

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:

- 10 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
- 15 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. 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

- 25 *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,
- 30 existe la necesidad de composiciones inmunogénicas capaces de inducir anticuerpos para, y/o una respuesta inmunitaria protectora frente a, *C. difficile*.

- La enterotoxigenicidad 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.

- 55 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 con útiles como composiciones adyuvantes (documentos EP 399843; WO 95/17210; WO2008043774).

60

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 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

- 25 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.

- 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

- 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. 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*).
- 40

- 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.
- 55

- 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65 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*.
- 70 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*.
- 75 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, prrefuerzo, Post IV, de *C. difficile*.
- 80 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, prrefuerzo, Post IV, de *C. difficile*.
- 85 Figura 22 - Gráfico que describe el espectro UV lejano de las fusiones 2, 3, 4 y 5 medido usando difracción 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. 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 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.

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.

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 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 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

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.

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*.

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 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.

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;

(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 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.

20

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.

25

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.

30

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.

35

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.

40

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.

45

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.

50

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.

55

“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.

60

- 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

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 inmunogénica 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 inmunogénica 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.

5 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.

15 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.

20 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.

25 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 está dentro de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A.

35 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.

45 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).

50 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).

55 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 epítipo 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 epítipo 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.

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 un ejemplo específico 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.

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).

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 es 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.

40 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/el 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. 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%.

50 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, 11ª ed., página 341, como un esterol que se produce de manera natural encontrado en la grasa animal.

55 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 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.

60 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 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.

- 25 Una realización que no forma parte de la invención proporciona una dosis de una composición inmunogénica que 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.

- 30 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 53 µg o entre 48 y 52 µg o entre 49 y 51 µg, o 50 µg.

- 35 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.

- 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.

- 45 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 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.

- 50 La dosis de la composición inmunogénica según cualquier aspecto de la invención de manera adecuada se refiere a 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
60 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 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).

- 15 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,

- 20 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, 25ª 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
- 25 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
- 30 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, 10ª edición, entrada n.º 8619).

- 35 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.

- 40 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.

- 45 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.

- 50 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.

- 55 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.

- 60 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 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 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 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 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 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.
- 15

- 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 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*.
- 20

- "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 y megacolon tóxico, que pueden ser potencialmente mortales.
- 25

"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) 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."
- 35

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

- 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 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).
- 45

- 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, pueden ser aproximadas.
- 55

- 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 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 temperatura ambiente (TA) con agitación. El color se manifestó usando 4 mg de O-fenilendiamina (OPD) + 5 µl de H₂O₂ 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.

- 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

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

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).

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.

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
- 35 iniciales: residuo 2370, 2234 y 2121 de ToxA.

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).
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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).

30

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, alumbre o formulaciones no adyuvadas.

35

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, alumbre o no adyuvada.

40

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	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	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

Grupos	1	2	3	4	5	6
	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	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	F2 1µg/dosis	F2 1µg/dosis	F2 1µg/dosis	F2 1µg/dosis	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	F2 1µg/dosis	F2 1µg/dosis	F2 1µg/dosis	F2 1µg/dosis	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.

- 25 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.**

- 35 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

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 I	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.**

Se inmunizaron 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.

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

<u>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</u>						
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

<u>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>
--

<u>ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros Post III individuales</u>						
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	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 inmunizaron ratones Balb/C con los constructos descritos en el ejemplo 1.
- Se inmunizaron IM grupos de 15 ratones Balb/c hembra los días 0, 14 y 28 con 3 µg o 10 µg 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.
- 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 H₂O₂ 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).

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.

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.

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.

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

Resultados:

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

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.

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 inmunizaron 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 inmunizaron IM 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

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 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	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.

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

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.

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.

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

Se inmunizaron 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.

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 (prerrefuerzo 87) y día 134 (Post IV 14). **Figuras 18 y 19.**

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 (µg/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 µg 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
Prerrefuerzo	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 (µg/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 µg 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.	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
Prerrefuerzo	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

10 Se inmunizaron 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 una formulación de adyuvante B.

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

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

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 (µg/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
	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 (µg/ml) en sueros Post II, III, prerulezuo, 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
	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
Prerulezuo	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/XhoI 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): 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 \pm un 1% (p/v) glucosa + kanamicina (50 μ g/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.

30 Este cultivo durante la noche se diluyó hasta 1:20 en 500 ml de medio LBT que contenía kanamicina (50 μ g/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.

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-tiogalactopiranosido 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 cromatografía SEC para una etapa de purificación adicional.

50 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 μ m, se almacenaron a -80°C.

60 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/XhoI 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 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*.

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:

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-tiogalactopiranosido 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.
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.
 - a. Proteína de fusión F1, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
 - b. Proteína de fusión F2, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
 - c. Proteína de fusión F3, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
 - d. Proteína de fusión F4, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0
 - 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.
 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.
 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 espectroscopia de fluorescencia**

- 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.

- 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.

Se usó el siguiente protocolo:

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 espectropolarímetro Jasco J-720. La temperatura de la célula se mantiene a 23°C mediante un bloque de células RTE-111 termostatzado Peltier. Se mantiene un flujo de nitrógeno de 10 l/min durante las mediciones.
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 espectropolarímetro Jasco J-720. La temperatura de la célula se mantiene a 23°C mediante un bloque de células RTE-111 termostatzado 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

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNENKYLQLKKLNESIDVFMN
 KYKTSSNRNALS NLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADI
 NAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAI VESSSTEALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFTYD
 RQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIR
 ANSLFTEQELLNIYSQELNLRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDLFKTI
 SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS
 KLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESD
 NNFTDTTKIFHDSLFNSATAENSMTLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDF
 INLQENTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTG
 SLSEDNGVDFNKNTALDKNYLLNKKIPSNVVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF
 SKNPKNIIIQRMNSES AKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKTFIGHGKDEF
 NTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGCNMFSDYDNVEETYPGKLLLS
 IMDKITSTLPDVNKNISITIGANQYEVRISEGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSKEYI
 FFDSIDNKLKAKSKNIPGLASISEDIKTLLLDASVSPDTKFLNNLKLNIESSIGDYIYY
 EKLEPVKNIIHNSIDDLIDFNLLENVSDLEYELKKNLNLDEKYLISFEDIKNNSTYSV
 RFINKNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNIQLDHTSQVNT
 LNAAFFIQSLIDYSSNKDVNLNLDSTSVKVQLYAQLFSTGLNTIYDSIQLVNLISNAVNDT
 INVLPITTEGIPIVSTILDGINLGAAIKELLDEHDP LLKKELEAKVGVLA INMSLSIAAT
 VASIVGIGA EVTIFLLPIAGISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSESKKYGLPKT
 EDDKILVPIDDLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP
 SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGTRLLDSIRDLY
 PGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDKDTNRNFIMPTITITNEIRNKL SYSFDGA
 GGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNIDNEVREISIENGTIKKGKLKIDVLSKIDINK
 NKLIIGNQTI DFGDIDNKDRYIFLTCELDKISLII EINLVAKSYSLLSGDKNYLISN
 LSNTIEKINTLGLDSKNIA NYTDESNNKYFGAISKTSQKSI IHYKKDSKNILEFYNDST
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYL NES
 VYSSYLDVFNKSDGHNHTSNFMNLF LDNISFWKLF GFENINFVIDKYFTLVGKTNLGYVE
 FIDCNKNKIDIIYFGEWKTS SSKSTIFSGNGRNVVVEPIYNPDTGEDISTLDFS YEPLYG
 TDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKNINL DSSSEYKWS
 TEGSDFILVRYLEESNKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNLVTGWQTINGK
 KYFFDINTGAALTSYKIINGKHFFYNNDGVMQLGVFKGPDGF EYFAPANTQNNNIEGQAI
 VYQSKFLTNGKKYFFDNNSKAVTGWRIINNEKYFFNPNNAAAVGLQVIDNNKYYFNP
 TAIISKGWQTVNGSRYYFDTDTAIAFNGYKTIDGKHFFYDSDCVVKIGVFSTSGNFEYFA
 PANTYNNNIEGQAI VYQSKFLTNGKKYFFDNNSKAVTGLQTI DSKKYFFNTNTAEAAATG
 WQTIDGKKYFFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYFFNTNTAIASTGYTIINGKHFFNTD GIMQ
 IGVFKGPNGF EYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGKKYFFGSDSKAVTGWRIINNK
 KYFFNPNNAAIAIHLCTINNDKYFFSYDGILQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKG
 PNGFEYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTNGKKYFFDNDSKAVTGWQTI DSKKYFFNL
 NTAEAAATGWQTIDGKKYFFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYFFNTNTFIAS TGYTSINGKHFF
 FNTD GIMQIGVFKGPNGF EYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKKYFFGSDSKAVT
 GLRTIDGKKYFFNTNTAVAVTGWQTINGKKYFFNTNTSIASTGYTII SGKHFFNTD GIM
 QIGVFKGPDGF EYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYFFGNNSKAATGWVTDIG
 NRYFFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSGNFEYFAPANTDANNIEGQAI
 RYQNRFLHLLGKIYFFGNNSKAVTGWQTINGKVYFFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV
 DGVKAPGIY G

