otro compuesto, composición, etapa o grupo de los mismos. La abreviatura, "e.g." se deriva del latín *exempli gratia*, y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por tanto, la abreviatura "e.g." es sinónima con el término "por ejemplo."

Realizaciones en el presente documento relativas a la "vacuna" de la invención son también aplicables a realizaciones 40 relativas a "composiciones inmunogénicas" de la invención, y viceversa.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, Genes 45 V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

50 Los términos en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Debe entenderse además que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácido, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, facilitados para ácidos nucleicos o polipéptidos son estimaciones y se proporcionan para su descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas facilitadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno de polipéptido, 55 pueden ser aproximadas.

Estos ejemplos expuestos a continuación son solo con fines de ilustración y no deben interpretarse como que limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

60 Se entenderá que los aspectos y las realizaciones particulares descritos en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán establecer usando estudio rutinario, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en

el presente documento. Se considera que tales equivalentes están dentro del alcance de esta invención y están cubiertos por las reivindicaciones.

5 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno/una", pero también es consistente con el significado de "uno/una o más", "al menos uno/una" y "uno/una o más de uno/una".

La invención se describirá adicionalmente mediante la referencia a las siguientes figuras y ejemplos, no limitativos.

10 EJEMPLOS

Adyuvantes usados en los experimentos:

Adyuvante A

15 Adyuvante que tiene 50 µg de QS21 presentado en forma de un liposoma, 50 µg de 3D-MPL, 0,25 mg de colesterol y 1,0 mg de DOPC por 0,5 ml de dosis. Una dosis de 50 µl adecuada para inmunizar ratones contiene 5 µg de QS21, 5 µg de 3D-MPL, 0,025 mg de colesterol y 0,1 mg de DOPC.

20 Adyuvante B

Adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua que tiene 0,125 ml de emulsión SB62 (volumen total), 5,35 mg de escualeno, 5,94 mg de DL- α -tocoferol y 2,425 mg de polisorbato 80 por 0,5 ml de dosis.

25 Adyuvante C

Adyuvante que tiene 25 µg de QS21 presentado en forma de un liposoma, 25 µg de 3D-MPL, 0,25 mg de colesterol y 1,0 mg de DOPC.

30 Adyuvante GSK AS04D

Alumbre

Protocolos

35 Respuesta de ELISA anti-ToxA y anti-ToxB: Protocolo para los ejemplos 2 a 4, 7 y 8

Se recubrieron fragmentos de ToxA o ToxB (para los ejemplos 2 y 4 -ToxA (2121-2686) y ToxB (1968-2366) para los ejemplos 3, 5, 6, 7 y 8 -ToxA (2387-2706) y ToxB (1750-2360)) a 2 µg/ml (para ToxA) o 1 µg/ml (para ToxB) en solución 40 salina tamponada con fosfato (PBS) en placas de microtitulación de alta unión (Nunc MAXISORP™), durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS+albúmina sérica bovina (BSA) al 1% durante 30 min a TA con agitación. Sueros de hámster o ratones se diluyeron previamente 1/100 (para muestras posteriores a la dosis I o II) o 1/500 (para muestras posteriores a la dosis III) en PBS-BSA al 0,2%-TWEEN™ al 0,05% y entonces se hicieron diluciones de dos veces adicionales en microplacas y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Tras el lavado, se detectó anticuerpo de hámster o ratón unido usando anticuerpo anti-ratón (ref.: 110-035-003) o anticuerpo anti-hámster (ref.: 107-035-142) conjugado con peroxidasa de Jackson ImmunoLaboratories Inc. diluido 1:5000 en PBS-BSA al 0,2%-tween al 0,05% ("anticuerpo de detección"). Los anticuerpos de detección se incubaron durante 30 min a 45 temperatura ambiente (TA) con agitación. El color se manifestó usando 4 mg de O-fenilendiamina (OPD) + 5 µl de HzOz por 10 ml de tampón citrato 0,1 M pH 4,5 durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl y se leyó la densidad óptica (DO) a 490 nm en relación con 620 nm.

50 El nivel de anticuerpos anti-ToxA o anti-ToxB presentes en cada suero individual se determina mediante la comparación con un suero de referencia (calibrado frente a Jackson Global IgG) añadido a cada placa y expresado en µg/ml. Se calculó un título medio geométrico GMT usando software Excel para las muestras en cada grupo de tratamiento para las inmunizaciones de hámster o ratones.

Ejemplo 1

Diseño de cinco proteínas de fusión ToxA-ToxB de *C. difficile*

60 Se diseñaron proteínas de fusión (también denominadas "fusiones") que contienen fragmentos de los dominios de repetición C-terminales de ToxA y ToxB. Estas proteínas de fusión contenían un fragmento del dominio de repetición C-terminal de ToxA y un fragmento del dominio de repetición C-terminal de ToxB, y una unión entre el extremo C-terminal del fragmento de ToxA y el extremo N-terminal del fragmento de ToxB. Se idearon dos estrategias, en la

primera estrategia; la fusión se diseñó de modo que la estructura de solenoide larga se mantuviera en la unión entre los dos fragmentos. En la segunda estrategia, los dos fragmentos de las fusiones se separan mediante un ligador para permitir su plegado correcto independiente.

- 5 La parte C-terminal de ToxA y ToxB se compone de secuencias repetidas: repeticiones cortas (SR) y repeticiones largas (LR) (PNAS 2005 vol. 102:18373-18378).

Se ha descrito la estructura tridimensional conocida parcial para el dominio C-terminal de ToxA (PNAS 2005 Greco *et al.*, vol. 102:18373-18378; Nature Structural & Molecular biology 2006 vol. 13(5):460-461; códigos PDB: 2F6E, 2G7C y 2QJ6).

10 Los inventores predijeron que hay dos clases de interacciones importantes entre residuos de la parte C-terminal de ToxA y ToxB. La primera interacción se produce entre residuos contenidos en una LR y su SR precedente y es importante mantener la estructura de tipo solenoide. El segundo tipo de interacción se produce entre residuos contenidos en una LR y la SR siguiente y esta interacción media en la función de unión a carbohidrato de la toxina.

15 Se definió una nueva repetición “estructural-funcional” SR-LR-SR. La estructura de esta repetición se mantuvo intacta en las fusiones diseñadas.

- 20 Las posiciones de las repeticiones cortas (SR) y largas (LR) de las repeticiones de ToxA y ToxB se presentan en la tabla 1.

Una lista de las cajas “SR-LR-SR” contenidas en el dominio C-terminal de ToxA y ToxB se presenta en la tabla 2 a continuación.

25

| Nombre | Posición inicial | Posición final |
|--------|------------------|----------------|
| ToxA_1 | 1874 | 1944 |
| ToxA_2 | 2008 | 2078 |
| ToxA_3 | 2142 | 2212 |
| ToxA_4 | 2254 | 2326 |
| ToxA_5 | 2390 | 2460 |
| ToxA_6 | 2503 | 2573 |
| ToxA_7 | 2595 | 2664 |
| ToxB_1 | 1877 | 1946 |
| ToxB_2 | 2008 | 2078 |
| ToxB_3 | 2140 | 2212 |
| ToxB_4 | 2274 | 2343 |

Finalmente, el número de SR entre dos LR se mantuvo en las fusiones diseñadas para conservar la estructura de tipo solenoide larga.

- 30 Antes del diseño de uniones para las fusiones, se definieron dos hipótesis de trabajo: primera hipótesis, cuanto más cortas sean las fusiones, mejor será la probabilidad de que las fusiones se sobreexpresen de manera estable; segunda hipótesis, según el concepto de cajas “SR-LR-SR”, la posición inicial tiene que elegirse con el fin de garantizar un plegado correcto de la primera SR de esta caja SR-LR-SR definida previamente. Por tanto, las fusiones empiezan en el comienzo de la SR que precede a la caja SR-LR-SR. Usando estas dos hipótesis, se analizaron tres posiciones iniciales: residuo 2370, 2234 y 2121 de ToxA.

35 La posición inicial 2370 se excluyó. La posición inicial 2234 también se excluyó porque uno de los residuos implicados en interacciones importantes para la estabilidad estructural de la proteína no está conservado. Así, se decidió que todas las fusiones diseñadas empezarían en el residuo 2121 de ToxA.

40

Todas las fusiones terminarán en el último residuo de ToxB.

Se diseñaron cuatro fusiones (F1-4) con el fin de mantener toda la fusión en una estructura de tipo solenoide larga entre los dos fragmentos de fusión.

45

Las fusiones 1 (F1) y 2 (F2) se diseñaron usando la misma hipótesis. Todas las secuencias de proteína de SR de ToxA y ToxB se habían comparado usando un software de alineación múltiple (ClustalW – Thompson JD *et al.* (1994)

- Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680). Las secuencias más similares fueron la tercera SR VIII de ToxA y la tercera SR II de ToxB y la tercera SR III de ToxB. Con el fin de elegir entre estas dos SR de ToxB, se realizó un modelado de homología estructural (usando la interfaz SwissModel – Arnold K *et al.* (2006) Bioinformatics, 22, 195-201) en la parte C-terminal de ToxB usando la estructura tridimensional conocida del dominio C-terminal de ToxA parcial (código PDB: 2QJ6). Usando la tercera SR VIII de ToxA, la mejor superposición estructural local (realizada usando SwissPDBViewer – Guex N *et al.* (1997), Electrophoresis 18, 2714-2723) se obtuvo con la tercera SR II de ToxB. Así, se diseñaron dos uniones: la primera está entre la tercera SR VIII de ToxA y la cuarta SR II de ToxB (F1) y la segunda está entre la segunda SR VIII de ToxA y la tercera SR II de ToxB (F2).
- Para diseñar la fusión 3 (F3), se realizó una superposición estructural global entre tanto la estructura conocida del dominio C-terminal parcial de ToxA y la estructura predicha del dominio C-terminal de ToxB (usando los softwares SwissModel y SwissPDBViewer). La mejor superposición se encontró entre LR VII de ToxA y LR II de ToxB. Así, se decidió hacer una unión en esta LR similar. La unión se realizó en primer lugar en una región en la que la secuencia está conservada entre ToxA y ToxB, después de esto con el fin de conservar en la parte ToxA de la fusión, los residuos en interacción con la SR precedente y en último lugar, con el fin de conservar en la parte ToxB, los residuos en interacción con la SR siguiente.
- Para el diseño de la fusión 4 (F4), el dominio C-terminal de ToxB se dividió en 4 fragmentos y se realizó en los mismos un modelado de homología más preciso (SwissModel). La división se realizó con el fin de mantener intactas las cajas “SR-LR-SR” (cada dominio termina en el extremo de la SR que sigue a una LR). Se hizo una superposición estructural entre las estructuras predichas de estos fragmentos y la estructura tridimensional conocida de ToxA y se obtuvo la mejor superposición estructural para la tercera SR de ToxB (SR I) y la última SR de ToxA (tercera SR VIII). Así, la unión se realizó entre la segunda SR VIII de ToxA y la tercera SR I de ToxB.
- La última fusión (F5) se diseñó con el fin de permitir un plegado correcto independiente de los dos fragmentos de la fusión. Se añadió un ligador entre el último residuo de la secuencia de proteína de ToxA y el comienzo de la cuarta SR II de ToxB (siempre teniendo en cuenta la importancia de una caja “SR-LR-SR” intacta). Solo se añadió un residuo exógeno (glicina) como ligador y se ubicó entre dos glicinas existentes. Por tanto, el ligador también puede describirse como que se compone de 3 glicinas rodeadas por una cadena beta conocida (para ToxA) y predicha (para ToxB).

Ejemplo 2

- Inmunización de hámsteres con proteína de fusión F2: adyuvante A, adyuvante A sin QS21 o adyuvante A sin MPL y comparación con adyuvante B, alumbré o formulaciones no adyuvadas.**
- Se inmunizaron IM grupos de 16 hámsteres (mezcla de machos y hembras) los días 0, 14 y 28 con 1 µg de la proteína de fusión F2 adyuvada con 50 µl de adyuvante A, adyuvante A sin MPL, adyuvante A sin QS21, adyuvante B, alumbré o no adyuvada.
- Se determinaron los títulos de ELISA anti-ToxA y anti-ToxB en sueros individuales recogidos el día 41/42 (Post III). Los resultados se describen en las tablas 3 y 4 y las figuras 1 y 2.

Tabla 3: ELISA anti-ToxA: concentraciones (µg/ml) en sueros individuales del día 42

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | F2 1 µg/dosis | F2 1 µg/dosis |
| ADYUVANTE | A | A-QS21 | A – MPL | B | Al(OH)3 | no adyuvado |
| 1 | 1472 | 29 | 935 | 457 | 577 | 3 |
| 2 | 1828 | 39 | 414 | 197 | 329 | 23 |
| 3 | 4928 | 35 | 747 | 375 | 401 | 64 |
| 4 | 2966 | 28 | 550 | 60 | 769 | 25 |
| 5 | 2025 | 19 | 388 | 408 | 652 | 3 |
| 6 | 1116 | 155 | 1498 | 173 | 449 | 37 |
| 7 | 2579 | 43 | 879 | 732 | 360 | 179 |
| 8 | 2463 | 33 | 780 | 196 | 1342 | 31 |
| 9 | 1425 | 52 | 1183 | 681 | 817 | 7 |
| 10 | 1984 | 307 | 696 | 190 | 534 | 199 |

ES 2 939 307 T3

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | F2 1 μg/dosis | F2 1 μg/dosis |
| 11 | 1093 | 198 | 572 | 344 | 2665 | 106 |
| 12 | 2080 | 126 | 972 | 508 | 1944 | 22 |
| 13 | 3541 | 403 | 1823 | 193 | 1603 | 221 |
| 14 | 1635 | 152 | 813 | 1142 | 2209 | 680 |
| 15 | 4688 | 630 | 1046 | 494 | 855 | 359 |
| 16 | 3360 | 21 | 1119 | 163 | 664 | 100 |
| Media geom. | 2213 | 77 | 830 | 312 | 815 | 49 |
| IC- | 1717 | 40 | 655 | 202 | 563 | 14 |
| IC+ | 2802 | 124 | 1032 | 454 | 1129 | 104 |
| | | | | | | |
| Desv. Est. Mín. | 496 | 37 | 174 | 111 | 251 | 36 |
| Desv. Est. Máx. | 589 | 47 | 202 | 141 | 314 | 55 |

IC=intervalo de confianza

Desv. Est.=desviación estándar

Tabla 4: ELISA anti-ToxB: concentraciones (μg/ml) en sueros individuales el día 42

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | F2 1μg/dosis |
| ADYUVANTE | A | A-QS21 | A – MPL | B | Al(OH)3 | no adyuvado |
| 1 | 811 | 33 | 817 | 65 | 63 | 5 |
| 2 | 1186 | 88 | 1144 | 107 | 177 | 5 |
| 3 | 4388 | 90 | 943 | 207 | 216 | 92 |
| 4 | 1158 | 66 | 1224 | 464 | 239 | 26 |
| 5 | 1992 | 53 | 1088 | 212 | 91 | 5 |
| 6 | 1518 | 305 | 1070 | 193 | 138 | 44 |
| 7 | 5437 | 54 | 1021 | 244 | 44 | 57 |
| 8 | 1493 | 74 | 899 | 266 | 313 | 28 |
| 9 | 1488 | 281 | 1506 | 189 | 135 | 30 |
| 10 | 2637 | 346 | 1588 | 214 | 318 | 256 |
| 11 | 1568 | 215 | 1125 | 251 | 863 | 95 |
| 12 | 1879 | 50 | 1890 | 549 | 534 | 93 |
| 13 | 1920 | 237 | 1724 | 147 | 355 | 57 |
| 14 | 1709 | 266 | 2450 | 606 | 543 | 57 |
| 15 | 1553 | 492 | 2033 | 301 | 251 | 178 |
| 16 | 1556 | 95 | 744 | 167 | 115 | 88 |
| Media geom. | 1789 | 125 | 1254 | 225 | 207 | 41 |
| CI- | 1387 | 76 | 1039 | 162 | 128 | 16 |
| CI+ | 2264 | 186 | 1498 | 301 | 308 | 76 |
| | | | | | | |
| Desv. Est. Mín. | 402 | 49 | 215 | 63 | 79 | 25 |

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | F2 1µg/dosis |
| Desv. Est. MÁX. | 475 | 61 | 244 | 75 | 101 | 34 |

Figuras 1 y 2**Resultados para la figura 1:**

- 5 La F2 se inyectó con el adyuvante A completo, una formulación similar sin QS21, o sin MPL.
Para la respuesta anti-ToxA, tanto MPL como QS21 tienen un valor añadido aunque QS21 parece ser el más eficaz.
10 Para la respuesta anti-ToxB, el efecto de MPL es menos claro, mientras que la eliminación de QS21 tiene un efecto drástico sobre los títulos de IgG.

Resultados para la figura 2:

- 15 Con respecto a la comparación de adyuvante, el adyuvante A indujo anticuerpos anti-ToxA y anti-ToxB superiores significativos en comparación con alumbre, adyuvante B o formulaciones no adyuvadas. El adyuvante B indujo anticuerpos anti-ToxA y anti-ToxB superiores en comparación con las formulaciones no adyuvadas.

Ejemplo 3

- 20 **Pims 20110544 – Inmunización de hámsteres macho con un rango de dosis de proteína de fusión F2 formulada en adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C.**
Se inmunizaron IM grupos de 10 hámsteres macho los días 0, 14 y 28 con 0,3 µg, 1 µg o 3 µg de la proteína de fusión F2 adyuvada con dosis de 50 µl de adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C.
Se midieron los títulos ELISA anti-ToxA y anti-ToxB ELISA de sueros individuales recogidos el día 13 (Post I), día 27 (Post II), día 42 (Post III 14) y día 84 (Post III 56)

- 30 **Pirns 20110545 – Inmunización de hámsteres hembra con un rango de dosis de proteína de fusión F2 formulada en adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C.**
Se inmunizaron IM grupos de 10 hámsteres hembra los días 0, 14 y 28 con 0,3 µg, 1 µg o 3 µg de la proteína de fusión F2 adyuvada con adyuvante B, AS04D, adyuvante A o adyuvante C. Se midieron los títulos ELISA anti-ToxA y anti-ToxB de sueros individuales recogidos el día 13 (post I), día 27 (Post II), día 42 (Post III 14) y día 84 (Post III 56)

Figuras 3 a 7**Pims 20110544 y 20110545**

- 40 **Tabla 5:** Títulos ELISA anti-ToxA Post I (media geométrica de los títulos o GMT)

| Grupo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------|------|------|--------|------|------|--------|------|------|--------|--------|--------|--------|
| Ag/ animal | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg |
| Ady. | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04 D | AS04 D | AS04 D |
| 544 | 28 | 17 | 6 | 84 | 17 | 6 | 44 | 27 | 3 | 68 | 74 | 33 |
| 545 | 50 | 36 | 12 | 109 | 111 | 26 | 85 | 20 | 16 | 194 | 107 | 36 |

Tabla 6: Títulos ELISA anti-ToxB Post I (GMT)

| Grupo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------|------|------|--------|------|------|--------|------|------|--------|--------|--------|--------|
| Ag/ animal | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg | 3 µg | 1 µg | 0,3 µg |
| Ady. | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04 D | AS04 D | AS04 D |
| 544 | 115 | 82 | 52 | 412 | 121 | 79 | 189 | 119 | 34 | 7 | 5 | 5 |

ES 2 939 307 T3

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|---|
| 545 (hembra) | 178 | 257 | 150 | 391 | 383 | 224 | 196 | 164 | 69 | 27 | 10 | 3 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|---|

Tabla 7: Títulos ELISA anti-ToxA Post II (GMT)

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---------|---------|-----------|------|------|-----------|---------|---------|-----------|-------|-------|--------|
| Ag/animal | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg |
| Adyuvante | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04D | AS04D | AS04D |
| 544 | 475 | 416 | 191 | 974 | 530 | 277 | 312 | 332 | 138 | 487 | 597 | 401 |
| 545 | 762 | 834 | 428 | 1466 | 1424 | 688 | 818 | 423 | 650 | 803 | 844 | 849 |

Tabla 8: Títulos ELISA anti-ToxB Post II (GMT)

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------|---------|------|-----------|------|------|-----------|---------|---------|-----------|-------|-------|--------|
| Ag/animal | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg |
| Adyuvante | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04D | AS04D | AS04D |
| 544 (macho) | 319 | 686 | 488 | 1181 | 1120 | 1049 | 435 | 401 | 340 | 64 | 56 | 28 |
| 545 (hembra) | 974 | 1555 | 1419 | 1552 | 1871 | 2386 | 585 | 649 | 1486 | 215 | 109 | 91 |

Tabla 9: Títulos ELISA anti-ToxA del día 42 Post III (GMT)

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---------|---------|-----------|------|------|-----------|---------|---------|-----------|-------|-------|--------|
| Ag/animal | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg |
| Adyuvante | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04D | AS04D | AS04D |
| 544 | 449 | 674 | 471 | 1462 | 720 | 688 | 247 | 486 | 266 | 662 | 599 | 566 |
| 545 | 642 | 814 | 667 | 1654 | 1020 | 1560 | 800 | 539 | 888 | 923 | 1005 | 794 |

Tabla 10: Títulos ELISA anti-ToxB del día 42 Post III (GMT)

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---------|---------|-----------|------|------|-----------|---------|---------|-----------|-------|-------|--------|
| Ag/animal | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg |
| Adyuvante | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04D | AS04D | AS04D |
| 544 | 630 | 612 | 594 | 1259 | 1116 | 1172 | 335 | 426 | 512 | 67 | 86 | 51 |
| 545 | 568 | 831 | 550 | 1213 | 828 | 1273 | 556 | 695 | 944 | 182 | 145 | 134 |

Tabla 11: Títulos ELISA anti-ToxA del día 84 Post III (GMT)

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|------|------|--------|------|------|--------|------|------|--------|-------|-------|--------|
| Ag/animal | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg |
| Adyuvante | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04D | AS04D | AS04D |
| 544 | 213 | 239 | 169 | 357 | 356 | 307 | 106 | 70 | 154 | 182 | 257 | 266 |
| 545 | 311 | 309 | 401 | 595 | 578 | 717 | 311 | 251 | 417 | 353 | 414 | 337 |

Tabla 12: Títulos ELISA anti-ToxB del día 84 Post III (GMT)

| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---------|---------|-----------|------|------|-----------|---------|---------|-----------|-------|-------|--------|
| Ag/animal | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg | 3 μg | 1 μg | 0,3 μg |
| Adyuvante | C | C | C | A | A | A | B | B | B | AS04D | AS04D | AS04D |

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| 544(macho) | 291 | 195 | 145 | 299 | 360 | 440 | 78 | 70 | 315 | 24 | 25 | 15 |
| 545 (hembra) | 250 | 299 | 328 | 318 | 374 | 435 | 134 | 211 | 392 | 60 | 41 | 41 |

Ejemplo 4**Pirns 20120011 y 20120008 – Inmunización de hámsteres con proteína de fusión F2 formulada en alumbre, adyuvante A o no adyuvada.**

5

10

Se inmunicaron IM grupos de 8 hámsteres hembra y 8 macho los días 0, 14 y 28 con 1 µg de la proteína de fusión F2, fusión F2 etiquetada con His o una mezcla de C-terToxA (2387-2706) (0,6 µg)+C-terToxB (1750-2360) (0,4 µg) formulada en alumbre, adyuvante A o no adyuvada.