SEQ ID NO:2 - secuencia de toxina B

MSLVNRKQLEKMANVRFR TQDEYVAI LDAL EYHNMS ENT VVEKYLKLDINS LTDIYI

DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFFRKRMEIYY
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV
RNFEFEKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMPLGPIQPDFLSES
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSSEHFDMLDEEVQSSSFESVLASKSDKSEIF
SSLGDMEASPLEVKIAFNASKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE
DNDFTNTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGGFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKRNIFE
GSLGEDDNLDFSQNIIVVDKEYLLEKISSLARSSERGIHYIVQLQGDKISYEACNLFAK
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYNPBGDEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSSYSINVEETYPGKLLLVK
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRLINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF
NPKENKITVKSKNLPESLTLQEI RNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIESISDALCDLKQQNELEDSEHFSFEDISSETDEGFSIRF
INKTGESIFVETEKTI FSEYANHITTEEISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTHEVNTLN
AAFFIQSLIEYNSSKESLNSLVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAKVVELVSTALDETID
LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLRQEI EAKIGIMAVNLTTATTAIT
SSLGIASGFSIILVPLAGISAGI PSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSIVETEGVFTLLD
DKIMPPQDDLVI SEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMLVLPNAPNRVFAWETGWTPLGRSLENDGKLLDIRDNYEG
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRS FIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG
GTIALSLSQYNMGINIELSES DVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGLIEGILSTLSIEEN
KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS
NHIQQKIDYIGFNSSELQKNIPYSFVDSEKENGFGINGSTKEGLFVSELPDVVLISKVYMD
DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLSNVHLDSE
GVAEILKEMNRKGNTNTSDSLMSFLESNNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ
FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY
LYGIDSCVNKVVISPNIYTDENITPVYETNNITYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY
VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVN VFKDCTLANKLSFNFSQDQDVPVSEIILSFT
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYFFKPPVNNLITGFVTVG
DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYFFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEHMYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGKYFA
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYI DDNGIVQIG
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYI
AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:3 - secuencia de fusión 1

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSGNFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAPGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG
FVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYI DDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQQAVEYSGLV
RVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFT
DEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:4 - secuencia de fusión 2

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
 NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
 YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
 YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
 QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
 VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
 QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLNQIGDYK
 YYFNSDGMVQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
 EEGEEISYSGILNFNKKIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG
 FVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
 RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYY
 FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFT
 DEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:5 - secuencia de fusión 3

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
 NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
 YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
 YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
 QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
 VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
 QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
 YFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKKIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQY
 YFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNI
 YGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRT
 GLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGW
 LDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:6 - secuencia de fusión 4

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
 NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
 YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
 YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
 QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
 VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
 QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGETIIDDKN
 YYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGMHY
 FSPETGKAFKGLNQIGDYKYFNSDGMVQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGV
 FNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKKIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGL
 SLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAP
 ANTVDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYF
 DEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEG
 ESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:7 - secuencia de fusión 5

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAAAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAPGIYGGGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHN
EDLGNEEGEEISYSGILNFNKKIYYFDDSFYAVVGWKLDEGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDG
IMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQAVE
YSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFE
NNNYFENENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEK
RYYFTDEYIAATGSVIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

MASTGYTSINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSK
AVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPD
GFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDN
KNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKV
YFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAP

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

MILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNSFSKQDVPVSEIILSFTPSYYEDGLIGYDLGLVSLYN
EKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSG
VLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGK
AFKGLNQIGDYKYYFNSDGMVQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGF
KYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKKIYYFDDSFYAVVGWKLDEGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQ
YYFNDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDN
IYQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMR
TGLISFENNYYFENENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTG
WLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIDGEEYFDPDTA

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

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAAAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAP

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

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
QIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAG

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

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
QIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
Y

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

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
QIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAG

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

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGIM
QIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVVDGVKAPGIYG

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

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
LNFNNKIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYF
SDSGIIESGVQNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGE
TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGY
INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVI
IDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

GLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYF
AHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYF
NDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYG
QAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGL
ISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLD
LDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYY
FNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIY
GQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG
LISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

GETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEW
KELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFA
ENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDE
DTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDT
SDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGIN
LIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQ
NTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
LNFNNKIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYF
SDSGIIESGVQNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGE
TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGY
INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVI
IDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAAC
GGCAAAACACTTTTATTTTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCAACCGGCAAAT
ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCGTAACGGCAAAAAATACTACTTTTGGCAGCGAT
AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACC
ATTAACAACGACAAATATTATTTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTCGATGCC
AACAACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTTGAGTATTCGCTCCGGCAAAACACCATAATAACAACATT
GAAGTGCAGGCGATCGTTTATCAGAACAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTTCGATAATGCAGCAAAAGCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCGGTTGGCAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
TACTTCAACCTGAACACAGCCGAAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGAAAAAAATACTATTTCAACACCAACACCTTTATTGCA
TCTACCGGTTATACCAGCATTACCGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTTCAAAGTCCAAATGGT
TTCGAATACTTTTCCCTGCCCAATACAGATGCAAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCGTAATGGG
AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTTAAAGCGTTTACCGGCTCGGTACCATTTGATGGTAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAAACGGGAAAAATACTATTTTAAACACAATAACAGCATTGCGCTCAACGGGTTATACCATTATT
TCGGGTAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTTCAATATTTTTCGCGCTCGG
AACACTGATGCGAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCAGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTGCAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCCGAGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
GCAATACGCGACGCAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCTGTATCAAACCGTTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGATACCGCCATGGCAGCAGCGGTGGT
CTGTTTGAATATGATGGCGTGATCTATTTTGGTGTGGATGGTGTAAAGCACCAGGGAATATACGGTGGTACCGGCTTTGTGACCGTG
GGTGATGATAAATACTATTTCAATCCGATTACCGGTGGTGCAGCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAACTATTATTTCAAC
CAGAGCGGTGTGCTGCAGACCGGTGTGTTTAGCACCAGAGATGGCTTTAAATATTTTGCGCCAGCGAACACCTGGATGAAAACCTGGAA
GGCGAAGCGATTGATTTTACCGGCAAACTGATCATCGATGAAACATCTATTACTTCGATGATAAATATCGTGGTGCAGGTTGAATGGAAA
GAACTGGATGGCGAAATGCATTATTTTCTCCGAAACCGGTAAAGCGTTTAAAGGCCTGAACAGATCGCGGATTAACAATACTACTTC
AACAGCGATGGCGTGATGCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGGCTAT
ACCGAAATATGATGGCAAACTTTCTACTTCGCGGAAACCGGGAATGCAGATTGGCGGTGTTCAATACCGAAGATGGTTTCAAACTACTTC
CGCCACCATTAACGAAGATCTGGGTAAAGGCGAAGAAATAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAACAAATCTACTACTTT
GATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAAATATTATTTCGATGAAGATACCGCGAAGCGTATATT

GGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAAAGATGATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAATGATAAAGTGTTC
TATTTTCAGCGATAGCGGCATTATTGAAAGCGGCGTGCGAACAATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACCGCATTGTGCAGATC
GGCGTTTTTGATACAGCGATGGCTACAAATATTTTCGACCGGCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAATATAGC
GGTCTGGTGCCTGTGGGCGAAGATGTGTATTATTTTCGCGGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTATGATATGAAAAACGAAAGC
GATAAATATTACTTTAATCCGAAACGAAAAAGCGTGCAAGGCAATTAACTGATCGATGATCAAAATACTATTTTGATGAAAAAGGC
ATTATGCGGTACCGGTCTGATTAGCTTCGAAACACAACTATTACTTCAACGAAACGGTGAAATGCAGTTTCGGCTACATCAACATCGAA
GATAAATGTCTACTTCGCGCAAGATGGTGTATGAGATGGTGTTTTAAACACCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCCCATCAGAAT
ACCCGTGATGAAAATTCGAAGGTGAAAGCATTAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCACCGATGAATAC
ATTGCGCGCAGCGCAGCGTGATTATTGATGGCGAAGAACTACTTTCGATCCGATACCGCGCAGCTGGTATTAGCGAACATCATCAT
CATCACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTIN
GKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNALAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESKMTGVF
KGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIQVYQNKFLTINLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYY
FNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGTYSINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILY
QNKFLTINLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFNTDGMQIGVFKGPD
GFEYFAPANTDANNIEGQAIQVYQNRFLYLHDNIYFNGNSKAATGWVTVIDGNRYFEPNTAMGANGYKT
IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIQVYQNRFLHLGLKIYFNGNSKAVTGWQTINGKVYFMP
DTMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGIYGGTGVFTVGDVKYFNPINGGAASIGETIIDDKNYFQSGVLQTVGVS
TEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGIIL
NFNKNIYFDDSFYAVVGWKLLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYFNDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESG
VQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSYGKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD
KYYFNPETKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPD
GFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIDGEEYFDPDTAQLVISEHHHHH

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAAC
GGCAAAACACTTTTATTTTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCACCGGCAAAAT
ACCGATGCCAAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCCTGAACGGCAAAAAATACTACTTTTGGCAGCGAT
AGCAAAGCAGTTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACC
ATTAACAACGACAAATATTATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACCTTTTATTTTCGATGCC
AACAAAGCAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTTGAGTATTTGCTCCGGCAAAACACCCATAATAACAACATT
GAAGTTCAGGCGATCGTTTATCAGAACAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAAGCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCGGTTGGCAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
TACTTCAACCTGAACACAGCCGAAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAATAATACTATTTCACACCAACACCTTTATTGCA
TCTACCGGTTATACAGCATTAACGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTCAAAGGTCCAAATGGT
TTCGAATACTTTTGCCCTGCCAATACAGATGCAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCCTGAATGGG
AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCGTTACCGGCTCTGCGTACCATTGATGGTAAAAATACTACTTTAATACGATACAGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAAACGGGAAAAATACTATTTTAAACACAAATACAGCATTGCCTCAACGGGTTATACCATTATT
TCGGGTAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTTGAATATTTTGGCGCTGCG
AACACTGATGCGAAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTCGAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAAAATTTCTATTTTCGCAACGGCTCTGCCGAGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
GCGAATACGCGACGCAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCTGTTATCAAAACCGTTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCGGATACCGCCATGGCAGCAGCGGTGGT
CTGTTTGAATATGATGGCGTGATCTATTTTTTGGTGTGGATGGTGTAAAGCAGTTACCGGCTTTGTGACCGTGGGTGATGATAAATAC

TATTTCAATCCGATTACCGTGGTGCAGCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAACTATTATTTCAACAGAGCGGTGTGCTG
CAGACCGGTGTGTTTAGCACCGAAGATGGCTTTAAATATTTTGGCCAGCGAACACCTGGATGAAACCTGGAAGCGAAGCGATTGAT
TTTACCGGCAAACTGATCATCGATGAAAACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTGCGGTGAATGGAAGAAGTGGATGGCGAA
ATGCACTATTTTTCTCGGAAACCGGTAAAGCGTTTAAAGGCTGAACAGATCGGCGATTACAAATACTACTTCAACAGCGATGGCGTG
ATGCAAGAAAGCGTTTGTAGCATCAACGATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGGCTATACCGAAATTGATGGC
AAACATTTCTACTTCGCGGAAACGGCGAAATGCGATTTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGTTTCAAATACCTTCGCGCACCATAACGAA
GATCTGGGTAAAGAAAGGCGAAGAAATAGCTATAGCGGCATCTGAACTTCAACAACAAATCTACTACTTTGATGATAGCTTTACC
GCGGTGGTGGGCTGGAAGATCTGGAAGATGGCAGCAATATTATTTTCGATGAAGATACCGCGAAGCGTATATTGGCCTGAGCCTGATT
AACGATGGCCAGTACTATTTAACGATGATGGCATTATGCAAGTGGGTTTCTGTGACCATTAATGATAAAGTGTCTATTTTCAGCGATAGC
GGCATTATTGAAAGCGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTGCAGATCGCGGTTTTTGATACC
AGCGATGGCTACAAATATTTTCGACCGGCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAATATAGCGGTCTGGTGCGTGTG
GGCGAAGATGTGATATTATTTTCGCGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATATGGAAAACGAAAGCGATAAATATTACTTT
AATCCGAAACGAAAAAGCGTGCAGAGCATTAACCTGATCGATGATATCAATACTATTTTGATGAAAAAGGCATTATGCGTACCGGT
CTGATTAGCTTCGAAAAACAACACTATTACTTCAACGAAACCGGTGAAATGCAGTTCGGCTACATCAACATCGAAGATAAAATGTTCTAC
TTCGGCGAAGTGGTGTATGCGAGATTGGTGTTTTTAACACCCGGATGGCTCAAACTACTTTGCCCATCAGAAATACCTGGATGAAAAAT
TTCGAAGGTGAAAGCATTAACATATACCGGCTGGCTGGATGAAAAACGCTACTACTTACCGATGAATACATTCGCGCGACCGGC
AGCGTGATTATTGATGGCGAAGAATACTACTTCGATCCGATACCGCGAGCTGGTATTAGCGAACATCATCATCACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQN
EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESK
MVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAIQVQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTI
DGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGTYSINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIE
GQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASGTYTIISGKHF
YFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAAATGWVITIDGNRYFEPNTAMG
ANGYKTIIDKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLGLKIYYFGNNSKAVTGWQTINGK
VYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVYIFFVGVDGKAVTGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDKNYYFNQSGVLQTVGF
STEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNIGDYKYYF
NSDGMVQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDEGFKYFAHHNEDLNAGEEIESYSGI
LNFNNKIYYFDDSFYVVGWKLDEGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIES
GVQNTDKNYFYIDNGLVQIGVFDTSBGKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGTWIDMENES
DKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDEGVMQIGVFNTP
DGFYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLEKRYFTDEYIAATGSVIDGEEYFDPDTAQLVISEHHHHHH