15

Se determinaron los títulos ELISA anti-ToxA y anti-ToxB en sueros individuales recogidos el día 13, día 27 y día 42 (Post III). **Figura 8**

Tabla 13

| 20120008 y 20120011: Inmunización de hámsteres hembra y macho. Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o adyuvante A ELISA anti-ToxA: concentraciones (µg/ml) en sueros Post III individuales | | | | | | |
|--|--|--------------|--|--------------|---------------------------------------|----------------|
| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | Mezcla de ToxA (0,6 µg)+ToxB (0,4 µg) | F2 (1 µg) | Mezcla de ToxA (0,6 µg)+ToxB (0,4 µg) | F2 (1 µg) | F2 etiquetada con His (1 µg) | F2 (1 µg) |
| | Al(OH)3 | Al(OH)3 | Ady. A | Ady. A | Ady. A | no adyuvado |
| 1 | 62 | 1156 | 41 | 3075 | 4006 | 195 |
| 2 | 77 | 871 | 105 | 1385 | 2463 | 127 |
| 3 | 104 | 833 | 239 | 3119 | 1202 | 31 |
| 4 | 66 | 506 | 143 | 3806 | 3903 | 574 |
| 5 | 179 | 736 | 340 | 3180 | 6852 | 116 |
| 6 | 641 | 1239 | 48 | Muerto | 5571 | 32 |
| 7 | 128 | 328 | 345 | 5327 | 3174 | 10 |
| 8 | 48 | 3998 | 63 | 3542 | 4990 | 47 |
| 9 | 59 | 681 | 296 | 888 | 6769 | 13 |
| 10 | 352 | 491 | 164 | 978 | 1192 | 2 |
| 11 | Muerto | 604 | 363 | 2913 | 1791 | 3 |
| 12 | 47 | 1524 | 87 | 1231 | 4362 | 68 |
| 13 | 88 | 486 | 77 | 3473 | 1647 | 123 |
| 14 | 23 | 1185 | 62 | 1341 | 4929 | 35 |
| 15 | 254 | 602 | 644 | 2794 | 3085 | 136 |
| 16 | 206 | 1094 | 24 | 2975 | 3354 | 90 |
| Media geom. | 101 | 823 | 144 | 2310 | 3234 | 42 |
| IC- | 65 | 612 | 78 | 1727 | 2398 | 20 |
| IC+ | 172 | 1148 | 213 | 3196 | 4381 | 99 |
| | | | | | | |

Tabla 14

| 20120008 y 20120011: Inmunización de hámsteres hembra y macho. Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o adyuvante A ELISA anti- | | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|--|
|---|--|--|--|--|--|--|

| <u>ToxB: concentraciones (μg/ml) en sueros Post III individuales</u> | | | | | | |
|---|---|----------------|---|----------------|-----------------------------------|----------------|
| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | Mezcla de ToxA (0,6 μ g)+ToxB (0,4 μ g) | F2 (1 μ g) | Mezcla de ToxA (0,6 μ g)+ToxB (0,4 μ g) | F2 (1 μ g) | F2 etiquetada con His (1 μ g) | F2 (1 μ g) |
| | Al(OH)3 | Al(OH)3 | ADYUVANTE A | ADYUVANTE A | ADYUVANTE A | no adyuvado |
| 1 | 58 | 591 | 2510 | 2364 | 2647 | 304 |
| 2 | 172 | 302 | 4981 | 952 | 1021 | 302 |
| 3 | 14 | 167 | 1409 | 2630 | 804 | 125 |
| 4 | 53 | 186 | 4158 | 2261 | 1090 | 299 |
| 5 | 107 | 408 | 3046 | 2553 | 2682 | 296 |
| 6 | 925 | 373 | 1190 | Muerto | 3808 | 193 |
| 7 | 40 | 65 | 1673 | 2938 | 2820 | 170 |
| 8 | 112 | 1112 | 1809 | 1404 | 3186 | 51 |
| 9 | 160 | 652 | 2701 | 1385 | 2837 | 128 |
| 10 | 24 | 75 | 1210 | 2252 | 1676 | 38 |
| 11 | Muerto | 242 | 546 | 1749 | 2174 | 12 |
| 12 | 61 | 1081 | 5746 | 1623 | 2557 | 74 |
| 13 | 15 | 193 | 1975 | 1507 | 2020 | 130 |
| 14 | 56 | 344 | 3499 | 1018 | 4735 | 14 |
| 15 | 15 | 237 | 2897 | 2554 | 2673 | 80 |
| | 332 | 309 | 2489 | 2894 | 2148 | 127 |
| Media geom. | 61 | 297 | 2228 | 1834 | 2210 | 100 |
| IC- | 35 | 194 | 1626 | 1542 | 1708 | 59 |
| IC+ | 132 | 457 | 3094 | 2319 | 2850 | 176 |
| Media geom.=Media geométrica de los títulos | | | | | | |

Resultados:

- Se indujeron anticuerpos anti-ToxA y anti-ToxB tras la inmunización con la proteína de fusión F2 pero también con la mezcla de ToxA y ToxB. El adyuvante A induce títulos ELISA significativamente mayores en comparación con otras formulaciones.

Ejemplo 5

- 10 **Inmunización de ratones con Tox A o fragmentos de Tox B y fusiones ToxA-ToxB**

Figuras 9 a 12

Se inmunicaron ratones Balb/C con los constructos descritos en el ejemplo 1.

- 15 Se inmunicaron 15 grupos de ratones Balb/c hembra los días 0, 14 y 28 con 3 μ g o 10 μ g de los fragmentos separados de ToxA y ToxB (ToxA C-term (2387-2706) (0,6pg)+C-terToxB (1750-2360) así como con proteínas de fusión ToxA-ToxB adyuvadas con adyuvante B. Un grupo control de 10 ratones se vacunó con adyuvante B solo.

- 20 Se determinaron los títulos ELISA anti-ToxA y anti-ToxB en sueros individuales recogidos el día 42 (post III).

Se determinaron los títulos de inhibición de hemaglutinación en sueros Post III agrupados.

Respuesta ELISA anti-ToxA y anti-ToxB: Protocolo

Se recubrieron muestras de los fragmentos de ToxA o ToxB a 1 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en placas de microtitulación de alta unión (Nunc MAXISORP™), durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS-BSA al 1% durante 30 min a TA con agitación. Los antisueros de ratón se diluyeron previamente 1/500 en PBS-BSA al 0,2%-TWEEN™ al 0,05%, y entonces se hicieron diluciones de dos veces adicionales en microplacas y se incubaron a TA durante 30 min con agitación. Tras el lavado, se detectó anticuerpo murino unido usando IgG anti-ratón de cabra affiniPure conjugada con peroxidasa de Jackson ImmunoLaboratories Inc. (H+L) (ref.: 115-035-003) diluida 1:5000 en PBS-BSA al 0,2%-tween al 0,05%. Los anticuerpos de detección se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (TA) con agitación. El color se manifestó usando 4 mg de O-fenilendiamina (OPD) + 5 µl de HzOz por 10 ml de tampón citrato 0,1 M pH 4,5 durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl y la densidad óptica (DO) se leyó a 490 nm en relación con 620 nm.

El nivel de anticuerpos anti-ToxA o anti-ToxB presentes en los sueros se expresó en títulos de punto medio. Se calculó una GMT para las 15 muestras en cada grupo de tratamiento (10 para el grupo control).

15 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación: Protocolo

Se realizaron diluciones de dos veces en serie de antisueros agrupados de ratones (25 µl) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en microplacas de 96 pocillos de fondo en U.

Entonces se añadieron 25 µl de toxina A nativa (0,2 µg/pocillo) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Tras la incubación, se añadieron 50 µl de eritrocitos de conejo purificados diluidos al 2% a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 horas.

Las placas se analizaron visualmente, presentándose la hemaglutinación como células rojas difusas en el pocillo y observándose la inhibición de la hemaglutinación como un punto rojo sedimentado en el pocillo.

30 Los títulos de inhibición se definieron como la inversa de la mayor dilución del suero que inhibe la hemaglutinación.

Ensayo de citotoxicidad

Se cultivaron células de fibroblasto IMR90 a 37°C con un 5% de CO₂, en medio esencial mínimo de Eagle EMEM + un 10% de suero bovino fetal + un 1% de glutamina + un 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina-anfotericina) y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de 5.10⁴ células/pocillo. Tras 24 h, los medios celulares se retiraron de los pocillos.

Se realizaron diluciones de dos veces en serie de antisueros agrupados de ratones (50 µl) en medios celulares.

40 Entonces se añaden 50 µl de toxina B nativa (0,5 ng/ml) y las placas se incuban a 37°C con un 5% de CO₂ durante 24 horas.

Se observaron las células tras 24 horas y se determinó la proporción de células redondeadas.

45 Los títulos de inhibición se definieron como la inversa de la mayor dilución del suero que inhibe el 50% de redondeado de células.

Resultados:

50 Se indujeron anticuerpos anti-Tox A tras la inmunización con el fragmento de ToxA solo, pero también con cada una de las 5 fusiones.

55 Las propiedades funcionales de estos anticuerpos se sometieron a prueba en el ensayo de hemaglutinación. Este ensayo está solo adaptado para la evaluación de ToxA, ya que no se observa hemaglutinación con ToxB.

Se observó inhibición de la hemaglutinación con los sueros de fragmento anti-Tox A o sueros dirigidos frente a cada una de las fusiones ToxA-ToxB.

60 También se realizó un ELISA usando anticuerpos ToxB. Se indujeron anticuerpos anti-Tox B tras la inmunización con el fragmento ToxB solo, pero también con las fusiones F2, F3 y F4.

Los títulos de inhibición obtenidos usando sueros de ratones inmunizados con el fragmento ToxB o las fusiones ToxA-ToxB eran mayores que los obtenidos usando sueros control.

Ejemplo 6**Inmunización de ratones con fusiones Tox A-Tox B**

- 5 Se inmunicaron ratones Balb/c con los cuatro constructos de proteína de fusión F54 Gly (SEQ ID NO:11), F54 New (SEQ ID NO:13), F5 ToxB (SEQ ID NO:15) y F52 New (SEQ ID NO:17), tal como se describe en el ejemplo 5.
- 10 Se llevó a cabo un ELISA usando la respuesta ELISA anti-ToxA y anti-ToxB ELISA: protocolo descrito en el ejemplo 5 excepto que, en este caso, las muestras de los fragmentos toxA o toxB se recubrieron a 2 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato en placas de microtitulación de alta unión. Se realizó un ensayo de inhibición de la hemaglutinación tal como se describe en el ejemplo 5. Se realizó un ensayo de citotoxicidad de toxB tal como se describe en el ejemplo 5. Se realizó un ensayo de citotoxicidad de toxA adicional tal como se describe a continuación.
- 15 Se inmunicaron 1M grupos de 25 ratones hembra los días 0, 14 y 28 con 3 µg de las proteínas de fusión ToxA-ToxB formuladas en adyuvante B o 10 µg de una mezcla no adyuvada de ToxA (6 µg)-ToxB (4 µg). Además de F2, los otros cuatro constructos de proteína de fusión son F54 Gly (SEQ ID NO:21), F54 New (SEQ ID NO:23), F5 ToxB (SEQ ID NO:25) y F52 New (SEQ ID NO:27)
- 20 Se determinaron los títulos ELISA anti-ToxA y anti-ToxB en sueros individuales recogidos el día 42 (Post III 14). **Figuras 13 y 14**

Tabla 15

| 20110350: Inmunización de ratones con proteínas de fusión de <i>C. difficile</i> formuladas en adyuvante B ELISA a-ToxA: concentraciones (µg/ml) en sueros Post III | | | | | | |
|--|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | F2 | Fusión A (F52new) | Fusión B (F54Gly) | Fusión C (F54new) | Fusión D (F5 ToxB) | Mezcla de ToxA + ToxB |
| | 3 µg Ag/animal | 3 µg Ag/animal | 3 µg Ag/animal | 3 µg Ag/animal | 3 µg Ag/animal | 10 µg (6 µg A + 4 µg B) Ag/animal |
| | ADYUVANTE B | ADYUVANTE B | ADYUVANTE B | ADYUVANTE B | ADYUVANTE B | no adyuvado |
| | IM | IM | IM | IM | IM | IM |
| 1 | 518 | 681 | 735 | 436 | 586 | 328 |
| 2 | 761 | 1058 | 975 | 455 | 1252 | 22 |
| 3 | 557 | 718 | 977 | 684 | 1108 | 327 |
| 4 | 1415 | 992 | 862 | 577 | 555 | 152 |
| 5 | 782 | 457 | 1202 | 861 | 622 | 135 |
| 6 | 563 | 724 | 611 | 575 | 569 | 54 |
| 7 | 615 | 585 | 1330 | 824 | 807 | 147 |
| 8 | 994 | 878 | 611 | 576 | 1108 | 169 |
| 9 | 412 | 623 | Muerto | 389 | 887 | 124 |
| 10 | 495 | 993 | Muerto | 809 | 1146 | 219 |
| 11 | 366 | 1039 | 923 | 872 | 965 | 12 |
| 12 | 1075 | 1089 | 1454 | 748 | 950 | 122 |
| 13 | 882 | 754 | 1176 | 809 | 725 | 196 |
| 14 | 1028 | 1550 | 1164 | 1578 | 696 | 312 |
| 15 | 738 | 1268 | 1170 | 1352 | 678 | 188 |
| 16 | 519 | 721 | 1028 | 781 | 930 | 224 |
| 17 | 927 | 890 | 805 | 346 | 791 | 209 |
| 18 | 946 | 992 | 647 | 1255 | 410 | 32 |

ES 2 939 307 T3

| | | | | | | |
|-------------|------|--------|------|--------|--------|-----|
| 19 | 715 | 1346 | 1142 | 670 | 634 | 92 |
| 20 | 546 | Muerto | 1061 | Muerto | Muerto | 166 |
| 21 | 1107 | 1604 | 826 | 1038 | 791 | 112 |
| 22 | 1351 | 1289 | 1223 | 708 | 778 | 66 |
| 23 | 889 | 1319 | 61 | 567 | 759 | 102 |
| 24 | 976 | 824 | 597 | 414 | 456 | 281 |
| 25 | 1153 | 1212 | 995 | 868 | 758 | 242 |
| Media geom. | 764 | 937 | 841 | 704 | 761 | 126 |
| | | | | | | |
| IC- | 656 | 818 | 641 | 597 | 674 | 89 |
| IC+ | 889 | 1074 | 1103 | 830 | 858 | 179 |

Tabla 16

| 20110350: Inmunización de ratones con proteínas de fusión de <i>C. difficile</i> formuladas en adyuvante B ELISA a-ToxB: concentraciones (μg/ml) en sueros Post III | | | | | | |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--|
| Grupos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | F2 | Fusión A (F52new) | Fusión B (F54Gly) | Fusión C (F54new) | Fusión D (F5 ToxB) | Mezcla de ToxA + ToxB |
| | 3 μ g Ag/animal | 10 μ g (6 μ g A + 4 μ g B) Ag/animal |
| | ADYUVANTE B |
| 1 | 916 | 749 | 736 | 454 | 581 | 1823 |
| 2 | 1090 | 551 | 491 | 517 | 872 | 575 |
| 3 | 687 | 1178 | 574 | 549 | 529 | 1386 |
| 4 | 940 | 868 | 501 | 536 | 828 | 854 |
| 5 | 837 | 522 | 653 | 420 | 866 | 1170 |
| 6 | 836 | 609 | 397 | 757 | 690 | 2132 |
| 7 | 309 | 702 | 405 | 792 | 732 | 1466 |
| 8 | 569 | 381 | 598 | 737 | 856 | 1539 |
| 9 | 382 | 450 | Muerto | 914 | 632 | 1461 |
| 10 | 552 | 693 | Muerto | 465 | 639 | 2267 |
| 11 | 679 | 832 | 1273 | 520 | 505 | 1037 |
| 12 | 1123 | 575 | 809 | 551 | 431 | 2273 |
| 13 | 764 | 659 | 532 | 1077 | 930 | 1405 |
| 14 | 944 | 970 | 909 | 1065 | 870 | 1978 |
| 15 | 812 | 628 | 222 | 727 | 1052 | 1414 |
| 16 | 502 | 552 | 736 | 560 | 1001 | 1269 |
| 17 | 983 | 639 | 551 | 431 | 728 | 1732 |
| 18 | 1133 | 628 | 604 | 561 | 1085 | 1211 |
| 19 | 938 | 1058 | 805 | 470 | 435 | 2017 |
| 20 | 519 | Muerto | 857 | Muerto | Muerto | 2140 |
| 21 | 887 | 1025 | 319 | 670 | 310 | 2342 |
| 22 | 861 | 769 | 596 | 555 | 1025 | 2897 |
| 23 | 903 | 1161 | 552 | 694 | 260 | 2343 |
| 24 | 1327 | 536 | 431 | 737 | 313 | 3074 |

| | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 25 | 674 | 518 | 680 | 472 | 663 | 2697 |
| Media geom. | 765 | 688 | 581 | 611 | 653 | 1661 |
| IC- | 663 | 607 | 495 | 545 | 550 | 1411 |
| IC+ | 884 | 781 | 682 | 686 | 776 | 1957 |

Figuras 15 a 17

Se realizó un ensayo de inhibición de la hemaglutinación tal como se describe en el ejemplo 5.

5

Se realizó un ensayo de citotoxicidad de toxB tal como se describe en el ejemplo 5. Se realizó un ensayo de citotoxicidad de toxA adicional tal como se describe a continuación.

Ensayo de citotoxicidad de ToxA

10

Se cultivaron células HT29 a 37°C con un 5% de CO₂ en DMEM + un 10% de suero bovino fetal + un 1% de glutamina + un 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina-anfotericina) y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de 5.10⁴ células/pocillo. Tras 24 h, los medios celulares se retiraron de los pocillos. Se realizaron diluciones de dos veces en serie de antisueros agrupados de ratones (50 µl) en medios celulares.

15

Entonces se añadieron 50 µl de toxina A nativa (0,15 ng/ml) y se incubaron las placas a 37°C con un 5% de CO₂ durante 48 horas. Se observaron las células tras 48 horas y se determinó la proporción de células redondeadas. Los resultados de los ensayos ELISA anti-ToxA, Elisa anti-ToxB, de inhibición de la hemaglutinación y de citotoxicidad se describen en las figuras 13 a 17 mencionadas anteriormente.

20

Ejemplo 7**Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter o proteínas de fusión de *C. difficile* en una formulación no adyuvada**

25

Se inmunicaron IM grupos de 15 ratones hembra los días 0, 14 28 y 120 con 1 o 3 µg de ToxA C-ter, ToxB C-ter o proteínas de fusión ToxA-ToxB. Todos estos antígenos se inyectaron en una formulación no adyuvada. Un grupo control (10 ratones) se inyectó con el NaCl solo.

30

Se midieron los títulos ELISA anti-ToxA y anti-ToxB de sueros individuales recogidos el día 28 (Post II), día 42 (Post III 14), día 120 (prerefuerzo 87) y día 134 (Post IV 14). **Figuras 18 y 19.**

ES 2 939 307 T3

Tabla 17

| 20100723: Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter y proteínas de fusión no adyuvadas de <i>C. difficile</i> ELISA a-ToxA: | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| concentraciones de GMT ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sangrado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | Fusión F1 | Fusión F2 | Fusión F3 | Fusión F4 | Fusión F5 | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | Fusión F1 | Fusión F2 | Fusión F3 | Fusión F4 | Fusión F5 | |
| Ag/ml | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | $3 \mu\text{g}$ Ag/ml |
| Adyuvante | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | No ady. | NaCl |
| | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM |
| Post II | 178 | 3 | 16 | 60 | 74 | 44 | 269 | 84 | 3 | 10 | 49 | 26 | 25 | 60 | 3 |
| Post III | 222 | 2 | 40 | 94 | 192 | 109 | 366 | 137 | 1,25 | 51 | 110 | 88 | 67 | 137 | 1,25 |
| Prerefuerzo | 128 | 4 | 28 | 70 | 120 | 58 | 172 | 165 | 4 | 48 | 62 | 63 | 44 | 107 | 3 |
| Post IV | 539 | 5 | 90 | 174 | 249 | 177 | 353 | 466 | 3 | 168 | 147 | 163 | 139 | 188 | 3 |

Tabla 18

| 20100723: Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter y proteínas de fusión no adyuvadas <i>C. difficile</i> ELISA a-ToxB: | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|------|
| concentraciones de GMT ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sangrado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | Fusión F1 | Fusión F2 | Fusión F3 | Fusión F4 | Fusión F5 | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | Fusión F1 | Fusión F2 | Fusión F3 | Fusión F4 | Fusión F5 | | |
| Ag/ml | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | $3 \mu\text{g}$ Ag/ml | |
| Adyuvante | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | Non adj. | NaCl |
| | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | |
| Post II | 2 | 62 | 2 | 110 | 58 | 283 | 18 | 2 | 7 | 2 | 101 | 29 | 125 | 8 | 2 | |
| Post III | 3 | 316 | 7 | 200 | 199 | 455 | 65 | 4 | 105 | 13 | 242 | 126 | 257 | 44 | 2 | |
| Prerefuerzo | 3 | 125 | 5 | 81 | 58 | 157 | 18 | 4 | 38 | 8 | 68 | 42 | 101 | 14 | 3 | |
| Post IV | 5 | 856 | 27 | 258 | 227 | 380 | 125 | 6 | 632 | 79 | 232 | 175 | 293 | 126 | 4 | |

VB65340 D1

Ejemplo 8

Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter o proteínas de fusión de *C. difficile* formuladas en adyuvante B.

5

Figuras 20 y 21

Se inmuniaron IM grupos de 15 ratones hembra los días 0, 14 y 28 con 1 o 3 µg de ToxA C-term (aminoácidos 2387-2706) y ToxB C-term (aminoácidos 1750-2360) o proteínas de fusión ToxA-ToxB. Estas proteínas se inyectaron en 10 una formulación de adyuvante B.

Se inyectó un grupo control (10 ratones) con el adyuvante B solo.

Se determinaron los títulos ELISA anti-ToxA y anti-ToxB en sueros individuales recogidos el día 28 (Post II), día 42 15 (Post III 14), día 120 (prerefuerzo III 87) y día 134 (Post IV 14).

ES 2 939 307 T3

Tabla 19

| Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter y proteínas de fusión de <i>C. difficile</i> formuladas en adyuvante B ELISA a-ToxA: concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) en sueros Post II, III, prerefuerzo, Post IV | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|----|----|--|
| Sangrado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | | | |
| | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 n | / | | | |
| Ag/ml | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | / | | | |
| ADYUVANTE | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | |
| | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | |
| Post II | 213 | 2,3 | 465 | 332 | 312 | 158 | 672 | 534 | 1,7 | 620 | 498 | 578 | 248 | 925 | 21 | | | |
| Post III | 852 | 3 | 1144 | 859 | 695 | 644 | 1137 | 1376 | 4 | 1356 | 768 | 950 | 470 | 1537 | 2 | | | |
| Prerefuerzo | 738 | 4 | 762 | 484 | 417 | 394 | 674 | 1091 | 3 | 725 | 513 | 598 | 324 | 1197 | 3 | | | |
| Post IV | 2764 | 9 | 1450 | 1423 | 1036 | 986 | 1626 | 301 | 26 | 990 | 1000 | 1999 | 732 | 1465 | 1 | | | |

Tabla 20

| 20100798: Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter y proteínas de fusión de <i>C. difficile</i> formuladas en adyuvante B ELISA a-ToxB: concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) en sueros Post II, III, prerefuerzo, Post IV | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|----|----|--|
| Sangrado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | | | |
| | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | ToxA (aa 2387- 2706) | ToxB (aa 1750- 2360) | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | / | | | |
| Ag/ml | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 10 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | 3 μg | / | | | |
| ADYUVANTE | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | |
| | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | |
| Post II | 2 | 246 | 10 | 424 | 284 | 794 | 25 | 3 | 338 | 17 | 619 | 471 | 753 | 93 | 2 | | | |
| Post III | 2 | 1762 | 285 | 793 | 671 | 1204 | 253 | 4 | 1888 | 232 | 951 | 834 | 1026 | 365 | 2 | | | |
| Prerefuerzo | 3 | 989 | 180 | 512 | 396 | 761 | 129 | 4 | 984 | 108 | 479 | 441 | 581 | 205 | 3 | | | |
| Post IV | 3 | 4212 | 911 | 1422 | 1353 | 1799 | 1046 | 78 | 657 | 738 | 1272 | 747 | 1572 | 812 | 2 | | | |

Ejemplo 9**Clonación, expresión y purificación de las proteínas de fusión****5 Plásmido de expresión y cepa recombinante**

Genes que codifican para las proteínas de fusión de dominios C-terminales parciales de ToxA y ToxB (SEQ ID NO:3, 4, 5, 6 y 7) y una etiqueta His se clonaron en el vector de expresión pET24b(+) (Novagen) usando los sitios de restricción NdeI/XbaI usando procedimientos convencionales. El constructo final se generó mediante la transformación 10 de la cepa de *E. coli* BLR (DE3) con el vector de expresión recombinante según el método convencional con células tratadas con CaCl₂ (Hanahan D. « Plasmid transformation by Simanis. » En Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): págs. 109-135.).

Cepa huésped:

15 BLR(DE3). BLR es un derivado recA de BL21. Las cepas que tienen la designación (DE3) son lisogénicas para un profago λ que contiene una ARN polimerasa T7 inducible mediante IPTG. Se diseñan lisógenos λ DE3 para la expresión de proteína a partir de vectores pET. Esta cepa es también deficiente en las proteasas Lon y *ompT*.

20 Genotipo: cepa BLR::DE3 de *E. coli*, F⁻ *ompT hsdS_B(r_B m_B) gal dcm* (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet^R)

Expresión de las proteínas recombinantes:

25 Se separó un transformante de *E. coli* de la placa de agar y se usó para inocular 200 ml de caldo LBT ± un 1% (p/v) glucosa + kanamicina (50 µg/ml) para obtener una DO 600 nm de entre 0,1 -0,2. Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C, 250 rpm.

Este cultivo durante la noche se diluyó hasta 1:20 en 500 ml de medio LBT que contenía kanamicina (50 µg/ml) y se hizo crecer a 37°C a una velocidad de agitación de 250 rpm hasta que la DO 620 alcanzó 0,5/0,6.

30 A una DO 600 nm de alrededor de 0,6, el cultivo se enfrió antes de inducir la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido 1 mM (IPTG; EMD Chemicals Inc., número de catálogo: 5815) y se incubó durante la noche a 23°C, 250 rpm.

35 Tras la inducción durante la noche (alrededor de 16 horas), se evaluó la DO_{600nm} tras la inducción y se centrifugó el cultivo a 14 000 rpm durante 15 minutos y se congelaron los sedimentos a -20°C por separado.

Purificación:

40 El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM y una mezcla de inhibidor de proteasa (Complete, Roche). Las bacterias se lisaron usando un sistema French Press de 20 000 psi. Los componentes solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimento) se separaron mediante centrifugación, por ejemplo, a 20 000 g durante 30 min a 4°C.

45 La proteína etiquetada con 6-His se purificó en condiciones nativas en IMAC. Los componentes solubles se cargaron en una columna GE (15 ml por ejemplo) (cargada con Ni) preequilibrada con el mismo tampón usado para la resuspensión bacteriana. Tras la carga en la columna, la columna se lavó con el mismo tampón. La elución se realizó usando un tampón bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM y diferentes concentraciones de imidazol (5-600 mM). Tras el análisis del gel, se seleccionaron fracciones más puras, se concentraron y se cargaron en una 50 cromatografía SEC para una etapa de purificación adicional.

Se seleccionaron fracciones que contenían las proteínas de fusión en base a la pureza mediante SDS-PAGE y se dializaron frente a tampón bicina (bicina 20 mM, NaCl 150 mM, con o sin EDTA 5 mM pH8,0). La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína DC de BioRad. Por tanto, las proteínas se agruparon, se filtraron de manera estéril en 0,22 µm, se almacenaron a -80°C.

Alternativamente, la purificación IMAC fue precedida por una etapa de purificación DEAE usando tampón bicina 2 mM (pH 8,0) para la carga y el lavado, y se eluyó usando un gradiente con el mismo tampón, peor con NaCl 1 M añadido.

Ejemplo 10**Clonación, expresión y purificación de los fragmentos de Tox A y Tox B de *C. difficile* separados****Plásmido de expresión y cepa recombinante.**

Genes que codifican para los fragmentos de proteína de ToxA y ToxB (SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9) y una etiqueta His se clonaron en el vector de expresión pET24b(+) (Novagen) usando los sitios de restricción NdeI/XbaI usando procedimientos convencionales. El constructo final se generó mediante la transformación de la cepa de *E. coli* BLR (DE3) con el vector de expresión recombinante según el método convencional con células tratadas con CaCl₂ (Hanahan D. « Plasmid transformation by Simanis. » En Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.).

Cepa huésped:

- BLR(DE3). BLR es un derivado recA de BL21. Las cepas que tienen la designación (DE3) son lisogénicas para un protago λ que contiene una ARN polimerasa T7 inducible mediante IPTG. Se diseñan lisógenos λ DE3 para la expresión de proteína a partir de vectores pET Esta cepa es también deficiente en las proteasas *lon* y *ompT*.
- Genotipo: cepa BLR::DE3 de *E. coli*, F⁻ *ompT hsdS_B(r_B^r m_B^m) gal dcm* (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet^R)

Expresión de las proteínas recombinantes:

Se separó un transformante de *E. coli* de la placa de agar y se usó para inocular 200 ml de caldo LBT ± un 1% (p/v) de glucosa + kanamicina (50 µg/ml) para obtener una DO_{600nm} de entre 0,1 -0,2. Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C, 250 rpm.

- Este cultivo durante la noche se diluyó hasta 1:20 en 500 ml de medio LBT que contenía kanamicina (50 µg/ml) y se hizo crecer a 37°C a una velocidad de agitación de 250 rpm hasta que la DO₆₂₀ alcanzó 0,5/0,6.
- A una DO a 600 nm de alrededor de 0,6, el cultivo se enfrió antes de inducir la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido 1 mM (IPTG; EMD Chemicals Inc., número de catálogo: 5815) y se incubó durante la noche a 23°C, 250 rpm.
- Tras la inducción durante la noche (alrededor de 16 horas), se evaluó la DO a 600 nm tras la inducción y se centrifugó el cultivo a 14 000 rpm durante 15 minutos y se congelaron los sedimentos a -20°C por separado.

Purificación:

- El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM suplementado mediante una mezcla de inhibidor de proteasa (completo sin EDTA, Roche cat. 11873580001) y benzonasa (Roche cat. 1.01695.0001). Se lisaron las bacterias usando un sistema French Press 2 × 20 000 psi. Los componentes solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimento) se separaron mediante centrifugación a 34 000 g o 48 000 g durante 25-30 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se filtró en un filtro de 0,22 µm.
- La proteína etiquetada con 6-His se purificó en condiciones nativas en IMAC. Los componentes solubles se cargaron en una columna GE (por ejemplo, 15 ml) (cargada con Ni) preequilibrada con el mismo tampón usado para la resuspensión bacteriana. Tras la carga, la columna se lavó con el mismo tampón.

Para ToxA:

La elución se realizó usando un tampón bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM y diferentes concentraciones de imidazol (5-100 mM). Tras el análisis del gel, se seleccionaron fracciones más puras, se concentraron y se cargaron en cromatografía SEC (SUPERDEX™ 75) para una etapa de purificación adicional en el mismo tampón sin imidazol.

Para ToxB:

Se realizó un segundo lavado con tampón bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM y desoxicolato al 0,5% o el mismo tampón con NaCl 150 mM. La elución se realizó usando un tampón bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM y diferentes concentraciones de imidazol (10-500 mM). Tras el análisis del gel, se seleccionaron fracciones más puras, se suplementaron con EDTA 5 mM y se cargaron en cromatografía SEC (SUPERDEX™ 200) para una etapa de purificación adicional en el mismo tampón con EDTA 5 mM.

Se seleccionaron las fracciones que contenían fragmentos de ToxA o ToxB en base a la pureza mediante SDS-PAGE y se dializaron frente a tampón bicina (bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), se determinó la concentración de proteína usando el ensayo de proteína RCDC de BioRad. Por tanto, las proteínas se agruparon, se filtraron de manera estéril en 0,22 µm, se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 11**Evaluación del peso molecular de las cinco fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile***

- Se usa ultracentrifugación analítica para determinar la homogeneidad y la distribución de tamaño en disolución de las diferentes especies dentro de una muestra de proteína midiendo la tasa a la que las moléculas se mueven en respuesta a una fuerza centrífuga. Esto se basa en el cálculo de los coeficientes de sedimentación de las diferentes especies que se obtienen mediante un experimento de velocidad de sedimentación, que depende de su masa y forma molecular.
- 5 1. Se centrifugan muestras de proteína en una ultracentrífuga analítica Beckman-Coulter PROTEOMELAB™ XL-1 a 42 000 rpm tras haberse equilibrado el rotor AN-60Ti a 15°C.
- 10 a. Proteína de fusión F1, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
- 15 b. Proteína de fusión F2, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
- 15 c. Proteína de fusión F3, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
- 20 d. Proteína de fusión F4, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
- 20 e. Proteína de fusión F5, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
2. Para la recogida de datos, se registraron 160 barridos a 280 nm cada 5 minutos.
- 25 3. El análisis de datos se realizó usando el programa SEDFIT para la determinación de la distribución C(S). La determinación del volumen específico parcial de las proteínas se realizó con el software SEDNTERP a partir de su secuencia de aminoácidos. SEDNTERP se usó también para determinar la viscosidad y la densidad del tampón.
- 30 4. El peso molecular de las diferentes especies se determinó a partir del gráfico de distribución C(S) (concentración frente a coeficiente de sedimentación), considerando que es una mejor representación de los datos sin procesar que la distribución C(M) (concentración frente peso molecular) para caracterizar la distribución de tamaño de una mezcla. El peso molecular de las principales especies detectadas a partir de la distribución C(S) de las cinco proteínas de fusión ToxA-ToxB corresponde a su forma monomérica. Las razones friccionales de mejor ajuste para las cinco fusiones están todas entre 2 y 2,2. Esto puede indicar que las proteínas están presentes en disolución como forma alargada, lo que sería consistente con la estructura de la proteína.

Ejemplo 12**Evaluación de las estructuras secundarias y terciarias de fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile* mediante dicroísmo circular y espectroscopía de fluorescencia**

- 40 El dicroísmo circular se usa para determinar la composición de estructura secundaria de una proteína midiendo la diferencia en la absorción de luz polarizada izquierda frente a luz polarizada derecha que se debe a una asimetría estructural. La forma y la magnitud de los espectros de CD en la región UV lejana (190-250 nm) son diferentes en función de si una proteína presenta una estructura de lámina beta, hélice alfa o espiral aleatoria. La abundancia relativa de cada tipo de estructura secundaria en una muestra de proteína dada puede calcularse mediante la comparación con espectros de referencia.

45 La estructura terciaria de una muestra de proteína puede evaluarse mediante la evaluación de la inmovilización de los aminoácidos aromáticos. La observación de una señal de CD en la región UV cercana (250-50 nm) puede ser atribuible a la polarización de residuos fenilalanina, tirosina y triptófano y es un buen indicativo de que la proteína está plegada para dar una estructura bien definida.

50 Se usó el siguiente protocolo:

- 55 1. Los espectros de UV lejano se miden usando una ruta óptica de 0,01 cm desde 178 hasta 250 nm, con un ancho de banda y una resolución de 1 nm en un spectropolarímetro Jasco J-720. La temperatura de la célula se mantiene a 23°C mediante un bloque de células RTE-111 termostatizado Peltier. Se mantiene un flujo de nitrógeno de 10 l/min durante las mediciones.
- 60 2. Los espectros de UV cercano se miden usando una ruta óptica de 0,01 cm desde 250 hasta 300 nm, con un ancho de banda y una resolución de 1 nm en un spectropolarímetro Jasco J-720. La temperatura de la célula se mantiene a 23°C mediante un bloque de células RTE-111 termostatizado Peltier. Se mantiene un flujo de nitrógeno de 6 l/min durante las mediciones.

La observación de los espectros de UV lejano (figura 22) para las cinco proteínas de fusión ToxA-ToxB sugiere un bajo contenido de estructuras de hélice alfa y un alto contenido de estructuras de lámina beta. Además, todas las proteínas presentaban un máximo a 230 nm, lo que es inusual para proteínas globulares solubles. Esta particularidad se ha caracterizado ampliamente en la bibliografía y está asociado con un pequeño grupo de proteínas conocidas por su ausencia de hélice alfa y su alto contenido en lámina beta y aminoácidos aromáticos (Zsila, Analytical Biochemistry, 391(2009) 154-156). Estas particularidades son coherentes con la estructura que se espera para las proteínas de fusión ToxA-ToxB. Se compararon estructuras cristalinas de 13 proteínas que presentan los espectros de CD característicos con una señal positiva a 230 nm (Protein Data Bank). El contenido de estructuras secundarias promedio de esas proteínas es del 42% de lámina beta \pm 9% y del 7% de hélice alfa \pm 6%. Esto indica enormemente que la firma espectral de las proteínas de fusión ToxA-ToxB es diagnóstica de una proteína que contiene mucha lámina beta y poco hélice alfa.

La observación de la forma de los espectros UV cercano (figura 23) para las cinco proteínas de fusión indica que al menos algunos de los aminoácidos aromáticos están inmovilizados, lo que es una indicación fuerte de una estructura terciaria compacta y específica. Además, el tratamiento de la proteína con una concentración desnaturizante de urea provocó la desaparición de la señal de UV cercano, lo que es una indicación adicional de que estos espectros característicos se debían al plegado de proteína.

Ejemplo 13

Diseño, clonación, expresión y purificación de 4 proteínas de fusión adicionales

Se diseñaron cuatro proteínas de fusión adicionales usando los principios de diseño descritos en el ejemplo 1, estas se denominaron F54 Gly (SEQ ID NO:11), F54 New (SEQ ID NO:13), F5 ToxB (SEQ ID NO:15) y F52 New (SEQ ID NO:17).

Estas proteínas de fusión se expresaron según el procedimiento descrito en el ejemplo 9.

Ejemplo 14

Evaluación del peso molecular de las fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile* descritas en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17

Se determinó el peso molecular de las fusiones descritas en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17 tal como se describe en el ejemplo 11.

El peso molecular de las especies principales determinadas a partir de la distribución C(S) de las cuatro fusiones de proteína descritas en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17 corresponde a su forma monomérica y todas las proteínas presentan propiedades de sedimentación similares a las fusiones F1 a F5.

Ejemplo 15

Evaluación de las estructuras secundarias y terciarias de fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile* descritas en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17

Las estructuras secundarias y terciarias de las fusiones descritas en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17 se evaluaron según el método descrito en el ejemplo 5. El CD de UV lejano para estas proteínas de fusión pueden encontrarse en la figura 24, y los espectros de UV cercano para estas fusiones puede encontrarse en la figura 25.

El análisis de los espectros de CD de UV cercano y lejano de las proteínas descritas en SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17 muestra que las cuatro tienen la misma estructura de lámina beta alta que las fusiones F1 a F5. Además, la observación de los espectros de UV cercano no mostró ninguna diferencia significativa en la posición de los aminoácidos aromáticos en la estructura terciaria en comparación con las fusiones F1 a F5.

SECUENCIAS**SEQ ID NO:1 - secuencia de toxina A**

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKKLNESIDVFMNKYKTSSRNALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGEVSDIALYEIKQWADI NAEYNIKLWYDSEAFLVNTLKKAIVESSTTEALOLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPVTPTIDDIIKSHLVSEYNRDETLESYRTSLRKINSNHGIDIR ANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMMLPGIHSDFLKTI SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIESKSEKSEIFS KLENLNVSDELEKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLPNAIESD NNFTDTTKIFHDLSLFNSATAENSMFLTKIAPYLVQGFMPEARSTISLSGPAGAYASAYYDF INLQENTIETKLKASDLIEPNLSQLTEQEINLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLEDNGVDFNKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIQLQGDDISYEATCNLF SKNPKN SII IQRMNNEASAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNEKEVKVTFIGHGKDEF NTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGCNMFSYDFNVEETYPGKLLS IMDKITSTLPDVKNNSITIGANQYEVIRINSEGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFFDSDIDNKLAKSKNIPGLASISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNIESSIGDYIYEEKLEPVKNIHNISDDLDEFNLLENVSDELYEKLKLNLDKYLISFEDISKNNSTYSVRFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVGNLNDNIQLDHTSQVNTLNAAFFIQLSNDYSSNKVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTLNTYDSIQLVNLIISNAVNDTINVLPTEGIPIVSTILDGINLGAAKELLDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAGISAGIPLSVNNELILHDKATSVVNVYFNHLSESKYGPLKTEDDKILVPIIDLVISEIDFNNNSIKLGTNCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIPSLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWTGAVPGLRSLENDGTRLLSDIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNKIKLKDTRNFIMPITTNEIRNKLSDYFDGA GGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWI FNIDNEVREISIENGTTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNMDKDYIFTCELDKISIILIEINLVAKSYSLLSGDKNYLISNLSNTIEKINTLGLDSKNIAYNTDESNNKYFGAISKSIIHYKKDSKNILEFYNDSTLEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYLNE SVYSSYLDVFVNSDGHNTNSFMNLFLDNINFWKLFGFENINFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNGRNVVEPIYNPDGEDISTSIDFSYEPLYGIDRYINKVLIAFPDLYTSLININTNYSNEYYPEIIVLNPNTFHKVNIINLDSSSEFYKWSTEGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSFNSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDLSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNLVTGWQTINGKKYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNLNTAEATGWQTDGKYYFNTNTAIASTGTYIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFPNNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGLILQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFSEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKYYFDNNSKAVTGLQTIIDSKKYYFNTNTAEATGWQTDGKYYFNLNTAEATGWQTDGKYYFNLNTAEATGWQTDGKYYFNTNTFIASTGTYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFILYHDNIIYFGNNSKAATGWVFTIDGRYYFEPNTAMGANGYKTIIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV DGVKAPGIYG

SEQ ID NO:2 - secuencia de toxina B

MSLVNRKQLEKMANVRVRTQEDYEVAILDALEYHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI

DTYKKSGRNKALKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFWWIGGQINDTAINYINQWKDVNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLNDPRFDYNKFRKRMEIFYDKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELENNTYIEESLNKITQNSGNDVRNFEFKNGESFNLYEQUELVERNLAAASDLRISALKEIGGYLDVDMPLGIQPDLFESİEKPSVTDFWEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFMDLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIFSSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIIHQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISEDNDFNTTNTFIDSIMAEEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQDLLMFKEGSMSNIHLTEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKRNYFEGSLGEDDNLDFSQNIVVDFKEYLEKISSLARSERYGIVQLOQGDKISYEAACNLFAKTPYDSDLFQKNIEDSEIAYYNPQDGIEIQEIDKYSKIPSIISDRPKIKLTFIGHKDEFNTDIFAGFDVDLSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLKVKDKitSELMPSiSQDSIIVSANQYEVIRINSEGRRELLHSGEWINKESIIKDISSKEYISFNPKENKITVSKSNLPELSTLLQEIIRNNNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEERIEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIESISDALCDLKQNELEDSHFISFEDISETDEGFSIRFINKETGESIIVETEKTIFSEYANHITEEISKIKGTIFTDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLNAAFIQSLSLEYNSKESLNSLVSAMVKVQVAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETIDLPLTSEGPIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPILLQEIIEAKIGIMAVNLTTATTAIITSSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPLSVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSIVETEGVFTLLDDKIMMPQDDLVISEIDFNNSNIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHLSIYDVLEVQKEELDLSKIDLMVLPNAPNRVFAWETGWTPLGRSLENDGTKLDRIRDNYEGEFYWRWFYAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRS FIVPIITTEYIREKLSYSFYGSGGTYALSLSQYQNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTEESDKIKKGDLIEGILSTLSIEENKIIILNSHEINFSGEVGNSNGFVSLTFISILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNSNHIQKIDYIGFNSNLSQKNIPYSFVSEGLKENGFINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMDDSKPSFGYSSNLLKDVKVNITLGNVNLKDDIKISLTLQDEKTIKLNSVHLDESQVAEILKFMNRKGNTNTSDLSMFSLEMNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQFECIDENDNIQPYFIKFNTLETNTLYVGNRQNMIVEPNYDLDSDGDISSTVINFQKYLYGIDSCVNKVVISPNIYTDENITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRYVWSNDGNDLFILMSTSEENKVSQVKIRFVNFKDKTLANKLSFNFSDKQDVPVSEIILSFTPSYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYIINFQGMVSGLIYINDSLYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVILQTCGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAWEVKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSDNKHVFDDGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNGEEEISYSGILNFNNKIIYFDDSFATAVVCGWDLEGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDQYYFNDDGIMQVGFVFTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQOAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYEFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:3 - secuencia de fusión 1

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFNPNNAAIAIHLCITINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESKMTVGFKGPNFSEYFAPANTHNNNIEGQAIYVQNKFLTNGKYYFDNDSKAVTGQTIIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYFGNNSKAVTGQTINGKVVYFMPDTAMAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGFVSINDNKHVFDDGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIIYFDDSFATAVVCGWDLEGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQOAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYEFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:4 - secuencia de fusión 2

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGQQTIDGKK
YYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDKFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMANGYKTIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNNSKAUTGWQTINGKVFYFMPDTAMAAAGGLNQIGDYK
YYFNSDGVMQKGFSINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEGFKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIIYYFDDSGFTAVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVG
FVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSLV
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYY
FNENGEMQFGYINYIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEEMYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:5 - secuencia de fusión 3

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGQQTIDGKK
YYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDKFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMANGYKTIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIIYYFDDSGFTAVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQY
YFNDDGIMQVGFTVINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAPANTVNDNI
YGQAVEYSLVRLVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRT
GLISFENNYYFNENGEMQFGYINYIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGW
LDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEMYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:6 - secuencia de fusión 4

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGQQTIDGKK
YYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDKFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMANGYKTIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNNSKAUTGWQTINGKVFYFMPDTAMAAAGGETIIDDKN
YYFNSGVLQTVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHY
FSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFSINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGV
FNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIIYYFDDSGFTAVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGL
SLINDGQYYFNDGIMQVGFTVINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAP
ANTVNDNIYGQAVEYSLVRLVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKACKGINLIDDIKYYF
DEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINYIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEG
ESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEMYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:7 - secuencia de fusión 5

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNNSKAATGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAPGIYGGGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGKYFAHHN
EDLGNEEGEEISYSGLNFNNKIIYYFDDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDG
IMQVGFTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIDDNGIVQIGVFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVE
YSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFE
NNNNYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEK
RYYFTDEYIAATGSVIIDGEYYYFPDTAQLVISE

SEQ ID NO:8 secuencia de fragmento de toxina A individual

MASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSK
AVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGP
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLYLYHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMANGYKTIDN
KNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNNSKAATGWQTINGK
YYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAP

SEQ ID NO:9 - secuencia de fragmento de toxina B individual

MILMSTSEENKVSQVKIRFVNFKDKTLANKLSFNFSQDKQDVPEIILSFTPSYYEDGLIGYDLGLVSLYN
EKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSG
VLQTGVFSTEDGKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGK
AFKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDG
KYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFNNKIIYYFDDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQ
YYFNDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIDDNGIVQIGVFDTSRGYKYFAPANTVNDN
IYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMR
TGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTG
WLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYYYFPDTAQLVISE

SEQ ID NO:10 - secuencia de fragmento de toxina A de fusión 1

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNNSKAATGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAP

SEQ ID NO:11 - secuencia de fragmento de toxina A de fusión 2

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGWTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNSKAUTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAG

SEQ ID NO:12 - secuencia de fragmento de toxina A de fusión 3

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGWTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
Y

SEQ ID NO:13 - secuencia de fragmento de toxina A de fusión 4

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGWTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNSKAUTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAG

SEQ ID NO:14 - secuencia de fragmento de toxina A de fusión 5

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGWTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QRFLYLYHDNIYYFGNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQRFLHLLGKIYYFGNSKAUTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGDGVKAPGIYG

SEQ ID NO:15 - secuencia de fragmento de toxina B de fusión 1

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYS
LNFNNKIIYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYF
SDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGE
TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGY
INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHONTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVI
IDGEEYYFPDPTAQLVISE

SEQ ID NO:16 - secuencia de fragmento de toxina B de fusión 2

GLNQIGDYKYYFNDSGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYF
AHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFFNNKIIYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGSLINDGQYYF
NDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAPANTVNDNIYG
QAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGL
ISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHONTLDENFEGESINYTGWL
LDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFPDPTAQLVISE

SEQ ID NO: 17 - secuencia de fragmento de toxina B de fusión 3

FAHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFFNNKIIYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGSLINDGQYY
FNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAPANTVNDNIY
QAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG
LISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHONTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFPDPTAQLVISE

SEQ ID NO: 18 - secuencia de fragmento de toxina B de fusión 4

GETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAVEW
KELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNDSGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFA
ENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGLNFFNNKIIYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDE
DTAEAYIGSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFD
SDRGKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGIN
LIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQ
NTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFPDPTAQLVISE

SEQ ID NO:19 - secuencia de fragmento de toxina B de fusión 5

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYS
LNFNNKIIYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYF
SDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSRGKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGE
TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGY
INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHONTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVI
IDGEEYYFPDPTAQLVISE