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATATATTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTAACAAC
 GGCAAAACACTTTTATTTTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCACCGGCAAAAT
 ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCCTGAACGGCAAAAAATACTACTTTTGGCAGCGAT
 AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTATCTGTGCACC
 ATTAACAACGACAAATATTTATTTAGCTATGACGGTATTTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACCTTTTATTTTCGATGCC
 AACAAACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTGGAGTATTTGCGTCCGGCAACACCCATAATAACAACATT
 GAAGGTCAGGCGATCGTTTATCAGAACAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTTCGATAATGACAGCAAAAGCGTGACCGGC
 TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCGGTTGGCAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
 TACTTCAACCTGAACACAGCCGAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAATACTATTTCAACACCAACACCTTTATTGCA
 TCTACCGGTTATACAGCATTAAACGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTTCAAAGGTCCAAATGGT
 TTCGAATACTTTGCCCTGCCAATACAGATGCAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCCTGAATGGG
 AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGCTCTGCGTACCATTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
 GTTTCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGGAAAAAATACTATTTTAAACACAAATACCAGCATTGCCTCAACGGGTATACCATTATT

 TCGGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTCGAATATTTTTCGCGCTGCG
 AACACTGATGCGAAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
 AATTCAAAGCAGCCACCGGCTGGGTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTCGAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAAATGGCTACAAA
 ACCATCGATAATAAAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCGCGAGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
 GCGAATACGGACGCAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCTGTATCAAACCGTTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTGGC
 AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGGATACCGCCATGGCAGCAGCCGGTGGT
 CTGTTTGAATTTGATGGCGTGATCTATTTTGGTGTGGATGGTGTAAAGCAGTGAGCGGTCGTGATTATATTAACGATAGCCGTGTAT
 TACTTTAAACCACCGGTGAATAACCTGATTACCGGCTTTGTGACCGTGGGTGATGATAAATACTATTTCAATCCGATTACCGTGGTGCA
 GCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAACTATTATTTCAACGAGCGGTGTGCTGCAGACCGGTGTGTTTAGCACCGAAGAT
 GGCTTTAAATATTTTTCGCGCAGCGAACACCCCTGGATGAAAACCTGGAAGGCGAAGCGATTGATTTTACC GGCAACTGATCATCGATGAA
 AACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTTCGGTGGAAATGGAAGAACTGGATGGCGAAATGCATTATTTTCTCCGGAACCGGT
 AAAGCGTTTAAAGCGCTGAACAGATCGCGGATTACAAATACTACTTCAACAGCGATGGCGTGATGCAGAAAGCGTTGTGAGCATCAAC
 GATAACAAACACTATTTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGGCTATACCGAAATGATGGCAACATTTCTACTTCGCGGAAAACCGGC
 GAAATGCAGATTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGTTTCAAATACTTCGCGCACCATTAACGAAGATCTGGGTAAACGAAGAGCGCAAGAA
 ATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACCTCAACAACAAATCTACTACTTTGATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGGCTGGAAAGATCTGGAA
 GATGGCAGCAATATTTATTCGATGAAAGATACCGCGGAAGCGTATATTGGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAACGAT
 GATGGCATTAATGACAGTGGGTTCGTGACCATTAATGATAAGTGTCTATTTTCAGCGATAGCGGCATTATTTAAAGCGCGCTGCAGAAC
 ATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTTGTGCAGATCGGCGTTTTTGATACCAGCGATGGCTACAAATATTTTCGACCGG
 GCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGCGGTGGAATATAGCGGTCTGGTGCCTGTGGCGAAGATGTGTATTATTTTCGCGCA
 ACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTATGATATGGAAAACGAAAGCGATAAATATTACTTTAATCCGGAACGAAAAAGCGTGCAAA
 GGCATTAACTGATCGATGATATCAAACTACTTTTGGATGAAAAAGGCATTATGCGTACCGGTCTGATTAGCTTCGAAAACAACAACTAT
 TACTTCAACGAAACCGGTGAAATGCAAGTTCGGCTACATCAACATCGAAGATAAATGTTCTACTTCGGCGAAGATGGTGTATTGCAGATT
 GGTGTTTTTAAACACCCCGGATGGCTTCAAACTACTTTGCCCATCAGAAATACCTGGATGAAAAATTCGAAGGTGAAAGCAATTAACATATACC
 GGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTACCAGATGAATACATTGCGGCGACCGGCAGCGTGATTATTGATGGCGAAGAATAC
 TACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTATTAGCGAACATCATCATCAACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQN
 EFLTINLGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAAHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESK
 MVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTINLGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTI
 DGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIE
 GQAILYQNKFLTINLGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASSTGYTIIISGKHF
 YFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMG
 ANGYKTIDNKNFYFRNLPIQGVFKGSGNPFYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLHLHLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGK
 VYFMPD TMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLTIGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGE
 TIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNRYGAVEWKELDGEMHYF
 FAEHNEDLGNEEGEISYSGILNFNKIIYFFDSTFAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQ
 VGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIDNFIYIDNNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQGAVESGLVRVGEDV
 YYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYFDEKGMRTGLISFENNNYYFNENGENMQFYINI
 EDKMFYFEGDGMQIGVFNTPDGFKYFAHQNLIDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPD
 TAQLVISEHHHHHH

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAAC
 GGCAAAACACTTTTATTTTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCACCGGCAAAAT
 ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCCTGAACGGCAAAAAATACTACTTTGGCAGCGAT
 AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACC

 ATTAACAACGACAAATATTATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAAATGGGTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTTTCGATGCC
 AACCAACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTGTAGTATTTTCGCTCCGGCAAAACCCCATATAACAACATT
 GAAGGTGAGCGATCGTTTATCAGAACAAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAGCGGTGACCGGC
 TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAAGCAGCAACCGGTTGGCAAAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
 TACTTCAACCTGAACACAGCCGAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAATAAAATACTATTTCACACCAACACCTTTTATTGCA
 TCTACCGGTTATACAGCATTAAACGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTTCAAAGGTCCAAATGGT
 TTCGAATACTTTTGGCCCTGCCAATACAGATGCAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCCTGAATGGG
 AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGCTCGGTACCATTTGATGGTAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
 GTTTCGGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAAACGGGAAAAATACTATTTTAAACACAAATACCAGCATTGCGCTCAACGGGTTATACCATTATT
 TCGGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTTCGAATATTTTGCAGCTGCG
 AACACTGATGCGAAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
 AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTCGAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAAATGGCTACAAA
 ACCATCGATAATAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCCGCGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
 GCGAATACGGACGCGAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCTTATCAAACCGTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTTGGC
 AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGGATACCGCCATGGCAGCAGCCGGTGGT
 CTGTTTGAATATGATGGCGTGATCTATTTTGGTGTGGATGGTGTAAAGCAGTGAAAGGCCTGAACAGATCGCGGATACAAATAC
 TACTTCAACAGCGATGGCGTGATGCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTG
 GCGTATACCGAAATGATGGCAACATTTCTACTTCCGCGAAACGGCGAAATGCAGATTGGCGTGTTCATACCGAAGATGGTTTCAA
 TACTTCCGCGCACCATAACGAAGATCTGGGTAAAGAGGCGAAGAAATTAGTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAACAAATCTAC
 TACTTTGATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAAATATTATTTCGATGAAGATACCGCGGAAGCG
 TATATTGGCCTGAGCCGTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAAACGATGATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAAATGATAAA
 GTGTTCTATTTCAGCGATAGCGGCATTATTGAAAGCGGCGTGCGAACAATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTG
 CAGATCGCGGTTTTTGATACAGCGATGGCTACAAATATTTTCGACCGGCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAA
 TATAGCGGTCTGGTGGCTGGGGCAAGATGTGTATTATTTTCGCGGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTATGATATGGAAGAA
 GAAAGCGATAAATATTACTTTAATCCGGAACGAAAAAGCGTGCAAGGCAATTAACCTGATCGATGATCAAAATACTATTTTGATGAA
 AAAGGCATTATGCGGTACCGGCTGATTAGCTTCGAAACCAACAATCTATTACTTCAACGAAACGGGTGAAATGCAAGTTCCGCTACATCAAC
 ATCGAAGATAAATGTCTACTTTCGCGCAAGATGGTGTATGCAGATTGGTGTTTTAAACACCCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCCCAT
 CAGAATACCCCTGGATGAAATTTTCGAAGGTGAAAGCATTAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCCACCGAT
 GAATACATTGCGGCGACCGGCAGCGTGATTATTGATGGCGAAGAAATACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGATTAGCGAACAT
 CATCATCATCACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLN
 GKYYFSGDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAAIIHLCTINNDKYYFSYDGILONGYITIERNNFYFDANNESKMTGVF
 KGNPFYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYY
 FNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILY
 QNKFLTLLNGKKYYFSGDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFNTDGMQ
 IMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLYLHDNIYFNGNSKAATGWVTVIDGNRYFEPNTAMGANGYKT
 IDNKNFYFRNGLPQIGVFKSGNGFYFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLHLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKVYFMP
 DTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAVKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFF
 FAENGEMQIGVNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYFDDSFYAVVGWKLDEGSKYYFDEDTAEAY
 IGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIIDNYFYIDNGIVQIGVFDTSYGKYFAPANTVN
 DNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTITETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISF
 ENNNYFNGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGMQIGVFNTPDGFYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLLDDEKRYFTDE
 YIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISEHHHHHH

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
 YQNEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
 VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
 RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
 FEYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
 VIYFFGVDGVKAPGIYG

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
 YQNEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
 VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
 RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
 FEYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
 VIYFFGVDGVKAV

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
 YQNEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
 VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
 RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
 FEYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
 VIYFFGVDGVKAV

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
 YQNEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
 NFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDG
 IMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
 VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
 RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
 FEYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
 VIYFFGVDGVKAV

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

TGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYF
DDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGV
QNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDP
DTAQLVISE

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

TGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYF
DDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGV
QNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDP
DTAQLVISE

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

SGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFTVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDG
FKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYK
YYFNSDGMQKGFVSINDNKHIFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG
FVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFT
DEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

KGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHIFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYY
FNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIDDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIY
GQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG
LISFENNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

MVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAE
 AATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPN
 GFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTING
 KKYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLYLHD
 NIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
 NNIIEGQAIYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVK
 APGIYGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPAN
 TLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGV
 MQKGFVSINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISY
 SGILNFNKIYYFDDSFYAVVGWGDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKV
 FYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYY
 FGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNEN
 GEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYI
 AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

VTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAE
 ATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPN
 FEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGK
 KYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLYLHDN
 IYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDAN
 NIEGQAIYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKA
 PGIYGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPAN
 TLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGV
 QKGFVSINDNKHFFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYS
 GILNFNKIYYFDDSFYAVVGWGDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKV
 YFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYYF
 GETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNEN
 GEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGS
 VIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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;
 - 40 c) el primer fragmento tiene un primer extremo proximal;
 - d) el segundo fragmento tiene un segundo extremo proximal; y

siendo 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:
 - 50 (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
 - (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.
- 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*.
- 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

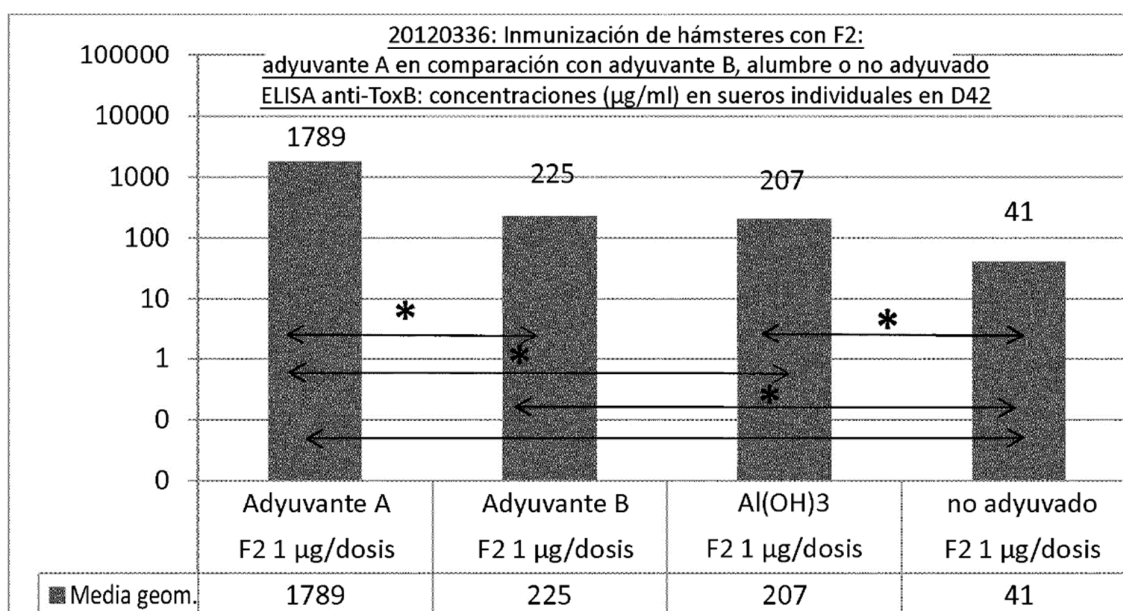
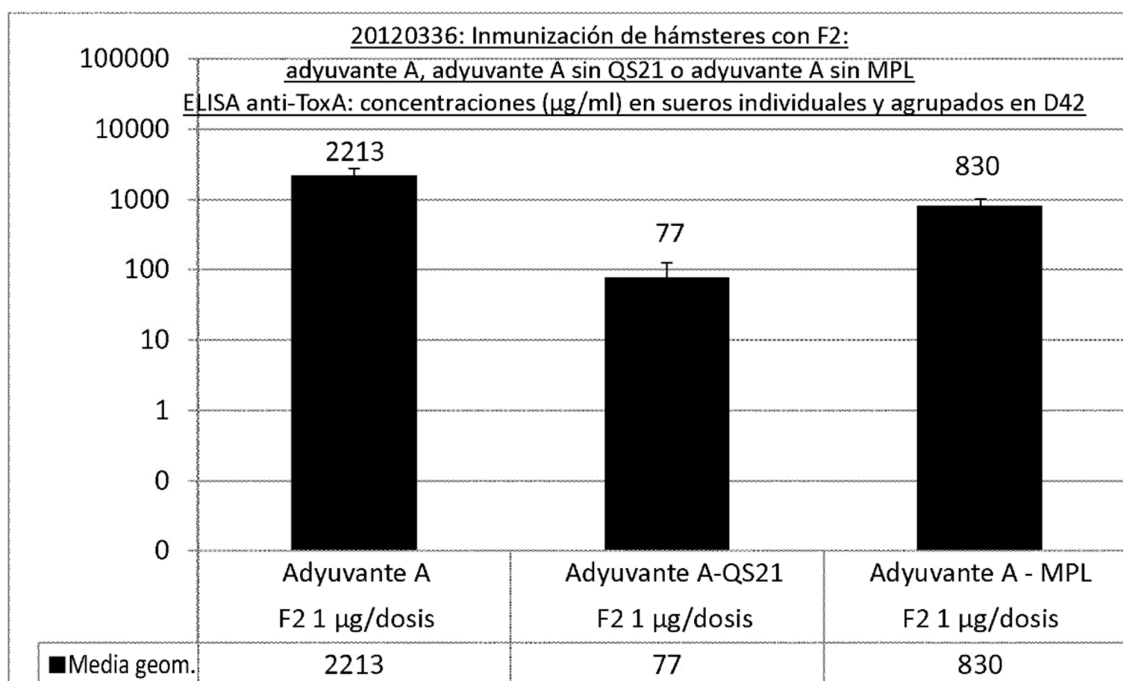