SEQ ID NO :20 - secuencia de nucleótidos de proteína de fusión F54 Gly

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAAATTATTTAAACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCAATTATCAAC
GGCAAACACTTTATTTAACACCGACGGCATTATCGAGATTGGTGTAAAGGTCGAACGGCTTGAAATACCTGCACCGCAAAT
ACCGATGCCAATAATATTGAAAGGCCAGGCATTCTGTATCAGAAATGAATTCTGACCCCTGAACGGCAAAAAACTACTTTGGCAGGGAT
AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTCAACCCGAATAATGCAATTGCAAGCAATTCTGTGCACC
ATTAACAAACGACAATATTTCAGCTATGACGGTATTCTGACGAATGGTACATTACCATCGAACGCAACAACCTTTATTCGATGCC
AACAAACGAAAGCAAATGGTGACCGGTTTCAAAGGCCAATGGTTTGGATATTTCGCTCCGGAAACACCCATAATAACAAACATT
GAAGGTAGGGATCGTTATCAGAACAAATTCTGACGCTGAATGCTAAGAAAATCTACTATTTCGATAATGACAGCAAAGCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAGAAATATTACTTTAATCTGAAATACCGCAGAACGGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAGTAC
TACTTCACCTGAACACAGCGCAGAGCAGCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTCAACACAAACACCTTATTGCA
TCTACCGGTTACACAGCATTACCGTAAACACCTACTTCACACCGATGGTATCATGCAAGATCGCCTTCAAAGGTCCTAAAGGTCCTAAAGG
TTCGAATACCTTGGCCCTGCAATACAGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTCTGACCCCTGAATGGG
AAAAAAATTAATCTTTGGTAGCAGATTCTAAAGCGTTACCGGTCTGCGTACCATGATGGTAAAAAAATACTACTTTAAACGAATACAGCC
GTTGGGTTACAGGCTGGCAGACCATTACCGGAAAAAAATACTATTAAACACAAATACCGCATGGCTCAACGGGTTACCAAC
TCGGGTAACACTCTACTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGAGGTCTTAAAGGACCTGATGGGTCGAATTTGCGCTGCG
AACACTGATGCAACAAATATCGAAGGACAGGCAATCGCTATCAGAACATCGTTCTGTATCTGACGACAACATCTATTATTTGGCAAC
AATTCAAAGCAGGCCACGGCTGGGTTACATTGATGGCAACCGCTACTATTGCAACCGAATACCGCAATGGGTCGAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAATTCTATTTCGCAACGGTCTGCGCAGATGGGTTATTTAAAGGATGCAACGGCTTCGAATACCTGCTCCA
GCGAACATCGGACGCGAACATAATTGAGGGTCAAGCAGATTGTTTACAAACGGTTCTGCACTGCTGGGCAAATCTACTACTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGTAGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTATGCGGATACCGCATGGCAGCAGCGGGTGGT
CTGTTGAAATTGATGGCGTGTATTTTTGGTGTGGATGGTAAAGCACCAGGAAATACGGTGTACCGGCTTGTGACCGTG
GGTGTGATAAAATACTATTCAATCGATTAAACGGTGGTGCAGCGAGCTGGGAAACCATCATGATGACAAAAACTATTATTCAC
CAGAGCGGTGCTGCAACGGGTGTGTTACACCGGAAGATGGCTTAAATTTGCGCAGCGAACACCTGGATGAAACCTGGAA
GGCGAACGGATTGATTACCGGAAACTGATCATCGATGAAACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGGGTGGGAATGGAAA
GAACTGGATGGCGAAATGCAATTCTCGGAAACCGGTTAAAGCGTTAAAGGCGTGAACCGAGATGGGCAATTACAAATACTACTC
AACAGCGATGGCGTGTGAGCAGAAAGGCTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGCTAT
ACCGAAATGATGGAAACATTCTACTTCGCGAAACCGGAAATGCAAGTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGTTCAAAACTTC
GCGCACATAACGAAGATCTGGTAAACGAAGAAGGGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGATCTGCAACTCAACAAACAAATCTACTATT
GATGATAGCTTACCGCGGGTGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAATATTTCGATGAAAGATACCGCGGAAGCGTATT
GGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCAGTACTATTTCGATGATGGCATTATGCGAGGTGGTTCTGACCATTAATGATAAAAGTGT
TATTCAGCGATAGCGGCAATTGAAAGCGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCACATCGATGATAACGGCATTGTCAGATC
GGCGTTTGTGATACAGCGATGGCTACAAATATTGCAACCGGCAATACCGTGAACGATAACATTGCGGCTGGGAATATAGC
GGTCTGGTGTGGCGAAGATGTGTATTATTCGCGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTATGATATGGAAAACGAAAGC
GATAAAATTACTTTAATCGGAAACGAAAAAGCGTCAAGGCAATTACCTGATGATGATATCAAAACTATTGATGAAAGG
ATTATGCGTACCGGTGTGATTAGCTTCAAAACAAACTATTACTTCACGAAAACGGTGAATGCGATTGGCTGGCTACATCAACATCGAA
GATAAAATGTTCTACTTCGCGAAGATGGTGTGATTGAGCTTAAACACCCGGATGGCTCAAATACTTTGCCATCAGAAT
ACCCGGATGAAAATTCAACGGTGAAGCATTAAACTATACCGGCTGGTGGATCTGGATGAAAACGCTACTACTTCACCGATGAATAC
ATTGCGGCCACCGGACGGCAGCGTGTATTGATGGCGAAGAAACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGTGATTAGCGAACATCAT
CATCACCAT

SEQ ID NO :21 - aminoácido de proteína de fusión F54Gly

MATGWQTIDGKYYFNTNTIASTGYTIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQNEFLTLN
GKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYIITERNNFYFDANNESKMTGVF
KGPNGFYFAPANTHNNNIEQQAIVYQNKFLLNGKYYFDNDSKAVTGWQTIIDGKYYFNLNTAEATGWQTIIDGKYY
FNLNTAEATGWQTIIDGKYYFNTNTFIASTGTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILY
QNKFLLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTIASTGTYIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILY
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQQAIRYQNRFLYHDNIIYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEFNTAMGANYKT
IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEQQAIRYQNRFLLHKIYYFGNNSKAATGWQTINGKVVYFMP
DTAMAAAGGLFEIDGVLYFFFGVGDGVKAPGIYGGTGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFS
TEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAWEVKELDGEHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGIL
NFNNKIYYFDDSFATVVGWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSSLINDGYYFNNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESG
VQNIDDNFYIDDNGIVQIGVFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPD
GFKYFAHQNLTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYYYFPDPTAQLVISEHHHHHH

SEQ ID NO:22 - secuencia de nucleótidos de proteína de fusión F54 New

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAATATTATTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCAATTATCAAC
GGCAAACACTTTATTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTAAAGGTCGAACGGCTTGTAATCTGCACCGCAAAT
ACCGATGCCAATAATATTGAAGGGCAGGCATTCTGTATCAGAATGAATTCTGACCCCTGAACGGCAAAAATACTACTTTGGCAGGGAT
AGCAAAGCAGTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTCAACCCGAATAATGCAATTGCAAGCAATTCTGTGACCC
ATTAAACAAACGACAATATTATTCAGCTATGACGGTATTCTGACGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACCTTTATTTCGATGCC
AACAAACGAAAGCAAATGGTGACCGGTTTCAAGGCCAATGGTTTGGAGTATTCGCTCCGGCAAACACCCATAATAAACACATT
GAAGGTAGGGATGTTATCAGAACAAATCCGTGACGCTGAATGCTAACAGAAACTATTTCGATAATGACAGCAAGCCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAGAAATATTACTTAATCTGAAATACCGCAGAACGCAACACGGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAGTAC
TACTTCACCTGAACACAGCGAACGCCCCAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTCAACACCAACACCTTTATTGCA
TCTACCGGTTTACACCGCATTAACGGTAAACATTCTACTCAACACCGATGGTATCATGCAAGATCGCGTAAAGGCTCAAAGTCAAAATGGT
TTCGAATATTGCCCTGCAATACAGTCAAATACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTCTGACCCCTGAATGGG
AAAAAAATATTACTTTGGTAGCAGTCTAAAGCGTTACCGGTCTCGCTTACATTGATGGTAAAGGAAACTACTATTAAACGAATACAGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATAACGGGAAAAAAACTATTAAACACAAATACCGCATGGCTCAACGGGTTTACCAAGGCTCAA
TCGGGAAACACTCTACTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGAGTCTTAAAGGACCTGATGGGTCGAATATTGCGCCTGCG
AACACTGATGCGAACAAATATCGAAGGACAGGAATCCGCTATCAGAATCGCTTCTGTATCTGACGACAACATCTATTATTGGCAAC
AATTCAAAAGCAGGCCACGGCTGGGTTACATTGATGGCAACCGCTACTATTGCAACCGAATACCGCAATGGGTCGAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAATTCTATTTCGCAACGGTCTGCCGAGATCGGGTATTAAAGGATGCAACGGCTCGAATACTTCGCTCA
GCGAATACGGACGCAACAAATTGAGGGTCAAGCAGTCTGTTCTGCACTGCTGGGCAAATCTACTACTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGGATGACTATTGATGGGTCGAACCGGTTGACCGTGGGTGATGATAAAC
CTGTTGAAATTGATGGCGTATCTATTGATGGGTTAAAGCAGTACCGGTTGACCGTGGGTGATGATAAAC
TATTCAATCCGATTAACGGTGTGCAAGCAGCATTGGCAAACCATCATCGATGACAAAAACTATTTCACACAGAGCGGTGTC
CAGACCGGTTGTTAGCAGGAAGATGGCTTAAATATTGCGCAGCGAACACCCCTGGATGAAAACCTGGAAGGGCAAGCGATTGAT
TTTACCGGAAACTGATCATCGATGAAAACATCTATTACTCGATGATAACTATCTGTTGCGGTGGAAATGGAAGAAACTGGATGGCGAA
ATGCATTATTCTCCGAAACCGGTTAAAGCAGTAAAGGCTGAAACGAGATCGCGTACACAAATACTACTTCACACAGCGATGGCGT
ATGCAGAAAGGCTTGTGAGCATCACGATAACAAACACTATTGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGCTATACCGAAATTGATGGC
AAACATTCTACTCGGAAACCGGAAATCGCAGATTGGCTGTTCAATACCGAAGATGGTTCAAATACTTCGCGCACCATACGAA
GATCTGGGTAACGAAGAAGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAAACAAATCTACTACTTTGATGATAGCTTAC
GCGGTGGGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAATATTATTCGATGAAAGATACCGCGGAAGCGTATATTGCGTGA
AACGATGGCAAGTACTATTTAACGATGATGGCATTATGCAAGGGTTCTGTCGACCAATTATGATAAAGTGGTCTATTCA
GGCATTATTGAAAGCGGCTGCAAGAACATTGATGATAACTACTCTACATCGATGATAACCGCATTGTCAGATCGCGTTTGATACC
AGCGATGGCTACAAATATTGCGACCGCCAATACCGTGAACGATAACATTATGCCAGGGTGGAAATAGCGGTCTGGCGTGTG
GGCGAAGATGTTATTATTCGGGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTATGATGATGGAAAAGCGATAAAATTACTTT
AATCCGAAACGAAAAACCGTCAAAGGCAATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CTGATTAGCTCGAAAACAACACTATTACTCAACGAAAACGGTGAATGCGAGTTCGGCTACATCAACATCGAAGATAAAATGTTCTAC
TTCGGCGAAGATGGTGTATGCAAGATTGGTTAAACACCCGGATGGCTCAAATACTTGGCCATCGAATACCGGATGAAAT
TTCAAGGTGAAAGCATTAAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATGAAAACGCTACTACTTCACCGATGAAATACCGGACCCG
AGCGTATTGATGGCGAAGAAACTACTCTCGATCCGGATACCGGCAGCTGGTATTAGCGAACATCATCATCACCAT

SEQ ID NO :23 secuencia de aminoácidos de proteína de fusión F54 New

MATGWQTIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQN
EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRINNNKKYFNPNNNAIAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESK
MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEQQAIVYQNKFLTLNGKKYYFNLNTAAATGQWTIDGKYYFNLNTAAATGQWTI
DGKYYFNLNTAAATGQWTIDGKYYFNTNTFIASTGTYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIE
QAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGRLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWTQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHF
YFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQQAIRYQNRFLYIHDNIIYFGNNNSKAATGWVTTIDGNRYYFEPNTAMG
ANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEQQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNNSKAATGWVTTIDGNRYYFEPNTAMG
VYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFVGVDGVKAVTFVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVF
STEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIODYKIF
NSDGMQKGFSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDEGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
LNFFNNKIYYFDDSTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTEAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIES
GVQNIIDNNYFYIDDNNGIVQIGVFDTSDFGYKYFAPANTVNDNIYQQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENES
DKYYFNPFETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTP
DGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDDLEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEYYYFPDPTAQLVISEHHHHHH

ES 2 939 307 T3

SEQ ID NO :24 secuencia de nucleótidos de proteína de fusión F5 ToxB

ATGGCAACGGTGGCAGACCATCGATGGCAAAATAATTATTTAACACACCGCAATTGCAAGCACCCTGATACCAATTACAC
GGCAACACTTTATTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTAAAGGTCGAACGGCTTGATAACTTTGCACCGCAAAT
ACCGATGCCAATAATTGAGGGCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTCTGACCCCTGAACGGCAAAATAACTACTTTGGCAGCGAT
AGCAAAGCAGTTACCGGGTGGCAGCATCACAAACAATAAGAAATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCGAATTCTGTGACC
ATTAAACAACGACAATAATTATTCAGCTATGACGGTATTCTGAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTATTGCGAT
AACACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTCAAGGCCATTGGTTGAGTATTGCGCCGGCAAACACCCATAATAACACATT
GAAGGTCAGGGATCGTTTCAAGAACAAATTCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTGCGATAATGACAGCAAAGCGTGGACCG
TGGCAGACATTGACGGGAAGAAATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAACAGCAGAACCGGTTGGCAAACGATGACGGTAAAAGTAC
TACTTCAACCTGAACACAGCCAGCAGGACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTGCAACACCAACACCTTATTGCA
TCTACCGTTATACCAGCATTAACCGTAAACATTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCGAGATCGGCTTTCAAGGTCCAAATGGT
TTCGAATACTTTGCCCCGTCGAAATACAGATGCAAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCTGTACCAAAACAAATTCTGACCCGATGGG
AAAAAAATTAATTCTGGTAGCGATTCTAAAGCGTTACCGGTCTCGCTACCATGATGGTAAAATACTACTTTAATACGAAATACAGCC
GTTGCGGTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGGAAAAAAATACTATTAAACACAAATTACAGCATTGCGCTCAACGGGTTATACCAATT
TCTGGGTAACACCTCTACTTTAACCGATGGTATTATGCAAAATCGGAGTCTTAAAGGACCTGATGGGTCGAATATTGCGCCTGCG
AACACTGATGCGAACAAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTCTGTATCTGACGACAACATCTATTATTGCGCAAC
AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGTTACAATTGATGCCAACCGCTACTATTGCAACCGGAATACCGCAATGGGCGAAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAATTCTATTTCGCAACGGCTGCCAGATGGGGTATTAAAGGTAACCGGCTCGAATACTTCGCTCCA
CGCAATACGGACCGAACAAATTGGGGTCAGGCAATTCTGATGACGGGTTCTGCACTGCTGGGAAATCTACTATTGCG
ATAACAGTAACAGTAACTGGTAGGGCAGACAATCAATGGTAAGGTACTATTATTGCGATACGCCATGGCAGCAGCGGTTGGT
CTGTTGAAATTGATGGCGTGTCTATTGCGTGGGGTAAAGCAGTGGCGGCTGATTATATTACGATAGCGCTGTAT
TACTTTAACCCACCGGTGAATAACCTGATTACCGGCTTGACCGTGGGTGATGATAAAATACTATTGCAATCCGATTAACGGTGGTGC
GGGAGCATTGGCGAACCATCTGATGACAAAAACTATTATTCACACAGAGCGGTTGCTGCAAGACCGGTTGTTAGCACCGAAGAT
GGCTTAAATTATTGCGCCACGGAACACCCCTGGATGAAACCTGGAGGGCAAGGGATTGATTACCGGAAACTGATCATCGATGAA
AACATCTATTCTCGATGATAACTATCGTGGTGGGGAAATGGAAACTGGATGGCGAAATGCAATTCTCCGGAAACCGG
AAAGCGTTAAAGGCCGAAACAGATCGGCGATTACAAATACTACTTCAACAGCAGTGGCGTGTGCAAGAAGGGTTGAGCATCAC
GATAACAAACACTATTGCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGCTATACCGAAATTGATGGCAAACATTCTACTTCGCGGAAACCGG
GAAATGCAGATTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGTTCAAAATACTTCGCGCACCATAACGAAGATCTGGTAACGAAGAAGCGGAAAGA
ATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCACACAAATACTACTTGTGATGATAGCTTACCGGGTGGGGCTGGAAAGATCTGGG
GATGGCAGCAAATATTATTCGATGAAAGATACCGCGGAAGCGTATATTGCGCTGAGCTGATTAACGATGGCAGACTATTGCA
GATGGCATTATGCGAGTTGGGTTCTGACCATTAATGATAAAAGTGTCTATTGCGATGAGCGCATTATTGAAAGCGGCTGCAAGA
ATTGATGATAACTACTCTACATCGATGATAACCGCATTGCGAGATCGGCTTTGATACCGCAGTGGCTACAATAATTGCGACCG
GCCAATACCGTGAACGATAACATTATGCCAGCGGTTGGAAATATGCGCTGGTGTGGCGAAGATGTGATTATTGCGGAA
ACCTATACCATCGAACACCGGCTGGATTATGATGATGGAAACGAAAGCGATAAAATACTTAAATCGGAAACCGAAAAGCGTGC
GGCATTAAACCTGATCGATGATAACAAACTATTGATGAAAGGATTATGCTGACCGCTGATTAGCTCGAAGAACAAACAACT
TACTTCAACGAAAACCGTGAATGCGATTCTGCGCTACATCAACATCGAAGATAAAATGTTCTACTTCGCGAAGATGGTGTATGCGAG
GGTGTGTTAACACCCCGGATGGCTTCAAAACTATTGCGGCTACGAGATAACCCCTGGATGAAAGGCTTCAACGATTAACATTAC
GGCTGGCTGGGATGGGATGAAAACGCTACTACTTACCGGATGAAATACATTGCGGCGACCGGCGAGCGTGAATTGATGGCG
TACTTCGATCGGATACCGCGCAGCTGGTGTAGCGAACATCATCATCACCAT

SEQ ID NO :25 secuencia de aminoácidos de proteína de fusión F5 ToxB

MATGWQTDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRINNNKKYYFPNNAAIAIHLCIINNDKYYFSYDGLQNYITIERNNFYFDANNESK
MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWTQIDGKYYFNLTAAATGWQTI
DGKYYFNLTAAATGWQTIIDGKYYFNTFTIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIE
GQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHF
YFNTDGGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFYLHDNIIYFGNNSSKAATGWVTDIDGNRYFEPTNTAMG
ANGYKTIDMNKFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLGGKIIYFGNNSSKAATGWQTINGK
VYYFMPDTAMAAAAGGLFEIDGVYIFFVGVDGVKAVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTGDDKYYFNPINGGAASIGE
TIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAWEVKELDGEHMHYF
SPETGKAFKGQLNQIGDYKYYFNSDGVQMKGFGVSINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIIYFFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQ
VGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDDNFYIIDDNGIVQIGVFDTSDFGKYFAPANTVNDNITYGQAVEYSGLVRVGEDV
YYFGETYTIETGWYIDDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEQFGYINI
EDKMFYFGEDGVQMIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEYYFDPD
TAOLVISFHBBBBBB

SEQ ID NO :26 - secuencia de nucleótidos de proteína de fusión F52 new

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGAAAAAATTATTAACTACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGTATAACCAATTATCAAC
 GGCAAAACACTTTTATTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTAAAGTCCGAACGGCTTGAAACTTTCACCGGAAAT
 ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTCTGACCCGTAAACGGCAAAAATACTACTTTGGCAGCGAT
 AGCAAAAGCAGTTACCGGTTGGCATCATCAACAATAAGAAATTACTCAACCGAATAATGCAATTGCAACGCAATTCTGTGACC
 ATTAAACACAGCAAATATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAAATGGTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTGATGCC
 AACAAACGAAAGCAAATGGTACCGGTGTTCAAAGGCCAATGGTTGAGTATTCGCTCCGGAAACACCCATAATAACAAACATT
 GAAGGTCAAGGCATCGTTATCAGAACAAATTCTGTACGCTGAATGGTAAGAAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAGCGTACCGGC
 TGGCAGACAATTGACGGAAAGAAATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAACGCAACCGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAGTAC
 TACTTCACCTGAACACAGCCGAGCAGCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTCAACACCAACACCTTATTGCA
 TCTACCGGTTTACACAGCATTAACGGTAAACATTCTACTTCACACCGATGGTATCATGCAAGTCGGCTTCAAAGGTCAAATGGT
 TTGCAAAACTTGTGCCCTGCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTCTGACCCGTAAAGGG
 AAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCGTACCGGTCTGCTGACCTTGTGTTAAAGGTTACTACTTTAATACGAATACAGCC
 GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTACGGGAAAAAATACTATTAAACACAAATACCGCATTCGCTCAACGGGTTTACCAATT
 TCGGGTAAACACTTCACTTTAAACCGATGGTATTATGCAAATCGGAGTCTTAAAGGACTGATGGGTTGAAATTGCGCCTGCG
 AACACTGATGCAACAAATATCGAAGGACAGGCAATCGCTATCAGAATCGCTTCTGTATCTGACGACAACATCTATTGCGAAC
 AATTCAAAGCAGCACCGCTGGGTTACATTGATGGCAACCCCTACTATTGCAACCGGAAATCGGCTAAATGGCTACAAA
 ACCATCGATAATAAAATTCTATTTCGCAACGGCTGGCGAGATGGGTTAAAGGTTACTTCGCAACCGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
 GCGAATACGGACGCGAACATATTGAGGGTCAAGCAGTCTGTTATCAAACCGGTTCTGCACTGCTGGGCAAATCTACTATTGCG
 AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGGTTACTATTGCGGATACCGCCATGGCAGCGAGCGGGTGGT
 CTGTTGAAATTGATGGCGTGTATTTTGTGTTGAGTGGTAAAGCAGTGAACGGCTGAAACAGATGGGATTACAAATAC
 TACTTCACAGCGATGGCGTGTGAGCAGGAAAGGCTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTG
 GGCTATACCGAACATTGATGCCAACATTCTACTTCGCGGAAACGGCAGATGGCAGATTGGCGTGTCAATACGAAGATGGTTCAA
 TACTTCGCGCACATAACAGAACATCTGGTAACGAAGAAGGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGCATCTGAACTCAACAAACAAATCTAC
 TACTTTGATGATAGCTTACCGCGTGTGGGCTGAAAGATGTTGAAAGCAGTGAACGGCTGAAACAGATGGGATTACAAATAC
 TATATTGGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTAAACGATGATGGCATTATGCAAGTGGGTTCTGCACTTAAATGATAAA
 GTGTTCTATTTCAGCGATAGCGCATTATTGAAAGCGGCTGCAAGACATTGATGATAACTACTCTACATGATGATAACGCGATTG
 CAGATCGCGTTTGATACCAGCGATGGCTACAAATATTGCAACCGGCAATACCGTGAACGATAACATTATGGCAGGGGTGGAA
 TATAGCGGCTGGTGCCTGGCGAAGATGTTGATATTGCAACCGGCTGGATTATGCAACGAAATATTGCAACCGGCTGGATTATGATGAAAC
 GAAAGCGATAATAATTACTTTAAACCGGAAACGAAAAAAAGCGTCAAGGCAATTACCTGATGATGATAACAAACTATTGATGAA
 AAAGGCAATTGCGTACCGGCTGATTAGCTCGAAAACAACACTATTACTTCACAGAAAACGGTAAATGCAAGTTCGGCTACATCAAC
 ATCGAAGATAAAATGTTCTACTTCGCGGAAAGATGGTGTATGCAAGATTGGTTTTAACACCCGGATGGCTCAAATACTTGCCC
 CAGATAACCCCTGGATGAAATTTCGAAGGTGAAAGCATTAAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATGAAAGCGCTACTACTTCACCG
 GAATACATTGCGCGACCGGCAACGGTGTATTGATGGCGAAGAAACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTATTGCGAACAT
 CATCATCATCACCAT