Figura 2

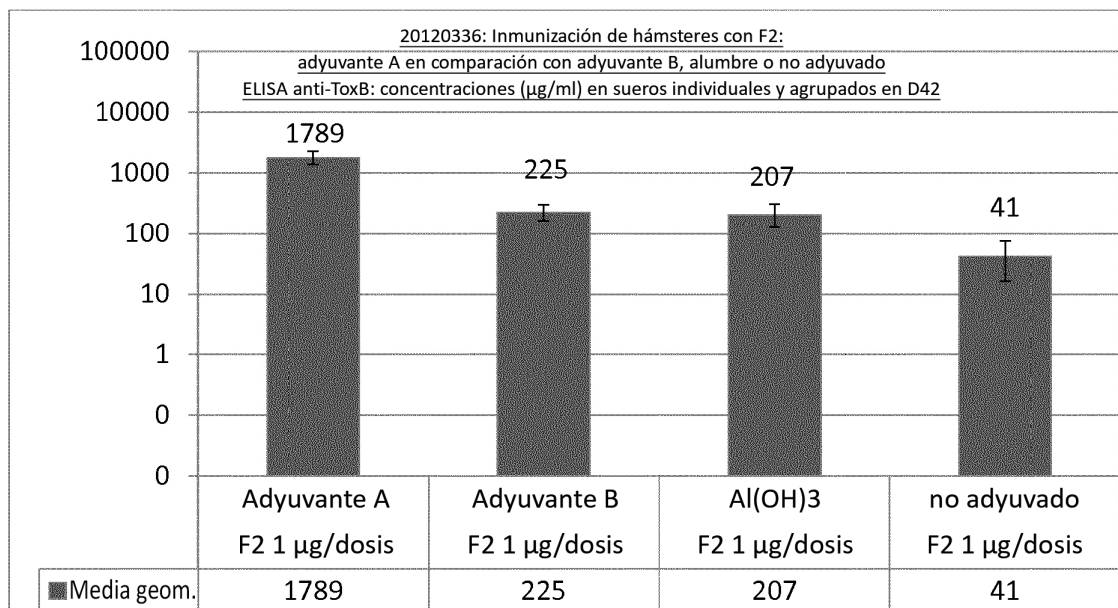
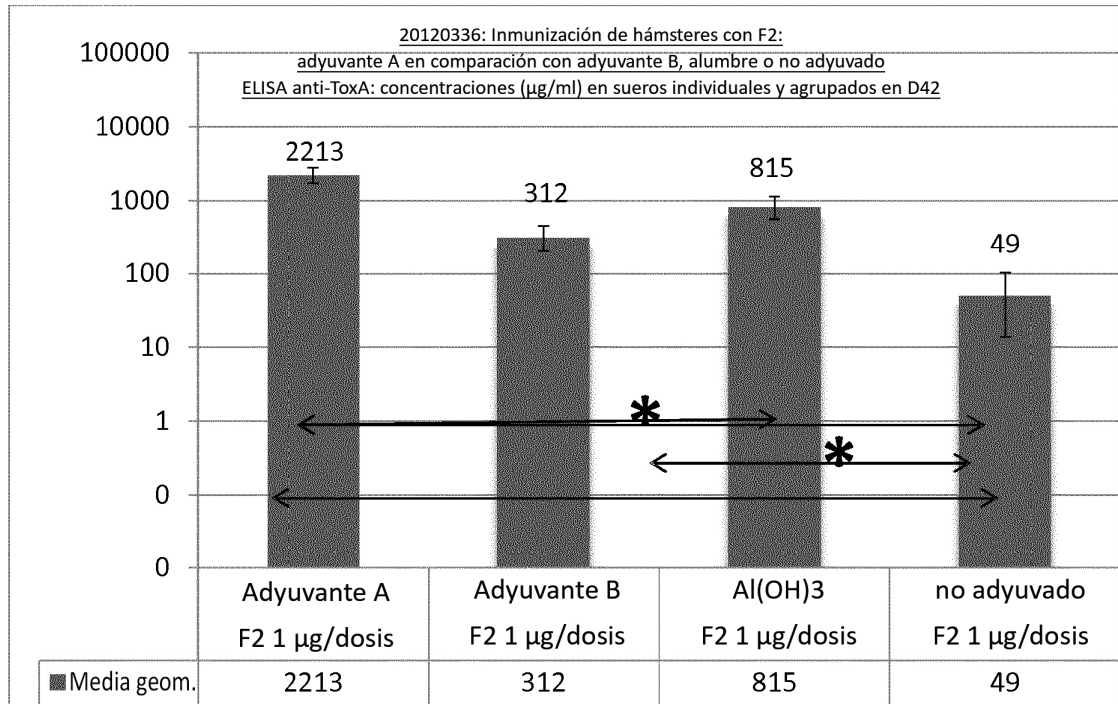