SEQ ID NO :27 - secuencia de aminoácidos de proteína de fusión F52 New

MATGWQTIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILYQNEFLTLN
 GKKYYFGSDSKAVTGWRIINNNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGLILQNYITIERNNFYFDANNESKMVTGVF
 KGPNGFEYFAPANTHNNNIEQQAIVYQNKFLTLNGKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKYY
 FNLTNAEAAATGWQTIDGKYYFNTNTFIASTGTSINKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQAILY
 QNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIIISGHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEQGQAIRYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLY
 IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEQGQAIRYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLYQNRFLY
 DTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAVKGGLNQIGDYKYYFNSDGVMQGFVSIINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHF
 FAENGEMQIGVFNTEDEDFKYFAHHNEDLGNEEGEISYSIGLNFNNKIYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDETAEAY
 IGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTFINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDDNFYIIDDNGIVQIGVFDTSRGYKYFAPANTVN
 DNIYQQAVEYSLGLRVGEDVYYFGETYTIETGWYIDMDNESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISF
 ENNNYYFNENGENMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYYFTDE
 YIAATGSVIIDGEYYYFPDTAQLVISEHHHHHH

SEQ ID NO:28 - secuencia de fragmento de toxina A de F54 Gly

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGQQTIDG
KKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDKFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVGVKAPGIYG

SEQ ID NO:29 - secuencia de fragmento de toxina A de F54 New

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGQQTIDG
KKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDKFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVGVKAV

SEQ ID NO:30 - secuencia de fragmento de toxina A de F5 ToxB

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGQQTIDG
KKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDKFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVGVKAV

SEQ ID NO:31 - secuencia de fragmento de toxina A de F52 New

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWIINNKYYFPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLLNGKKYYFDNDSKAVTGQQTIDG
KKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDKFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVGVKAV

SEQ ID NO:32 - secuencia de fragmento de toxina B de F54Gly

TGFVTVGDDKYYFNPNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELEDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNNEEGEEISYSGILNFNNKIYYF
DDSFTAVVGVWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIIESGV
QNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDP
DTAQLVISE

SEQ ID NO:33 - secuencia de fragmento de toxina B de F54 New

TGFVTVGDDKYYFNPNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELEDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNNEEGEEISYSGILNFNNKIYYF
DDSFTAVVGVWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIIESGV
QNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINTGWLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDP
DTAQLVISE

SEQ ID NO:34 - secuencia de fragmento de toxina B de F5 ToxB

SGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDG
FKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELEDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYK
YYFNSDGMQKGFVSINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDDSFTAVVGVWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDGIMQVG
FVTINDKVFYFSDSGIIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINTGWLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:35 - secuencia de fragmento de toxina B de F52 New

KGLNQIGDYKYYFNNSDGMQKGFVSINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
FAHHNEDLGNNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDDSFTAVVGVWDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYY
FNDGIMQVGFTINDKVFYFSDSGIIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIY
GQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG
LISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINTGWL
DLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:36 - proteína de fusión C-TAB.G5

MVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAE
AATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGP
GFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTING
KKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGP
DGF
EYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRF
LYLHD
NIYYFGNNSSKAATGWV
TIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
NNIEGQAIRYQNRF
LHLLGKI
IYYFGNNSSKAATGWV
TIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
APGIYGRSMHN
LITGF
VTVGDDKYYFN
PINGGAASIGETI
IDDKNYYFN
QSGVL
QTGV
FSTEDGF
KYFAPAN
TLDENLEGEA
IDFTGKL
IIDENI
YYFDDNYR
GAVEW
KELDG
EMHYFS
PETG
KAF
KGLN
QIGDY
KYYF
NSDGV
MQKG
FVS
INDN
KHY
FDDSG
VMKV
GYTE
IDGKH
FYFA
ENG
EMQIG
VFN
TEDG
FKYFA
HHN
EDLG
NEEG
EEISY
SGIL
NFNN
KI
YYF
DDDS
FTA
VVG
WD
LEDG
SKY
FDE
TA
EAY
IGLS
LIND
GQYY
FND
DGIM
QVG
FVT
IND
KVF
FYF
SDS
GII
IES
GV
QNI
DDNY
FYI
DDNG
IVQ
IGV
FDT
SDG
YKY
FAP
ANT
VND
NIY
GQ
AVE
YSG
LVR
VG
EDV
Y
GET
YTI
ETG
WIY
DMEN
ESD
KYY
FN
PET
KKACK
GIN
LID
DI
KYY
FDE
KG
IMRT
GLIS
FENN
YYF
NENG
EMQF
GY
IN
IED
KMF
YF
GED
GVM
QIG
VFN
TPD
GFK
YFA
H
QNT
LDE
N
FEG
ES
IN
YT
GW
LD
LDE
KRY
YFT
DEY
IA
ATGS
VI
IDG
EE
YYF
DP
DTA
QL
VISE

SEQ ID NO:37 proteína de fusión C-TAB.G5.1

VTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEA
ATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGP
GFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTING
KYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGP
DGF
EYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRF
LYLHD
IYYFGNNSSKAATGWV
TIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
NIEGQAIRYQNRF
LHLLGKI
IYYFGNNSSKAATGWV
TIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
PGIYGRSMHN
LITGF
VTVGDDKYYFN
PINGGAASIGETI
IDDKNYYFN
QSGVL
QTGV
FSTEDGF
KYFAPAN
LDENLEGEA
IDFTGKL
IIDENI
YYFDDNYR
GAVEW
KELDG
EMHYFS
PETG
KAF
KGLN
QIGDY
KYYF
NSDGV
QKG
FVS
INDN
KHY
FDDSG
VMKV
GYTE
IDGKH
FYFA
ENG
EMQIG
VFN
TEDG
FKYFA
HHN
EDLG
NEEG
EEISY
GIL
NFNN
KI
YYF
DDDS
FTA
VVG
WD
LEDG
SKY
FDE
TA
EAY
IGLS
LIND
GQYY
FND
DGIM
QVG
FVT
IND
KVF
YF
SDS
GII
IES
GV
QNI
DDNY
FYI
DDNG
IVQ
IGV
FDT
SDG
YKY
FAP
ANT
VND
NIY
GQ
AVE
YSG
LVR
VG
EDV
Y
GET
YTI
ETG
WIY
DMEN
ESD
KYY
FN
PET
KKACK
GIN
LID
DI
KYY
FDE
KG
IMRT
GLIS
FENN
YYF
NENG
EMQF
GY
IN
IED
KMF
YF
GED
GVM
QIG
VFN
TPD
GFK
YFA
H
QNT
LDE
N
FEG
ES
IN
YT
GW
LD
LDE
KRY
YFT
DEY
IA
ATGS
VI
IDG
EE
YYF
DP
DTA
QL
VISE

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunogénica que comprende:
 - 5 a) un polipéptido que comprende un fragmento de toxina A de *Clostridium difficile* aislado y un fragmento de toxina B de *C. difficile* aislado, comprendiendo el polipéptido un fragmento de dominio de repetición de toxina A y un fragmento de dominio de repetición de toxina B; y
 - 10 b) un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicha emulsión de aceite en agua un aceite metabolizable, un tocol y un emulsionante;estando la composición inmunogénica en un volumen adecuado para una dosis humana, volumen que es de 0,5 ml o mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml, o de entre 1 ml y 1,5 ml.
- 15 2. Composición inmunogénica según la reivindicación 1, comprendiendo la emulsión de aceite en agua 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7 o 5-6 mg de aceite metabolizable, por dosis.
3. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, comprendiendo la emulsión de aceite en agua 0,5-11, 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6 mg de tocol por dosis.
- 20 4. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo la emulsión de aceite en agua 0,1-5, 0,2-5, 0,3-4, 0,4-3 o 2-3 mg de agente emulsionante por dosis.
5. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siendo el aceite metabolizable escualeno.
- 25 6. Composición inmunogénica según una de las reivindicaciones 1 a 5, siendo el tocol alfa-tocoferol.
7. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, siendo el agente emulsionante monooleato de polioxietileno-sorbitano.
- 30 8. Composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior, siendo el polipéptido un polipéptido que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en la que
 - 35 a) el primer fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina A;
 - b) el segundo fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina B;
 - c) el primer fragmento tiene un primer extremo proximal;
 - 40 d) el segundo fragmento tiene un segundo extremo proximal; ysiendo el primer fragmento y el segundo fragmento adyacentes entre sí.
- 45 9. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el polipéptido:
 - (i) SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35; o
 - 50 (ii) una variante que tiene una similitud de al menos el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% con SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35; o
- 55 (iii) un fragmento de al menos 250, 280, 300, 350, 380, 400, 430, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35.
- 60 10. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además antígenos adicionales.
11. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, provocando el

polipéptido una respuesta inmunitaria protectora en un huésped mamífero frente a cepas de *C. difficile*.

- 12. Vacuna que comprende la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 13. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores o vacuna según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad por *C. difficile*.
- 10 14. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores o vacuna según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad por *C. difficile*, administrándose dicha composición inmunogénica o vacuna a un sujeto humano.

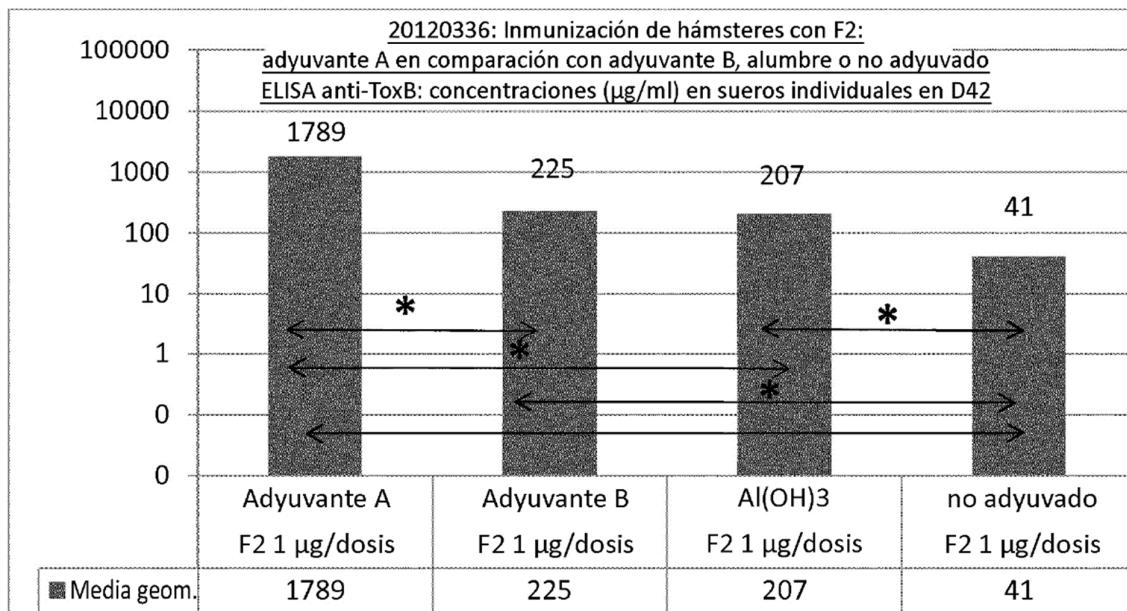
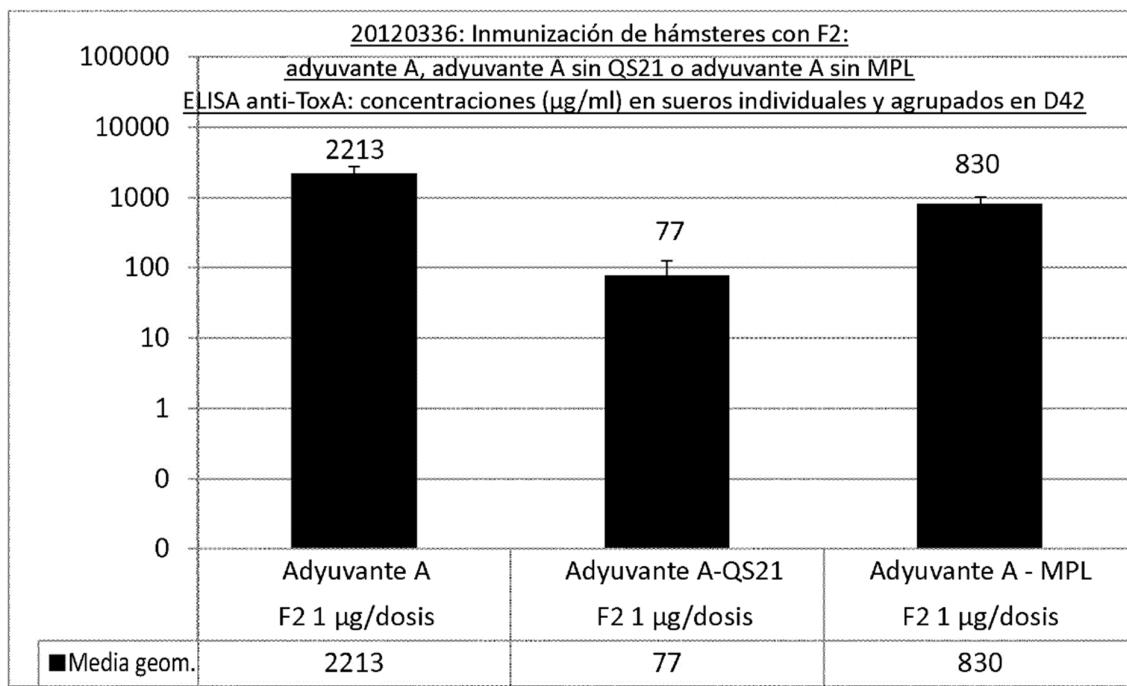
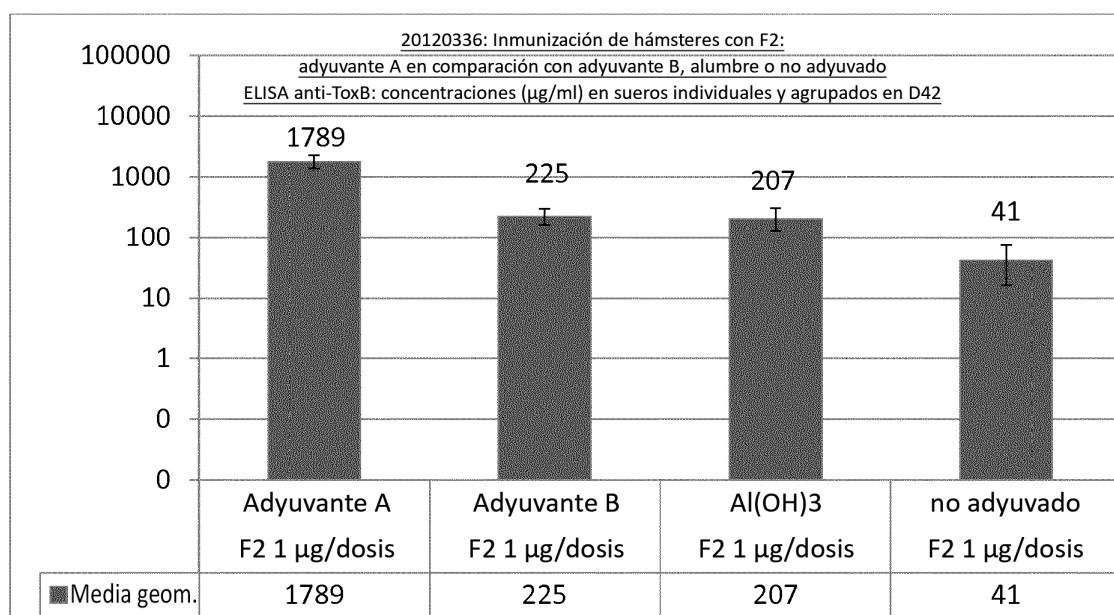
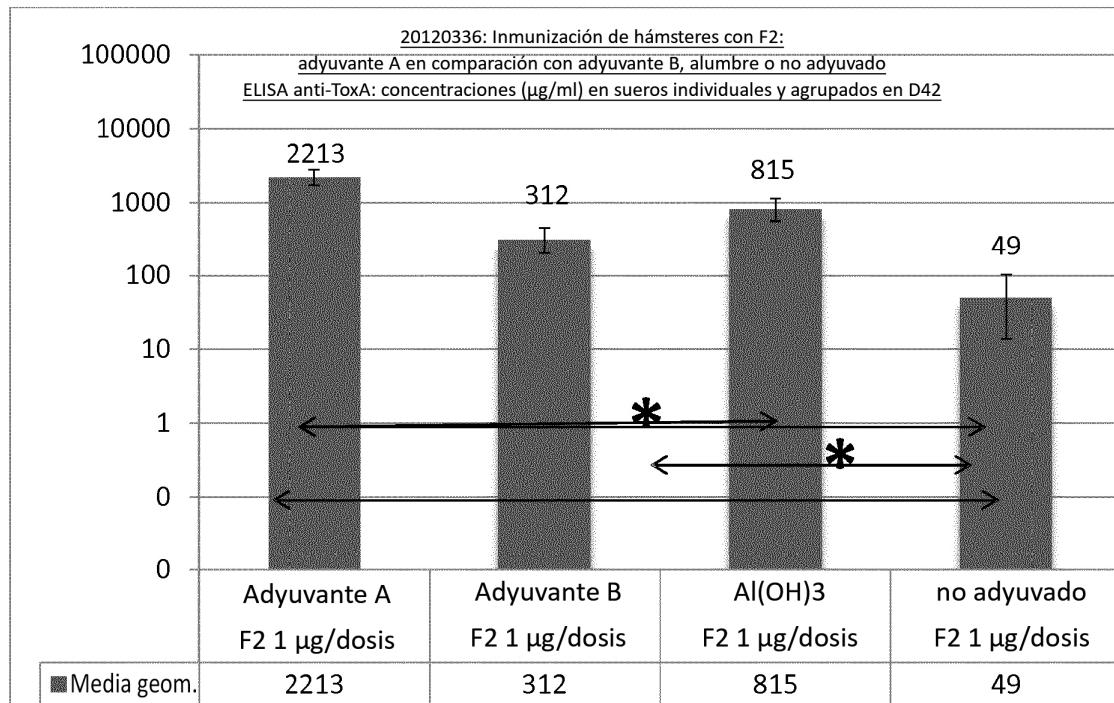
Figura 1

Figura 2

ES 2 939 307 T3

Figura 3

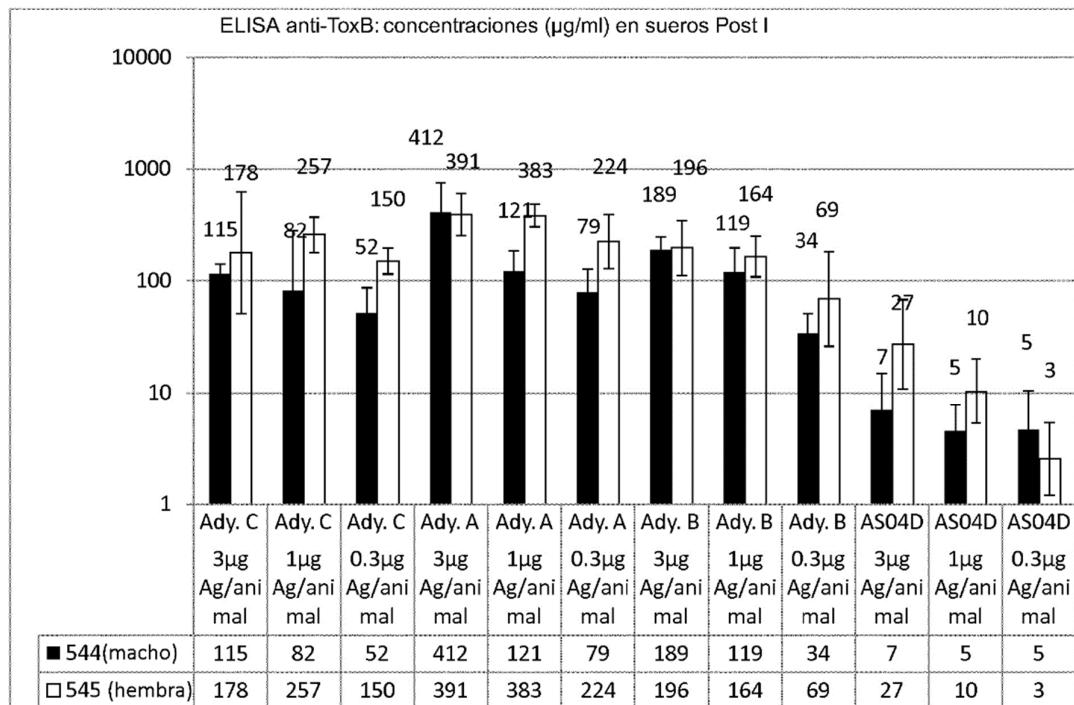
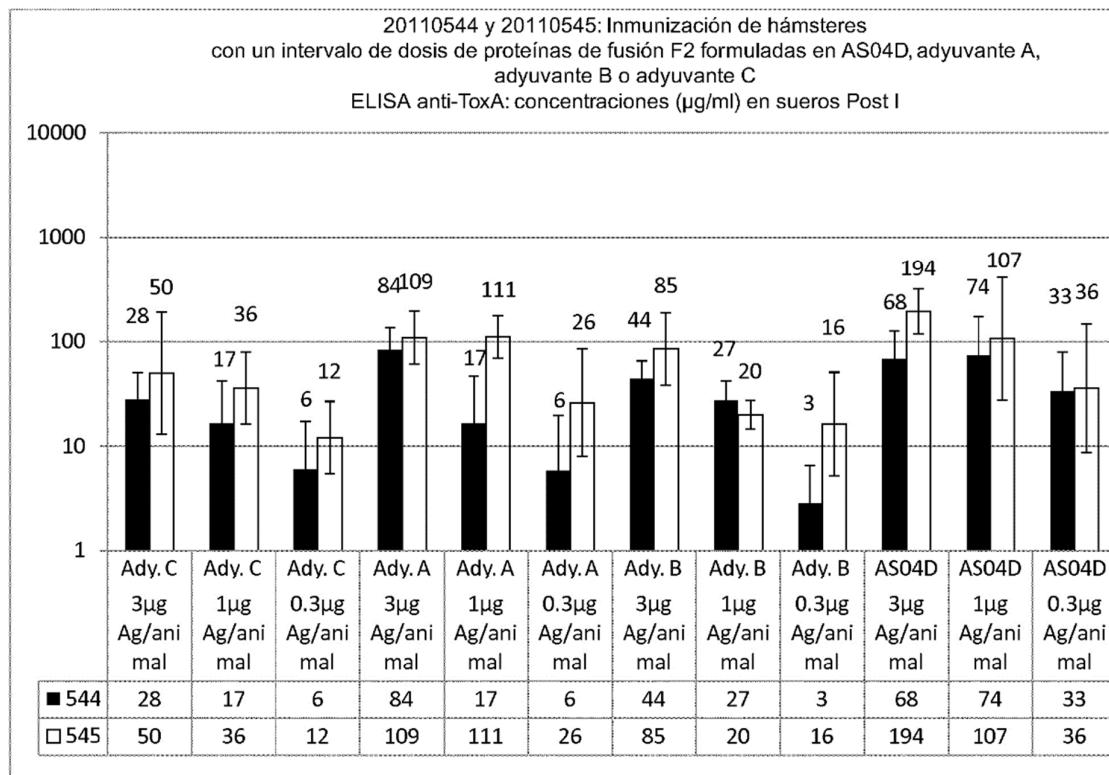
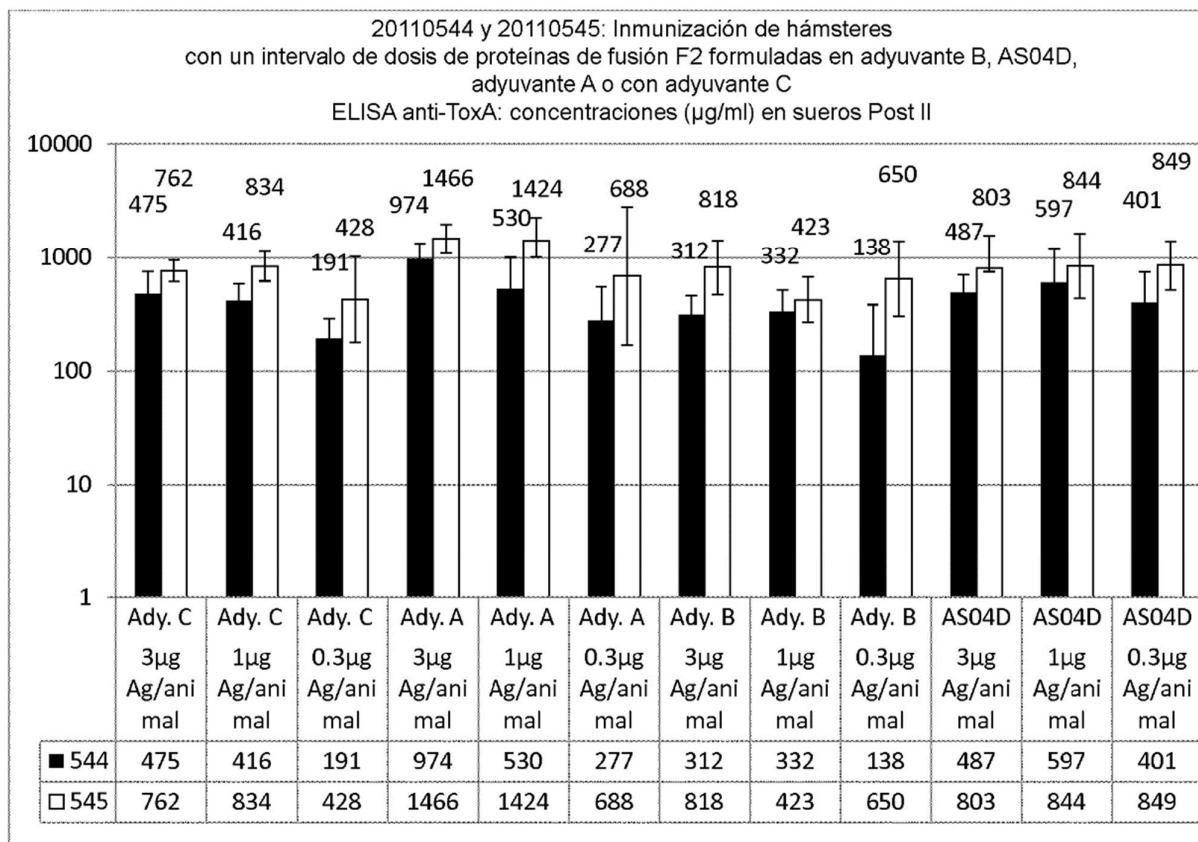
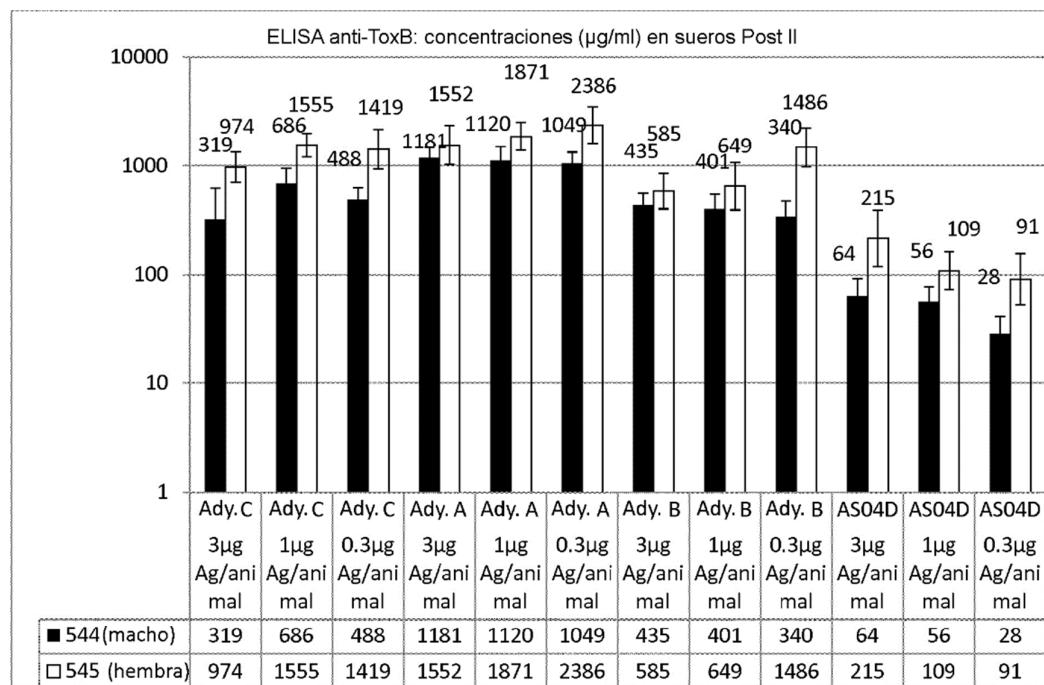
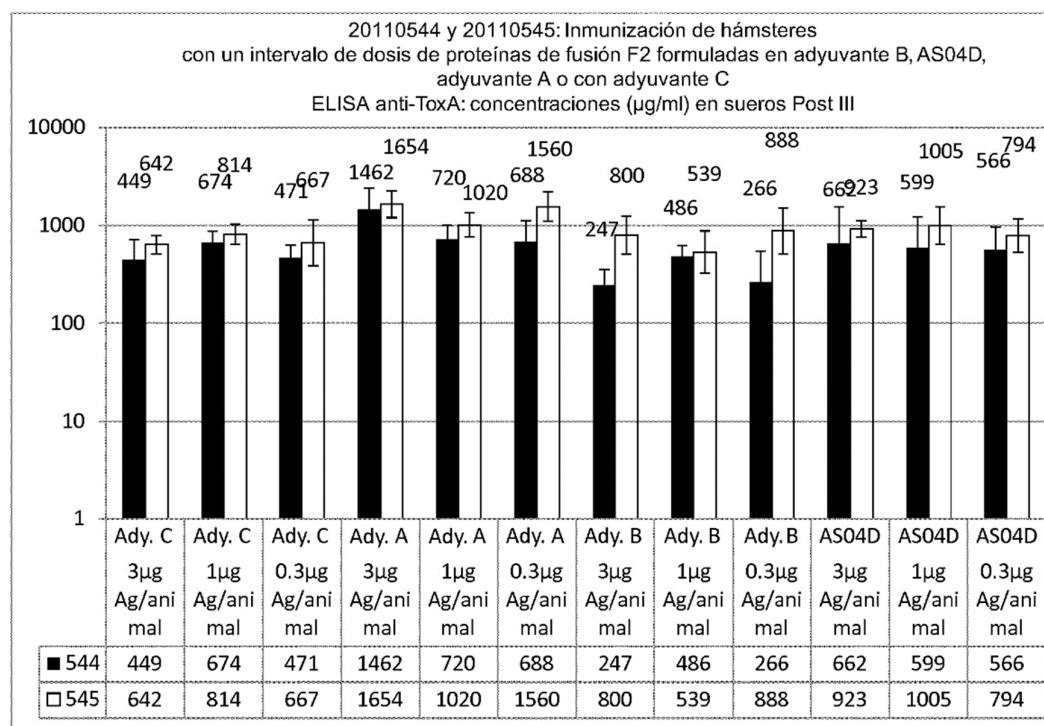


Figura 4

**Figura 5**

ES 2 939 307 T3

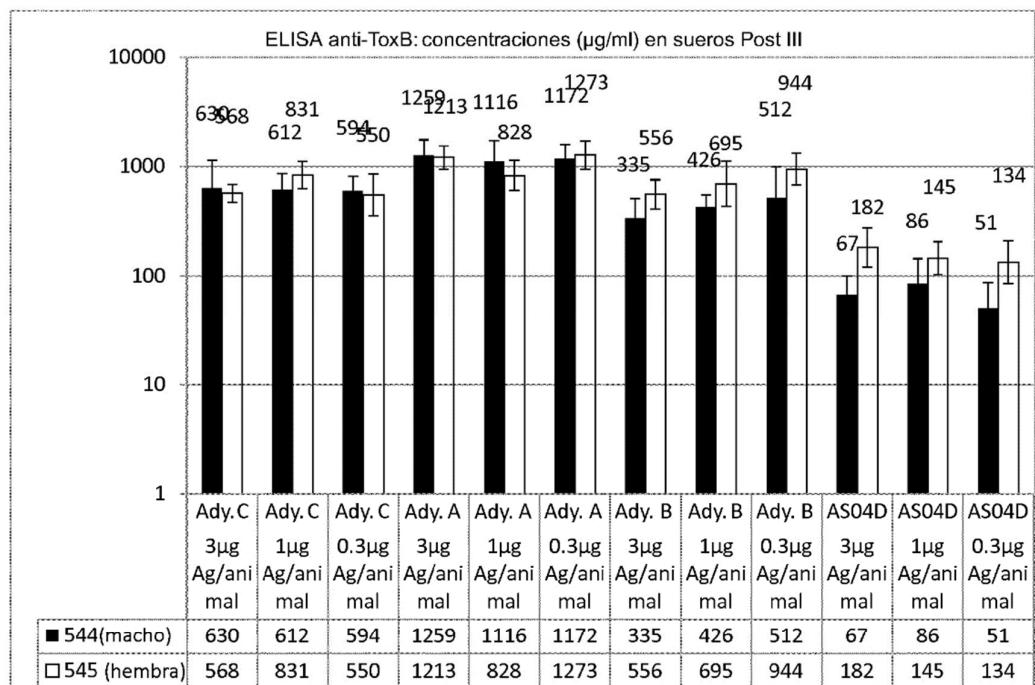
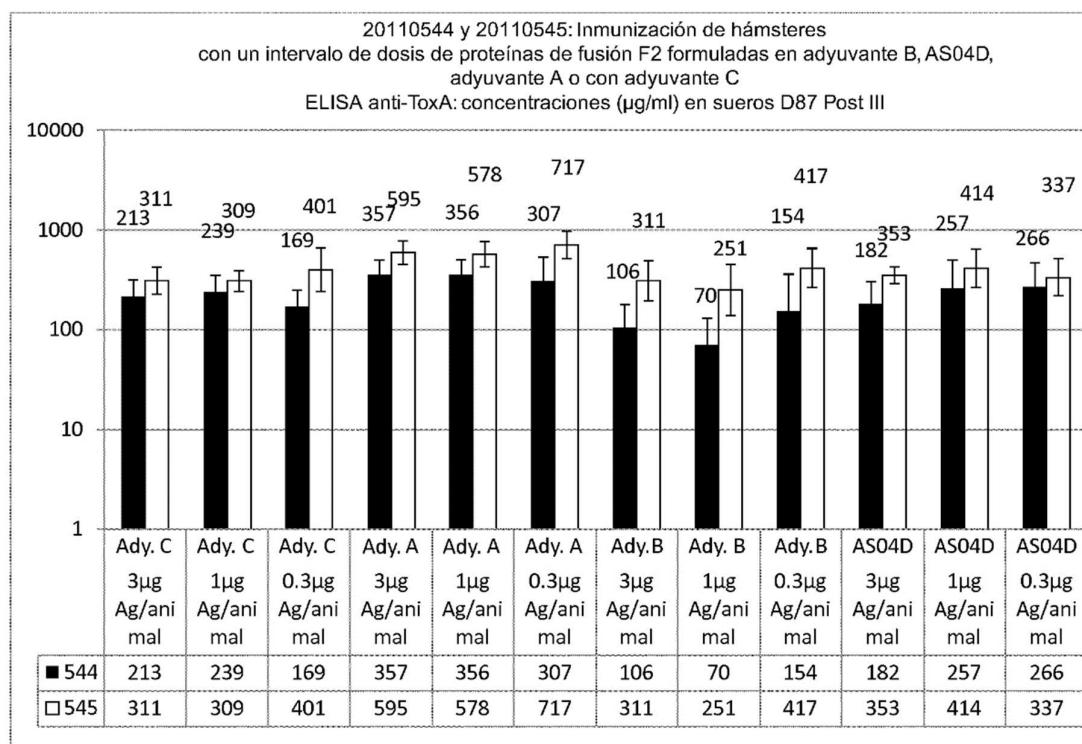
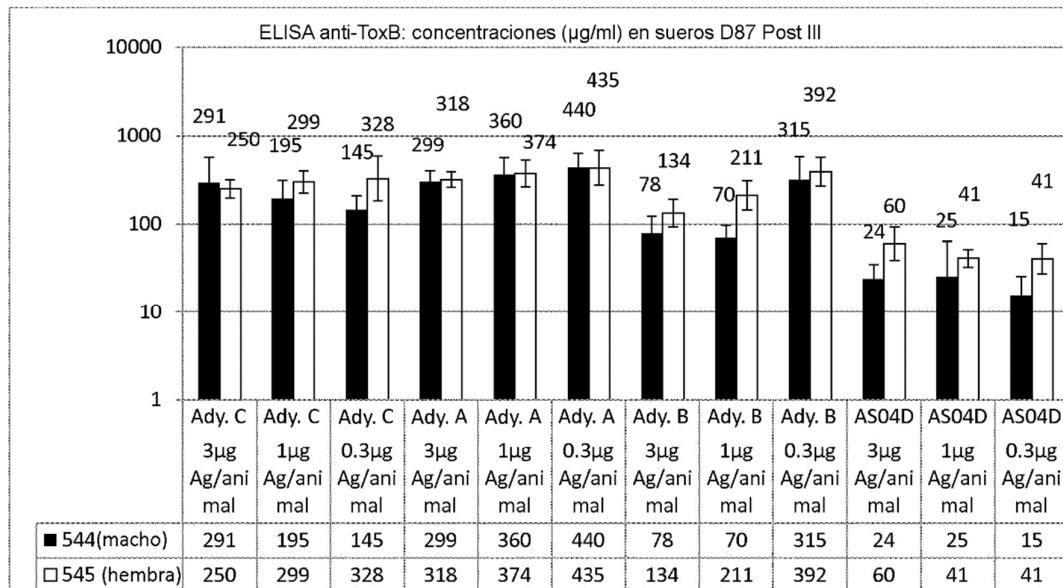
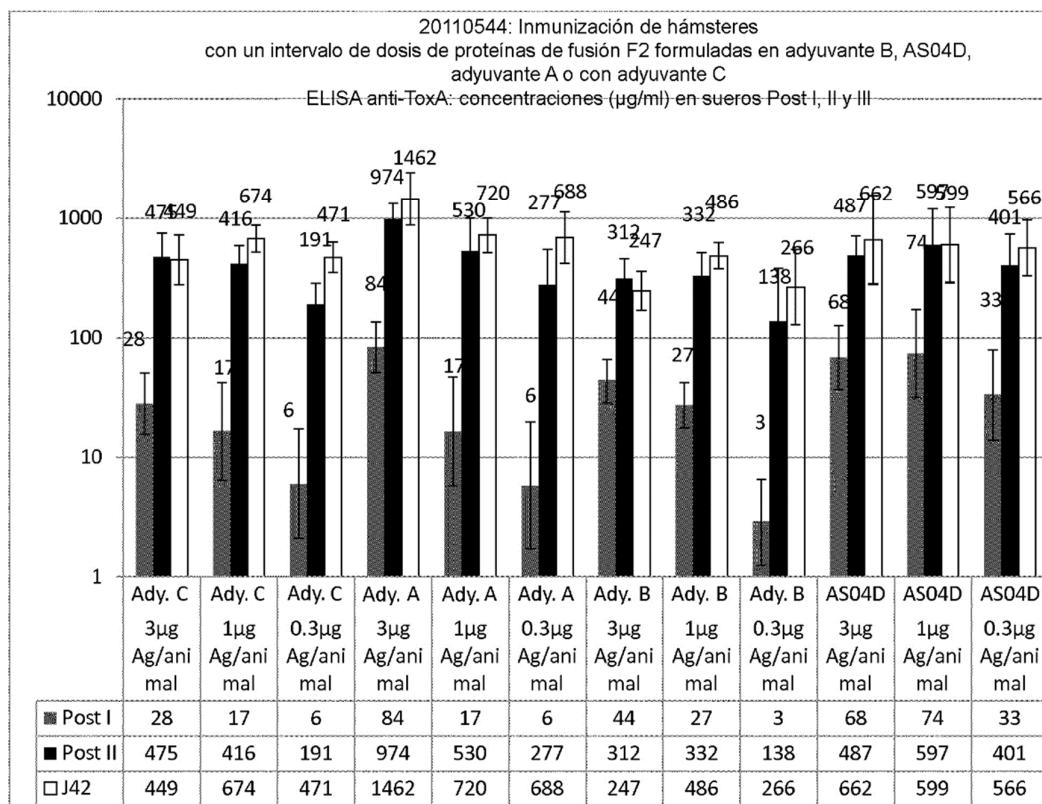
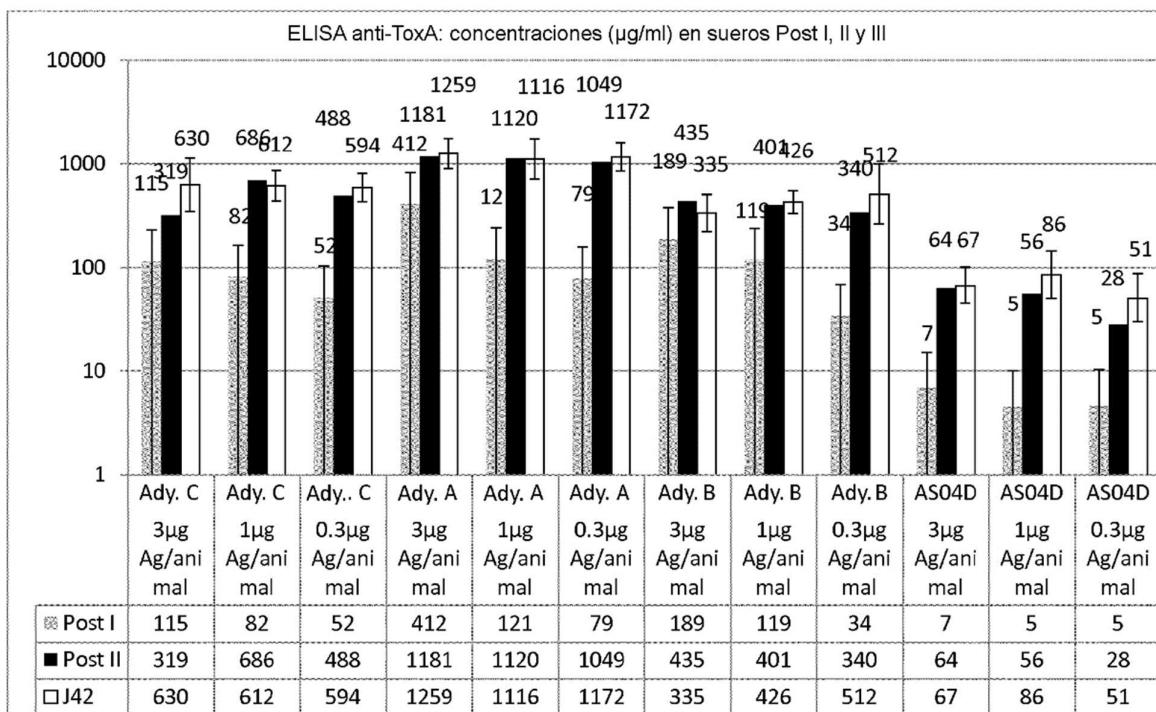


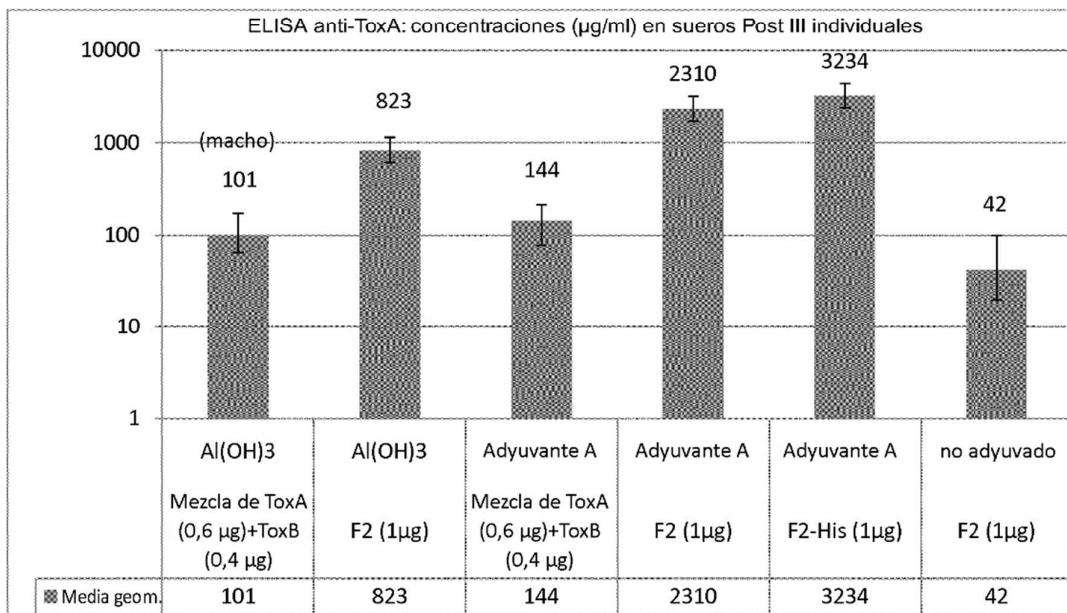
Figura 6



**Figura 7**

**Figura 8**

20120008 y 20120011: Inmunización de hámsteres hembra y macho. Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o adyuvante A