Figura 3

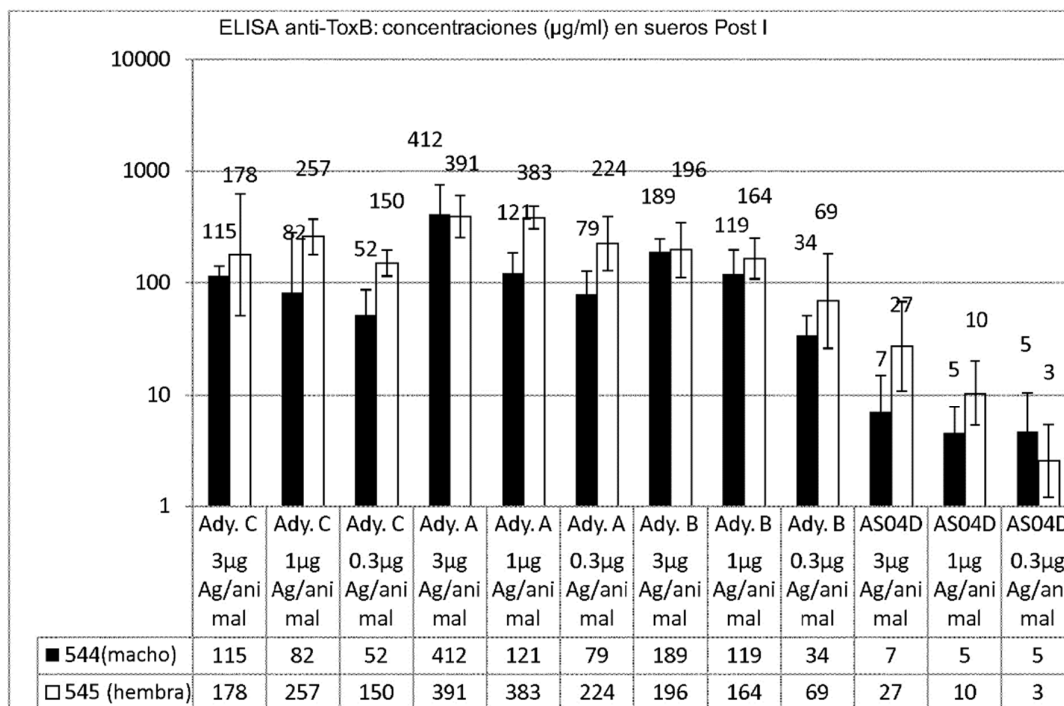
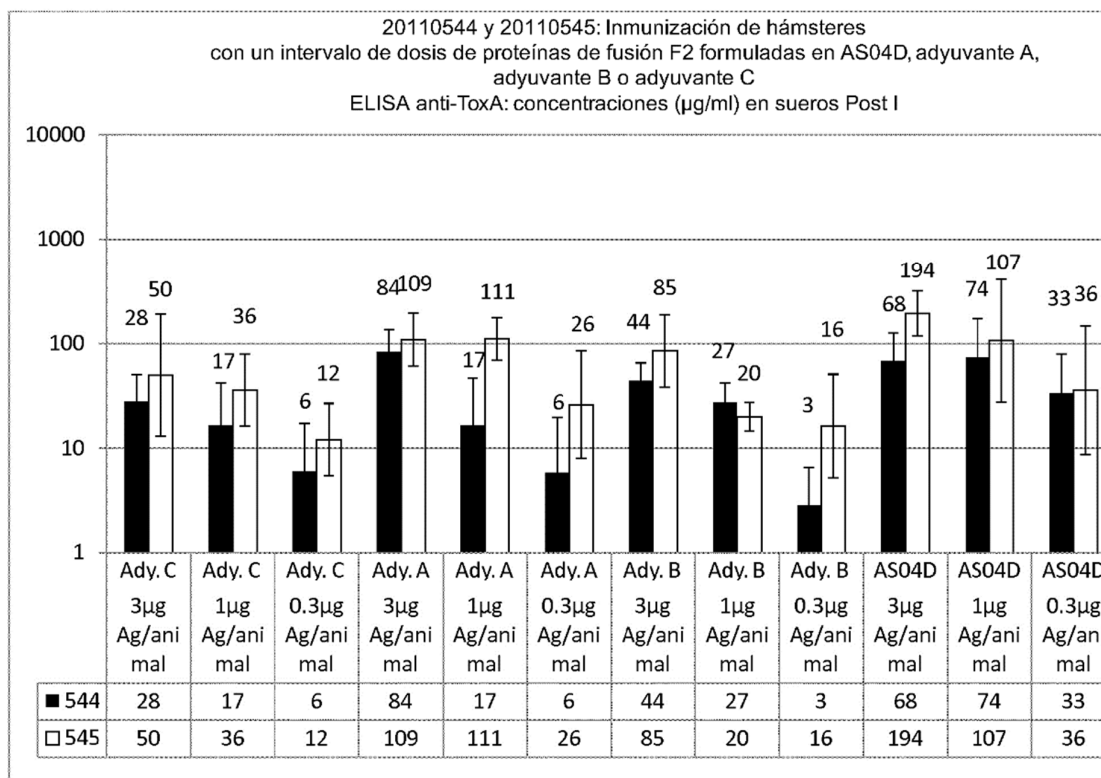
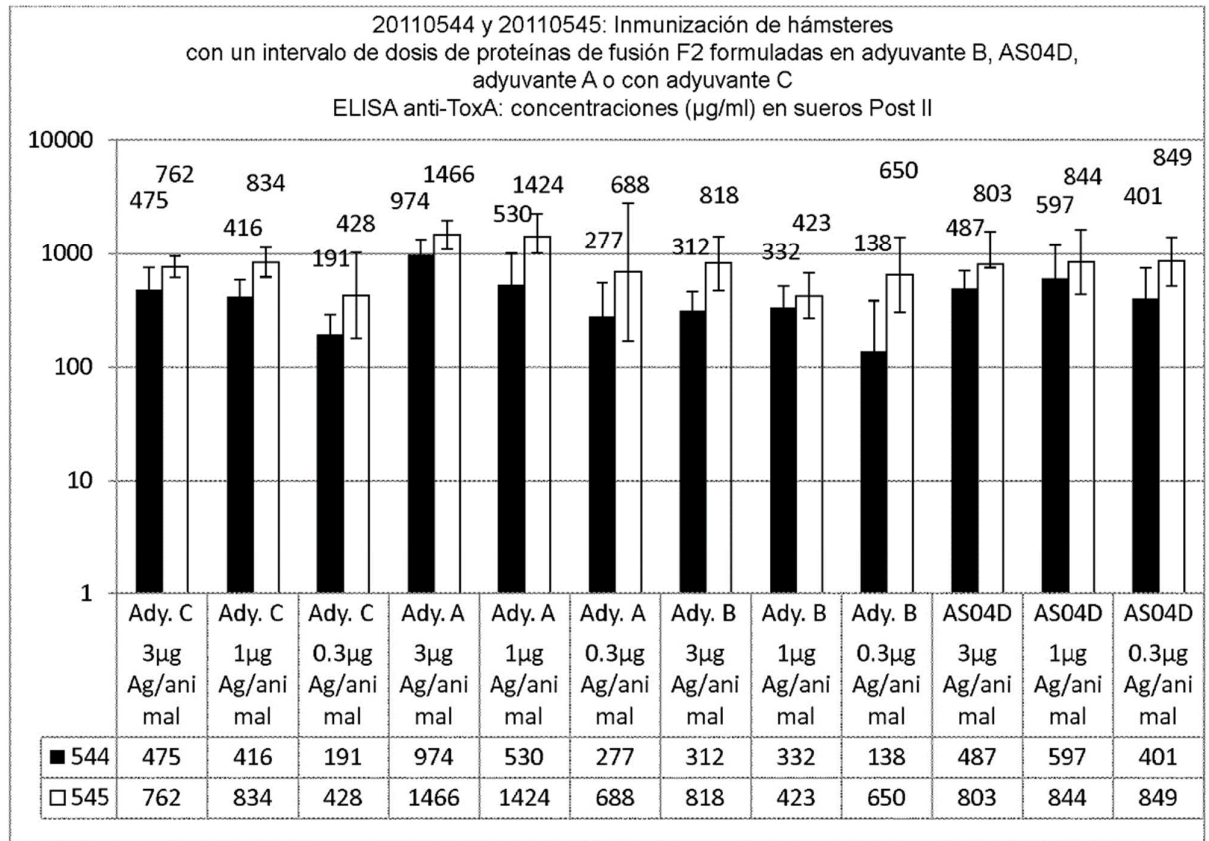