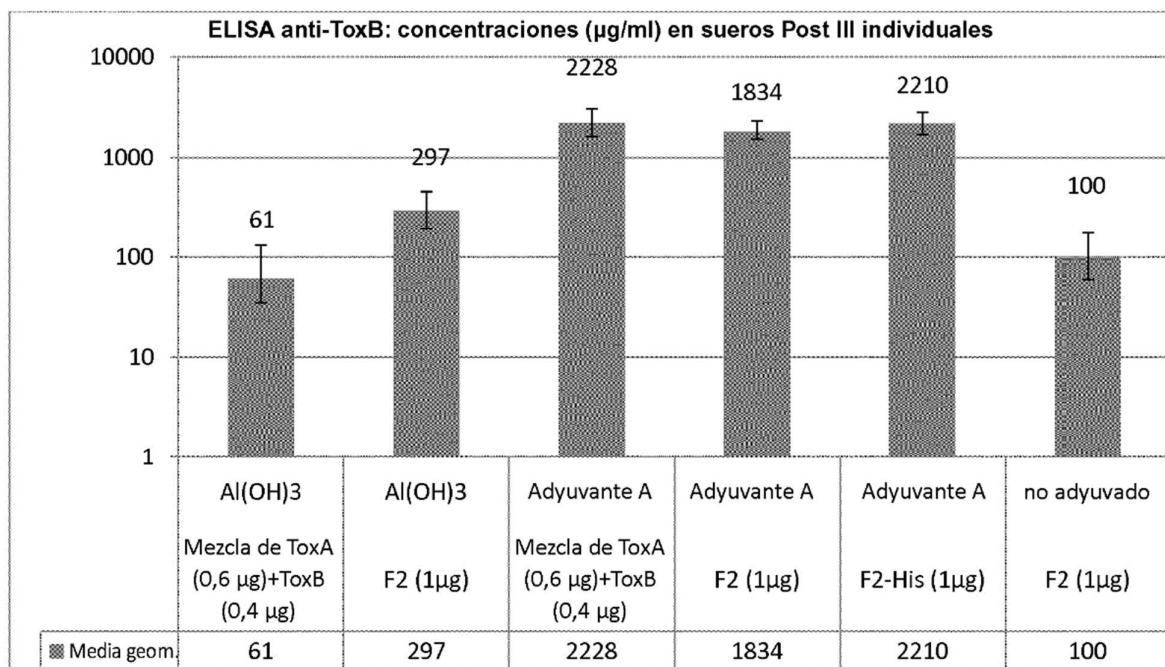


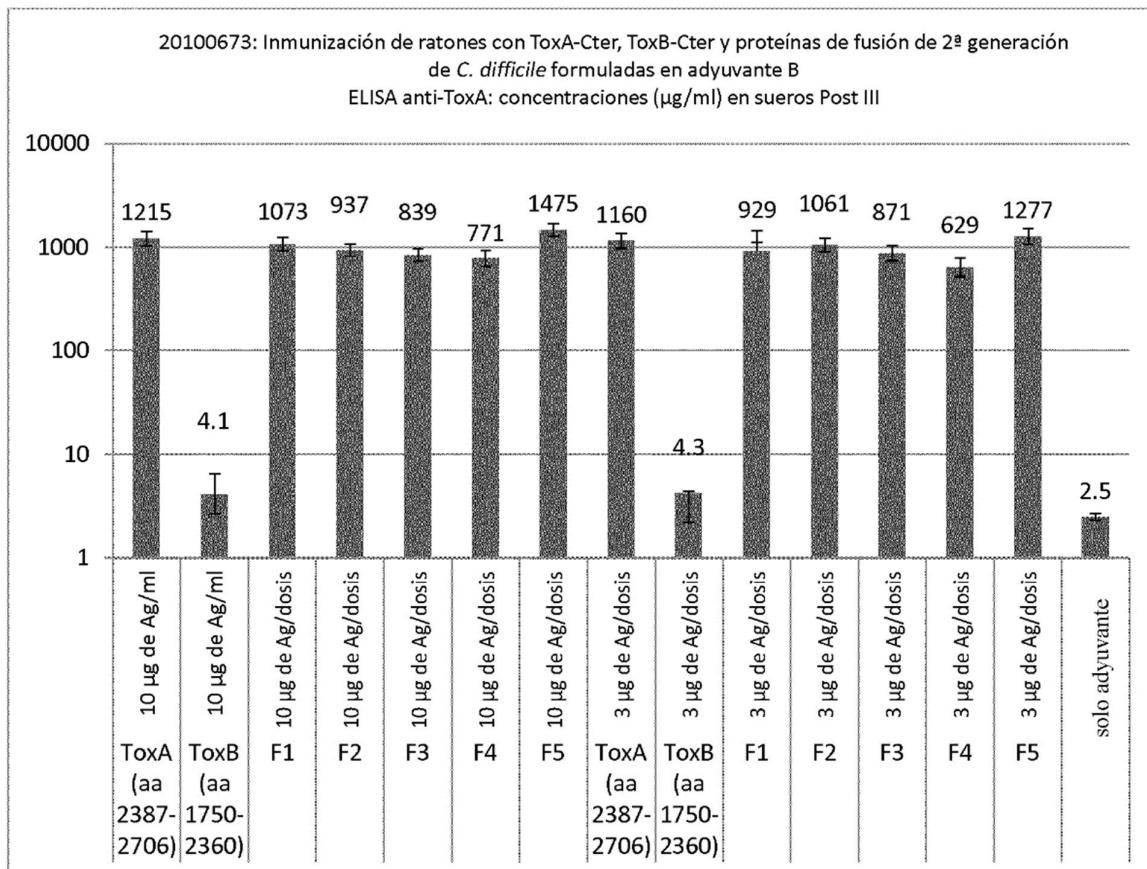
Figura 9

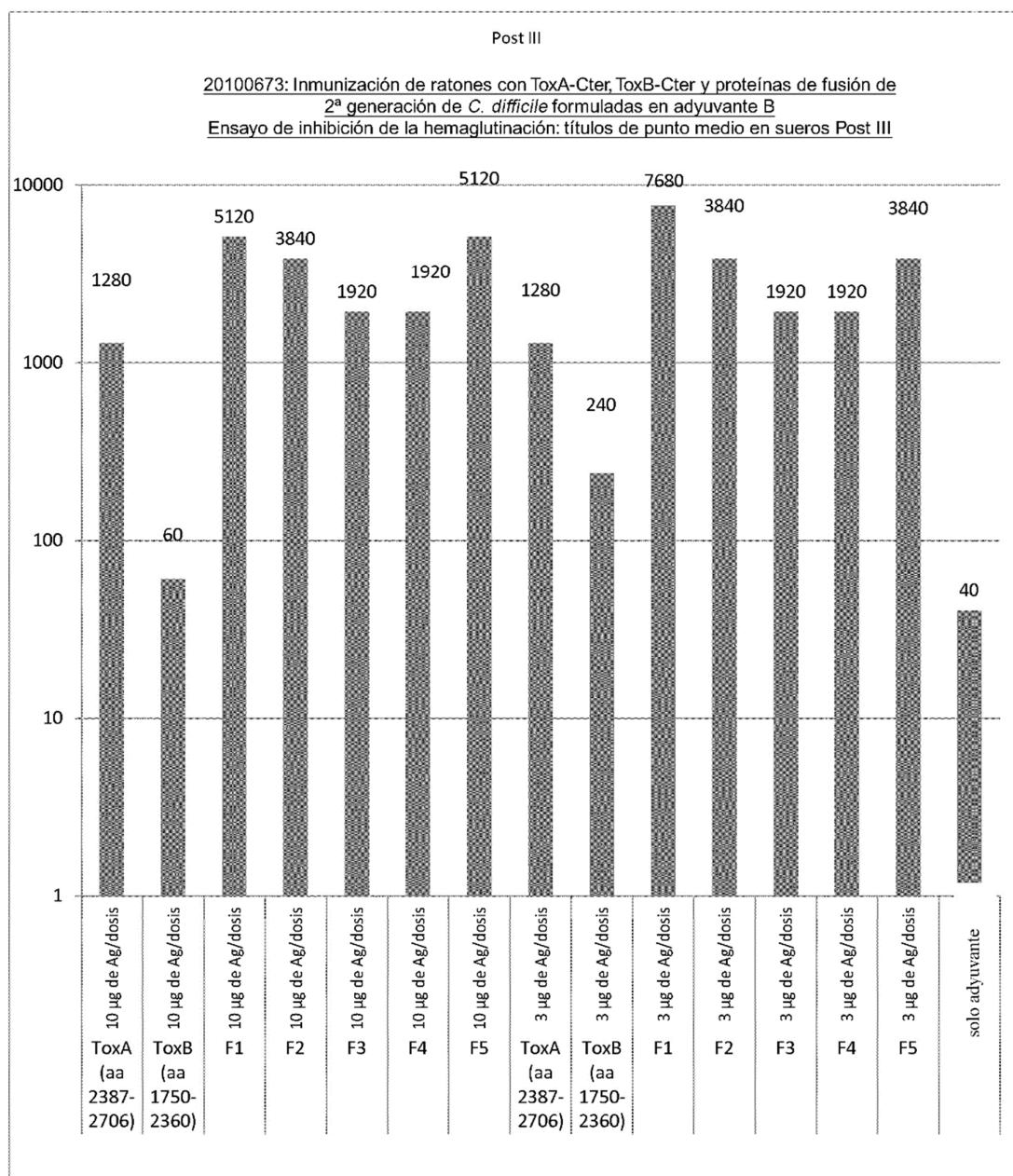
Figura 10

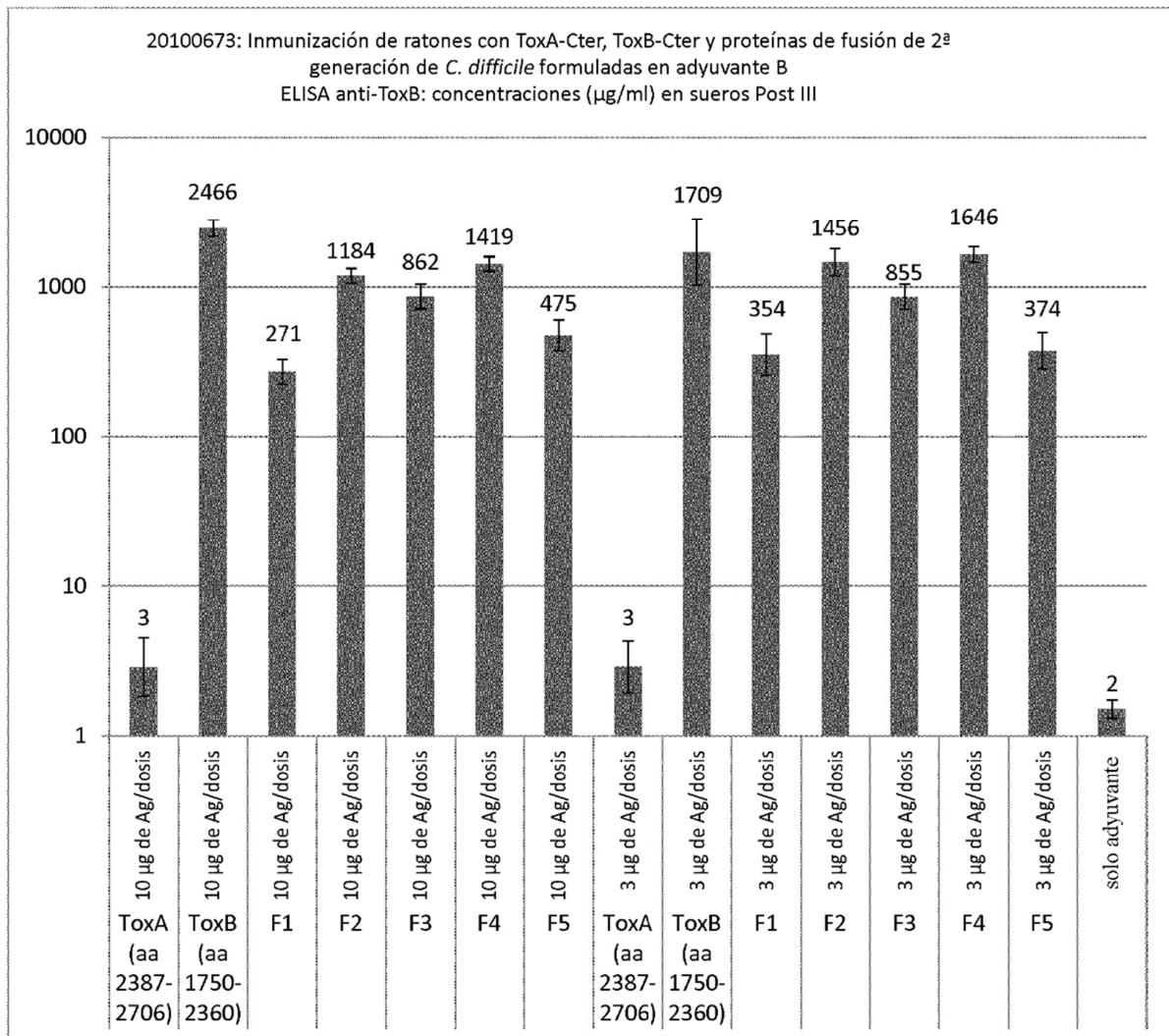
Figura 11

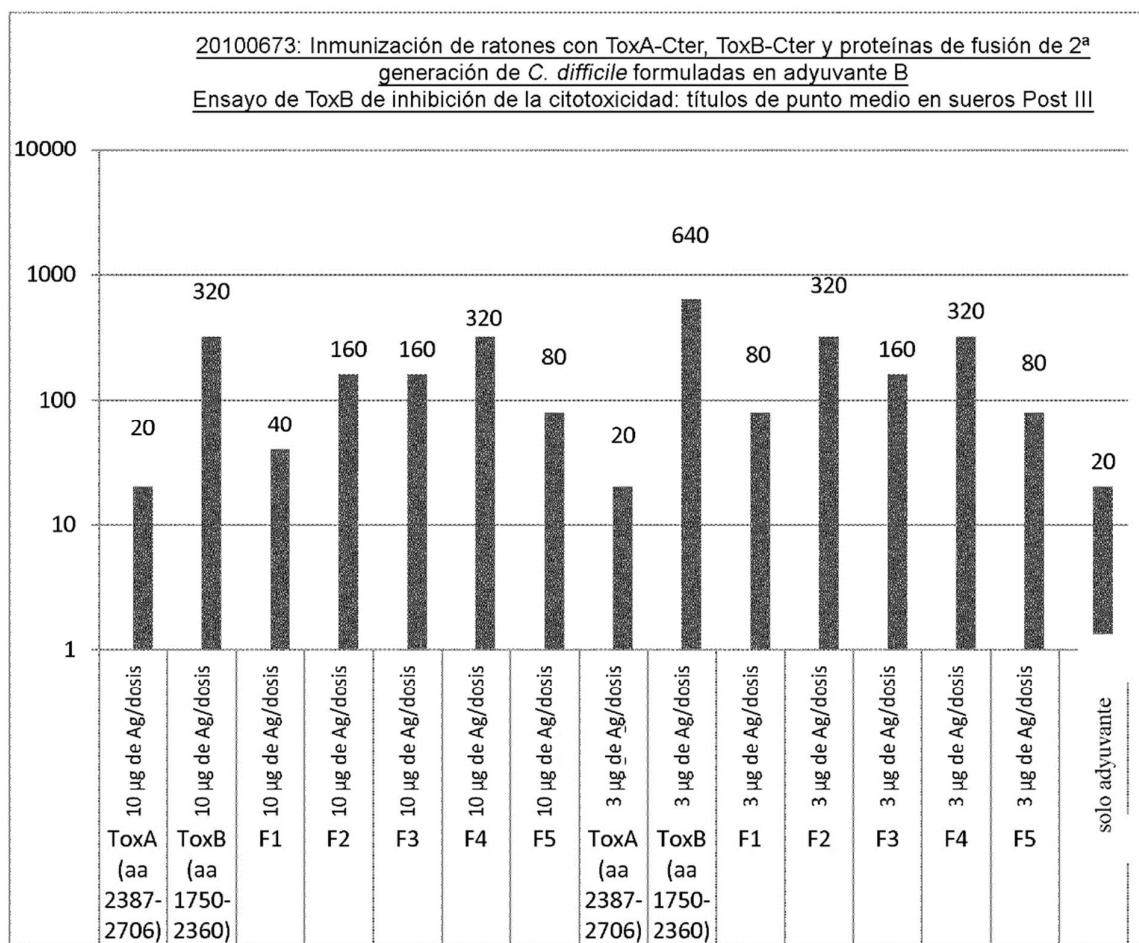
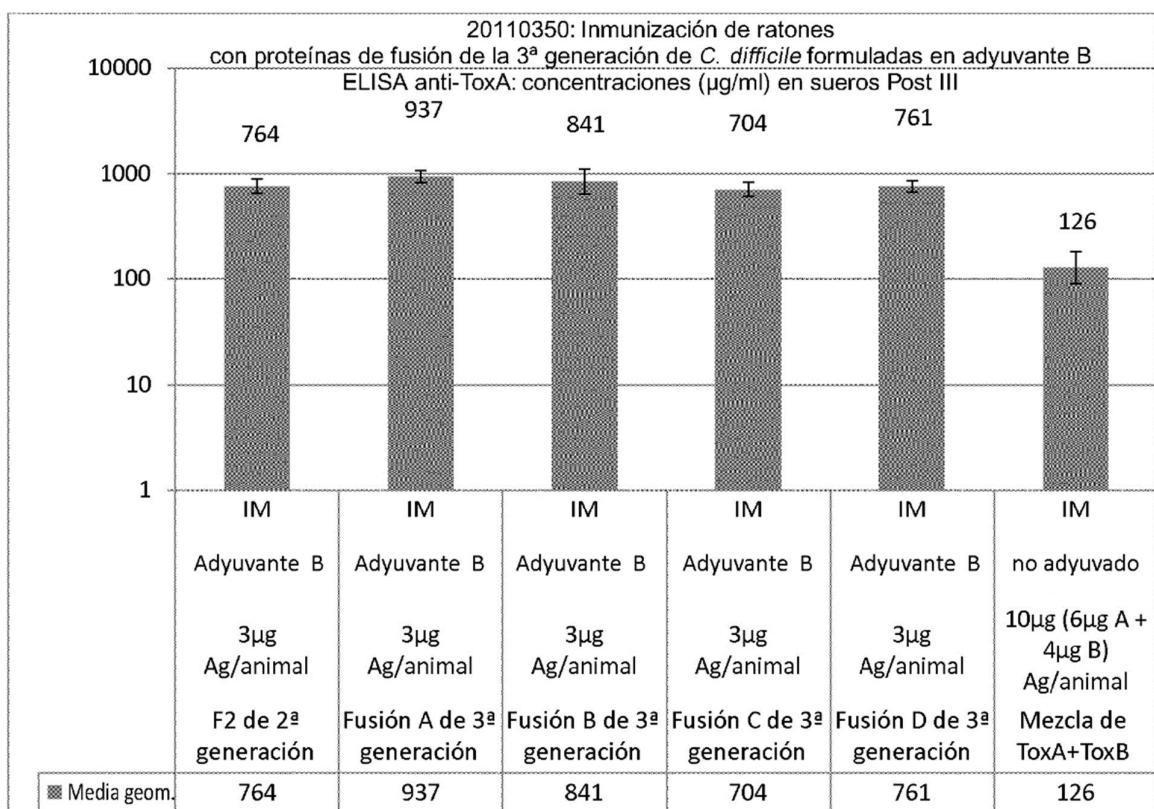
Figura 12

Figura 13

ES 2 939 307 T3

Figura 14

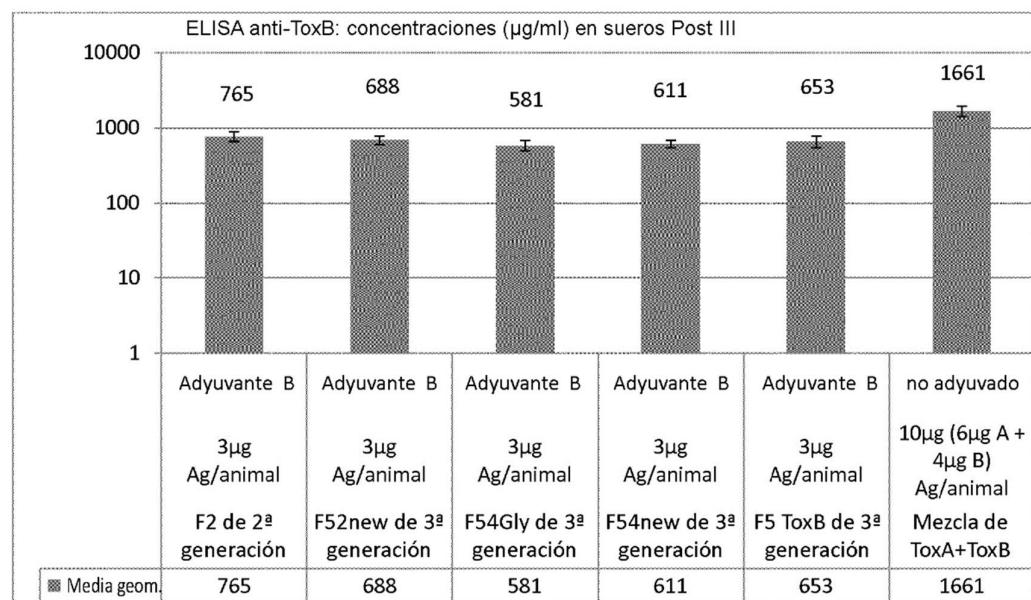


Figura 15

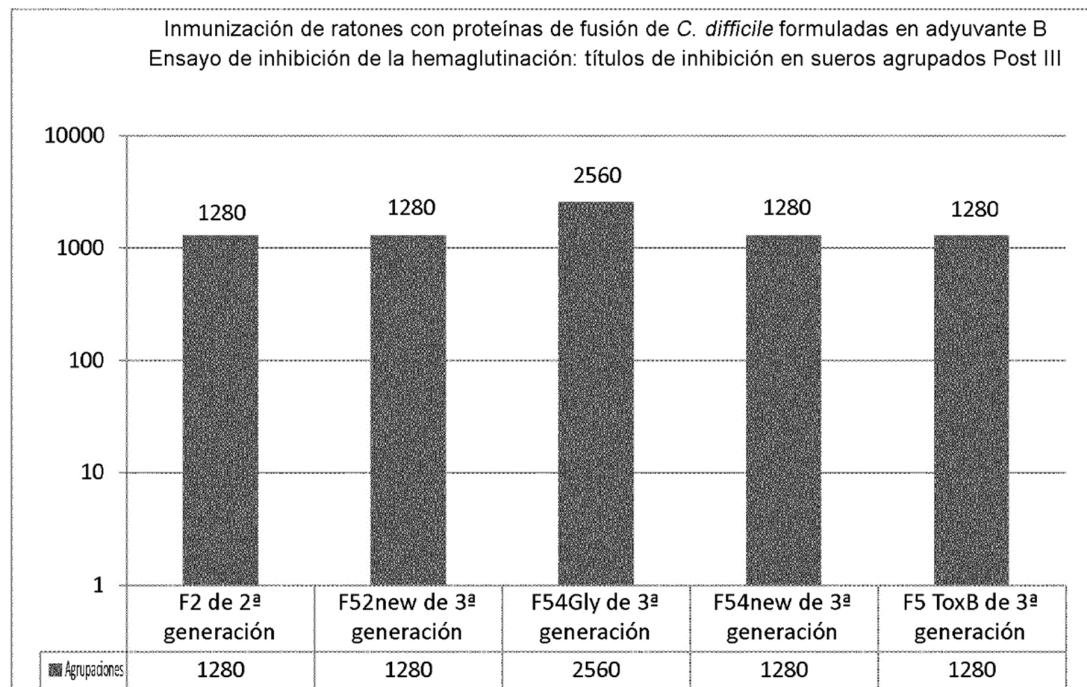


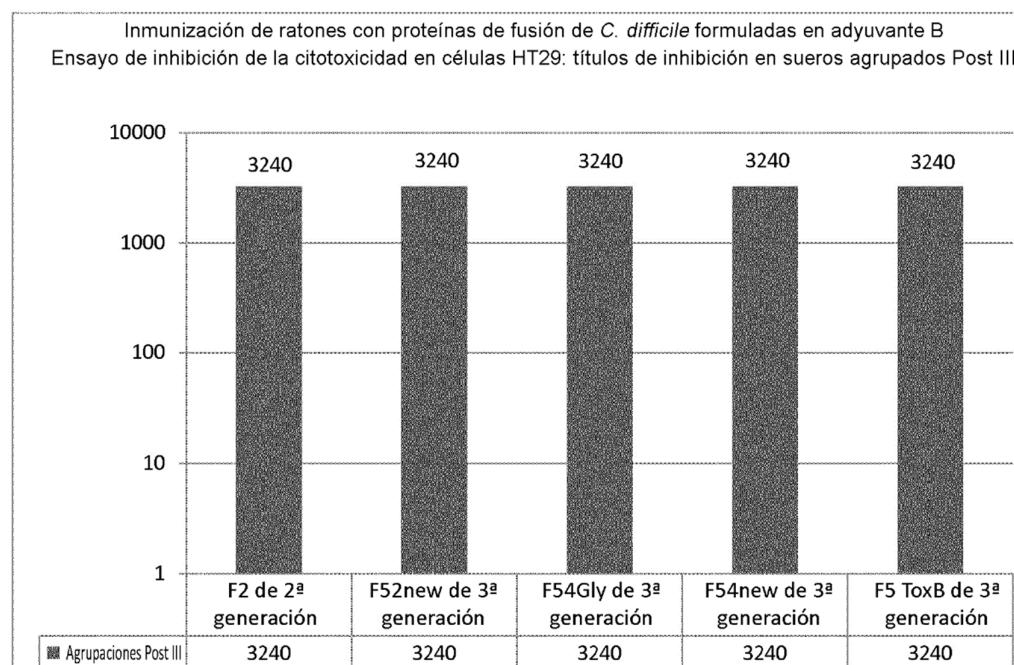
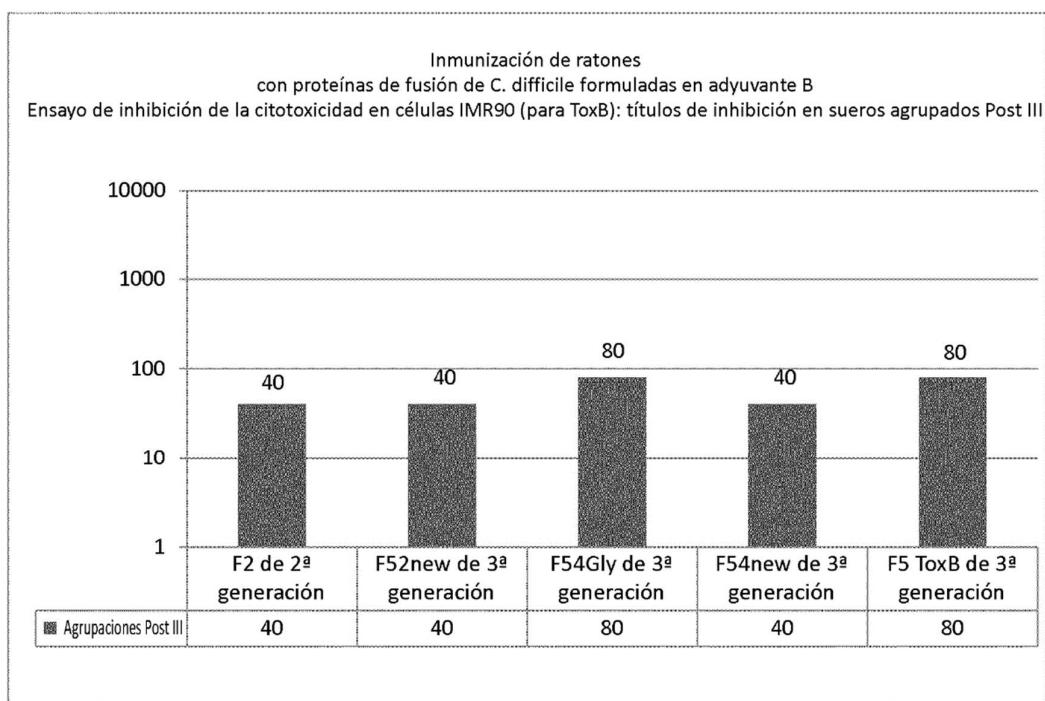
Figura 16**Figura 17**

Figura 18

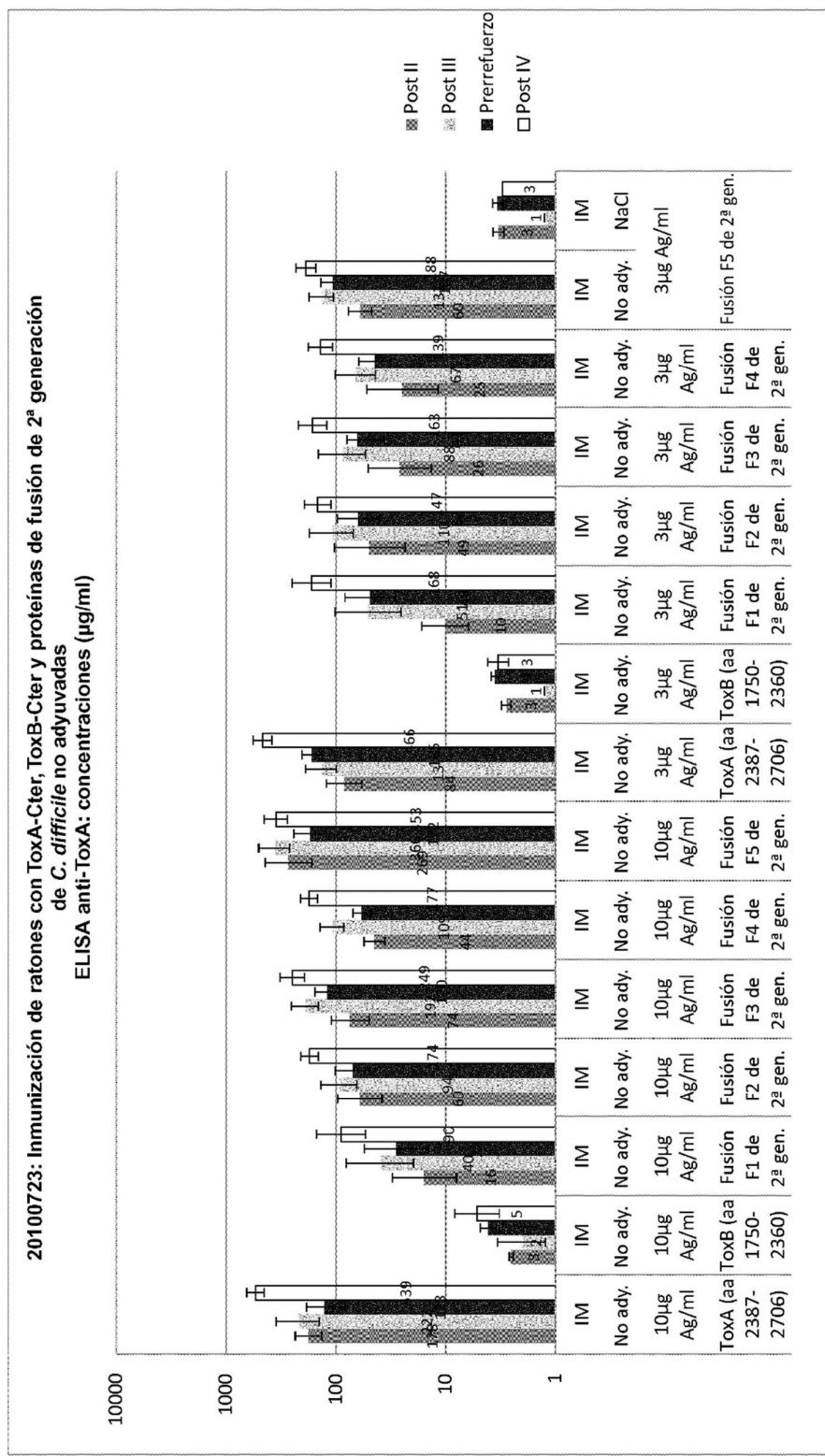


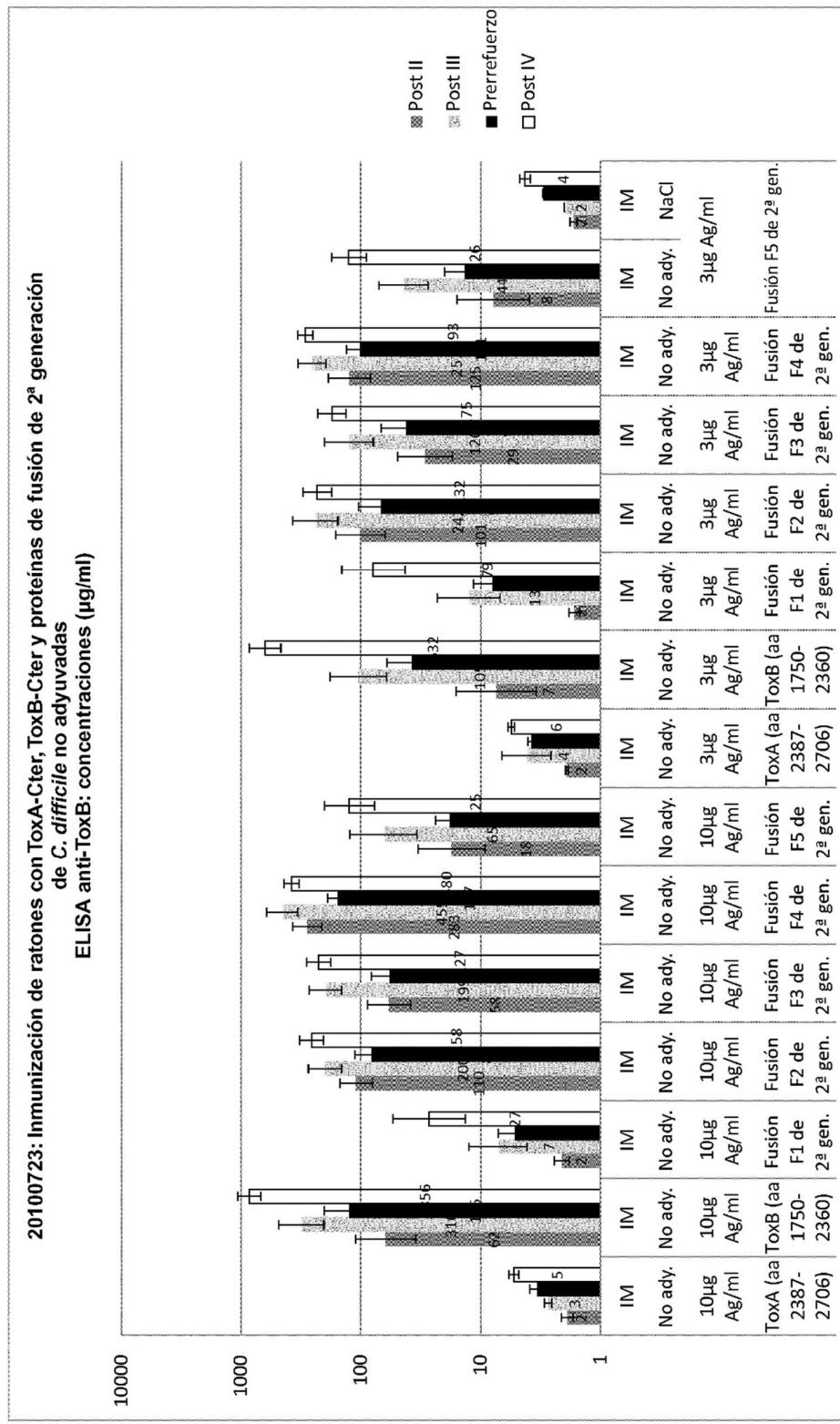
Figura 19

Figura 20

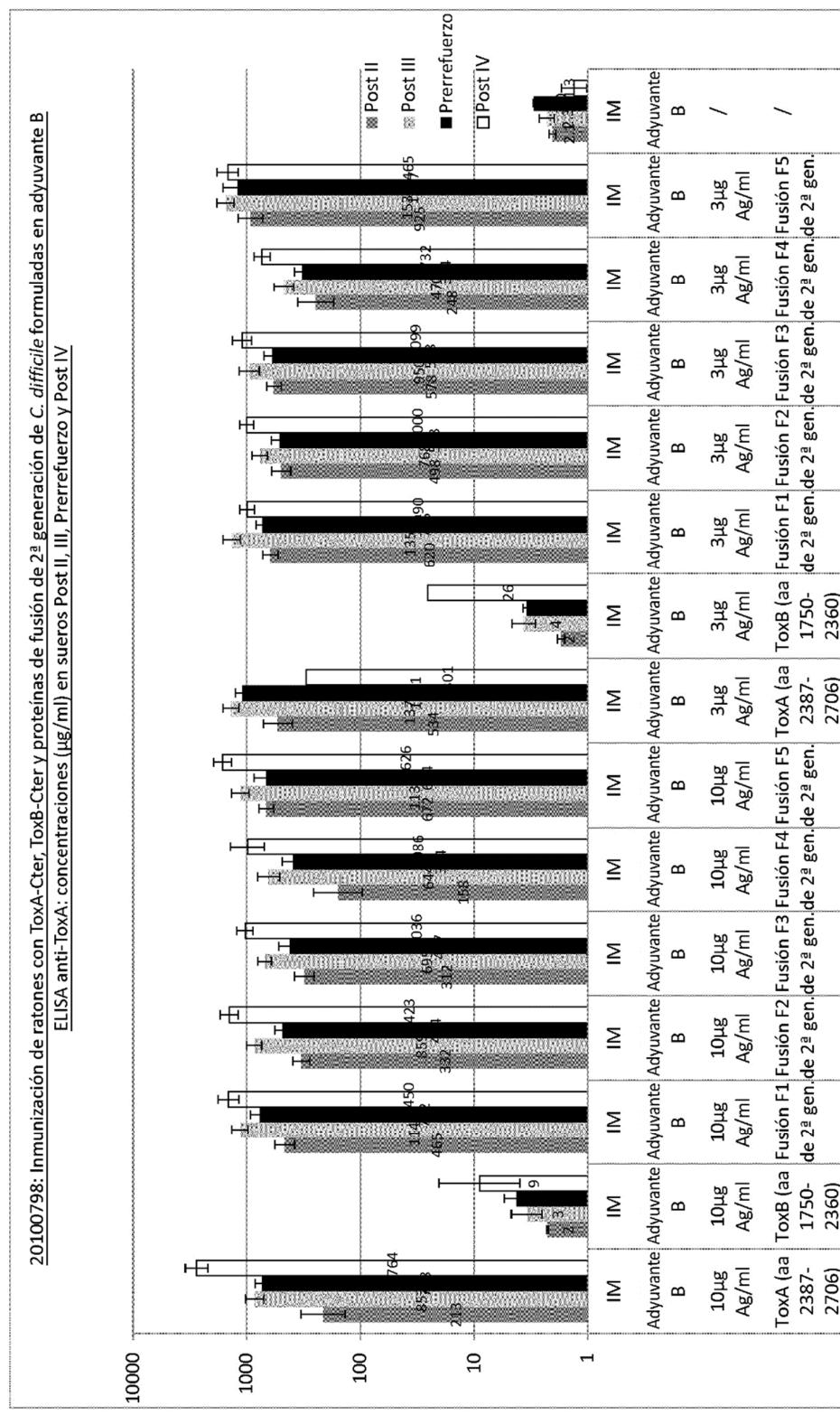


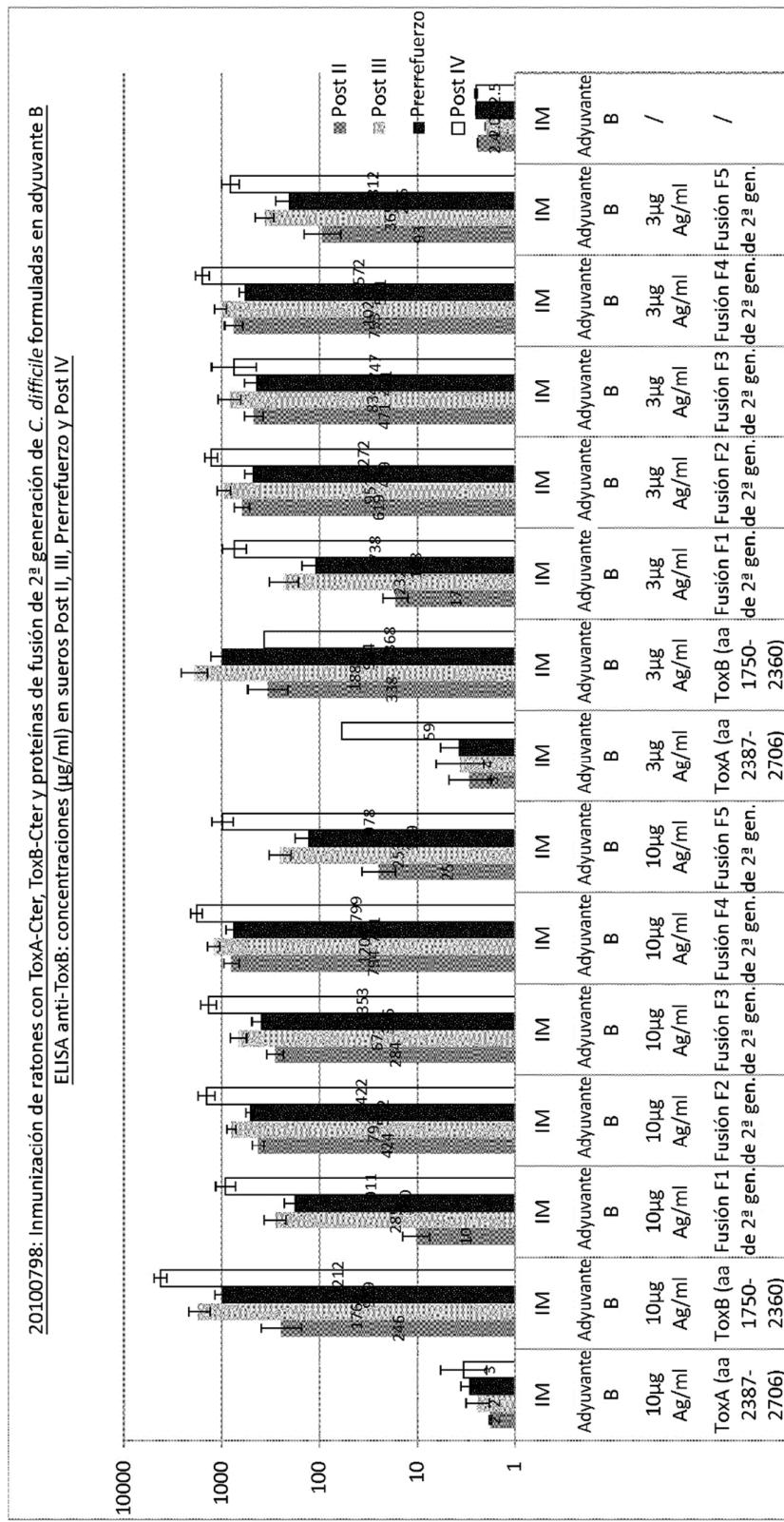
Figura 21

Figura 22

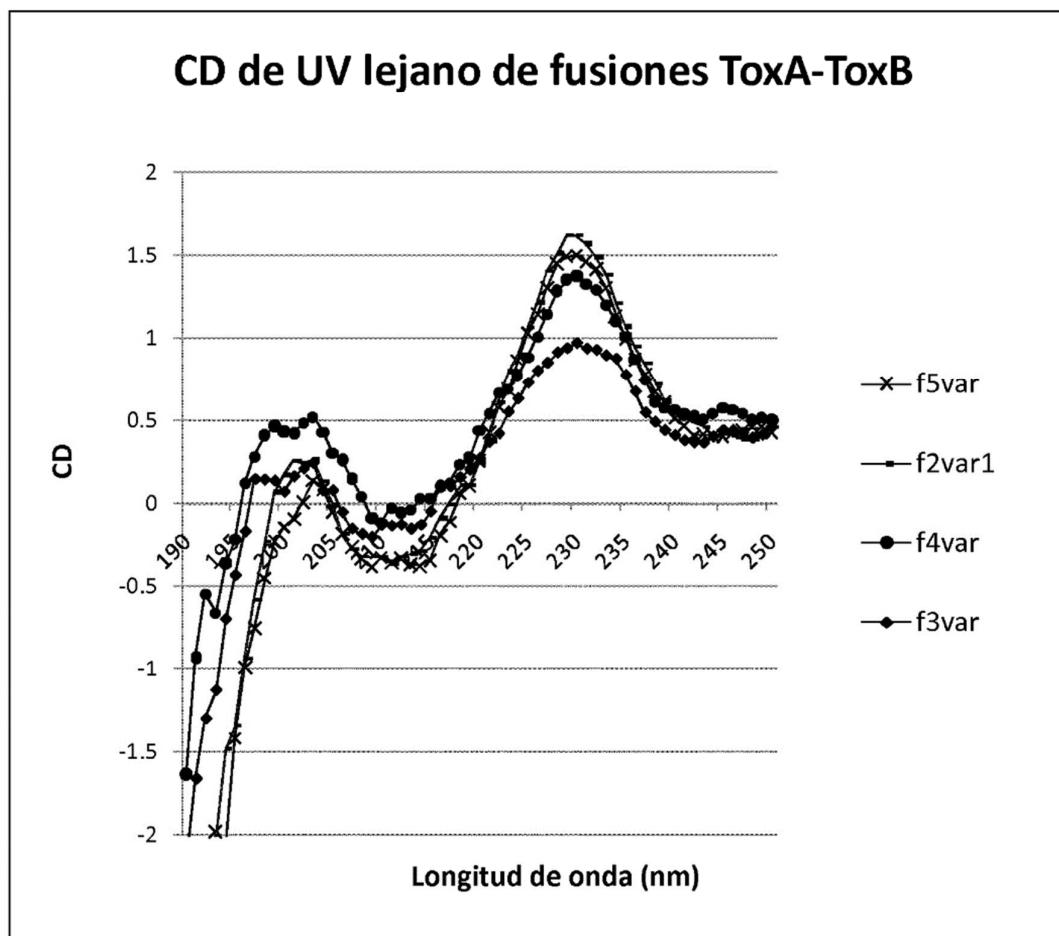


Figura 23

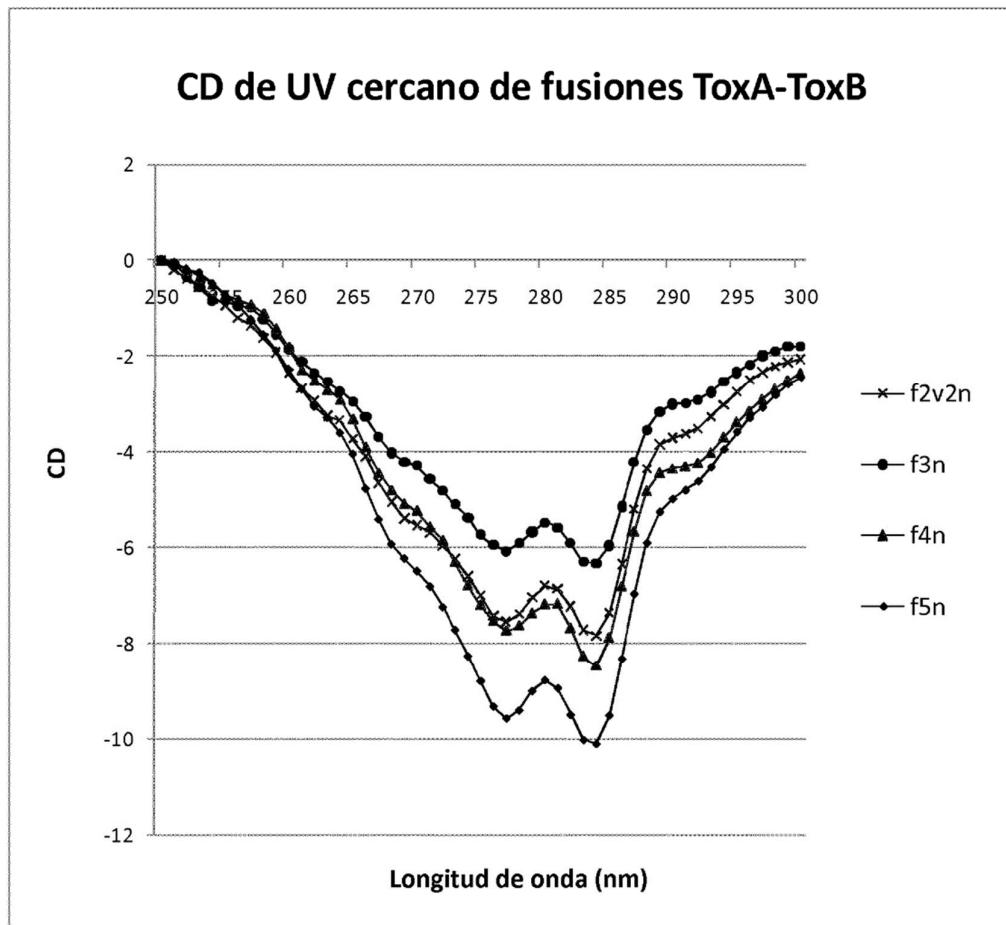


Figura 24

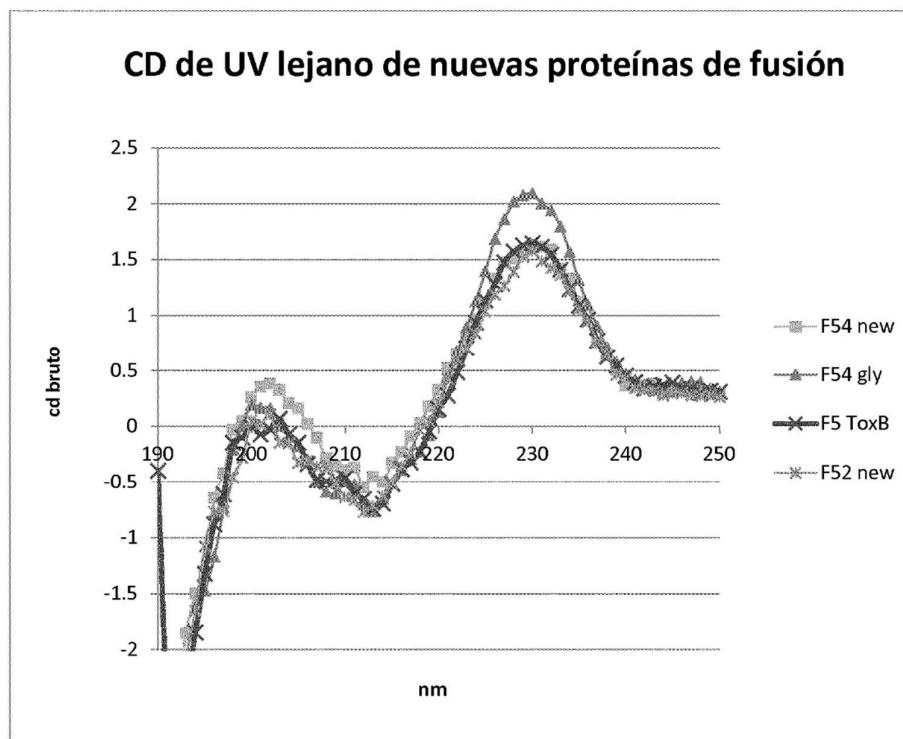


Figura 25