Figura 4

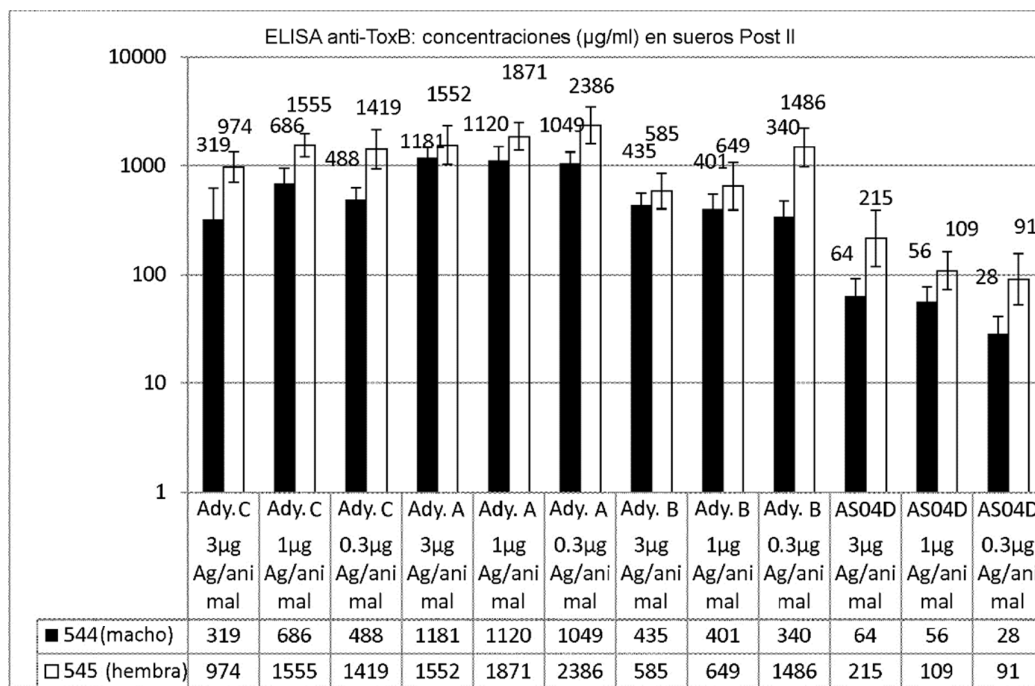
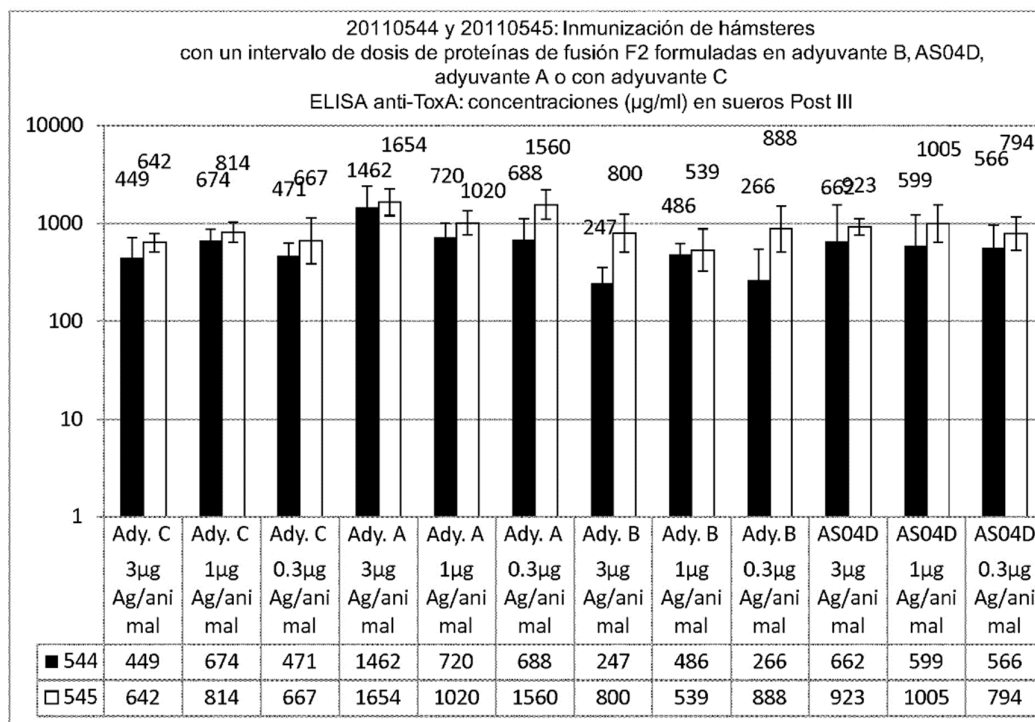


Figura 5



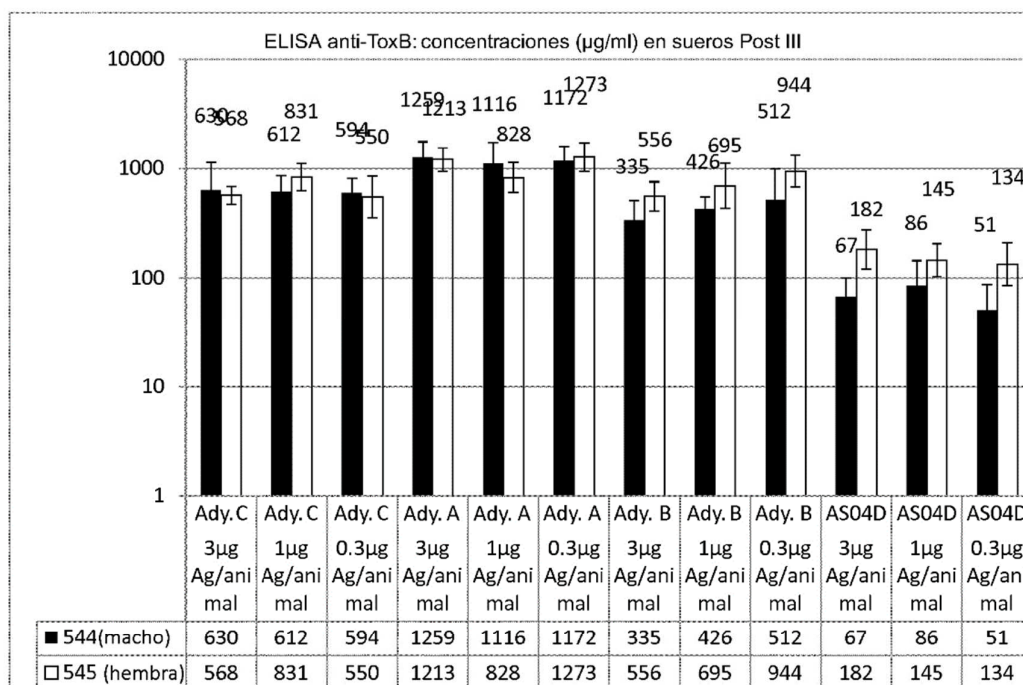
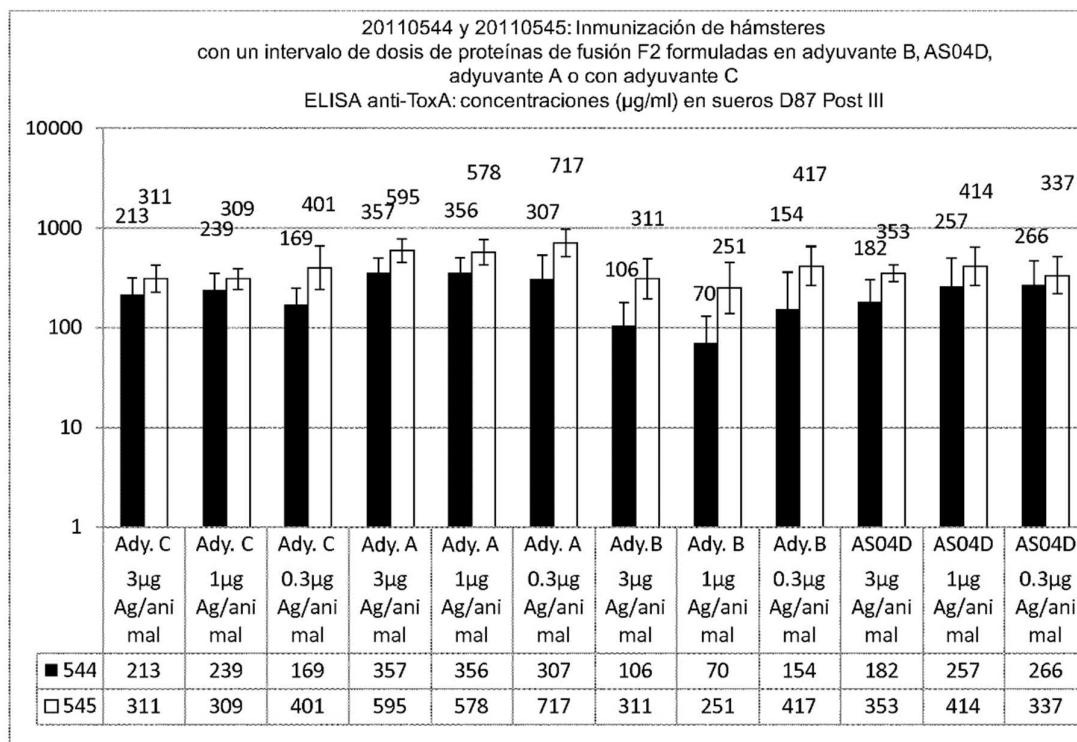


Figura 6



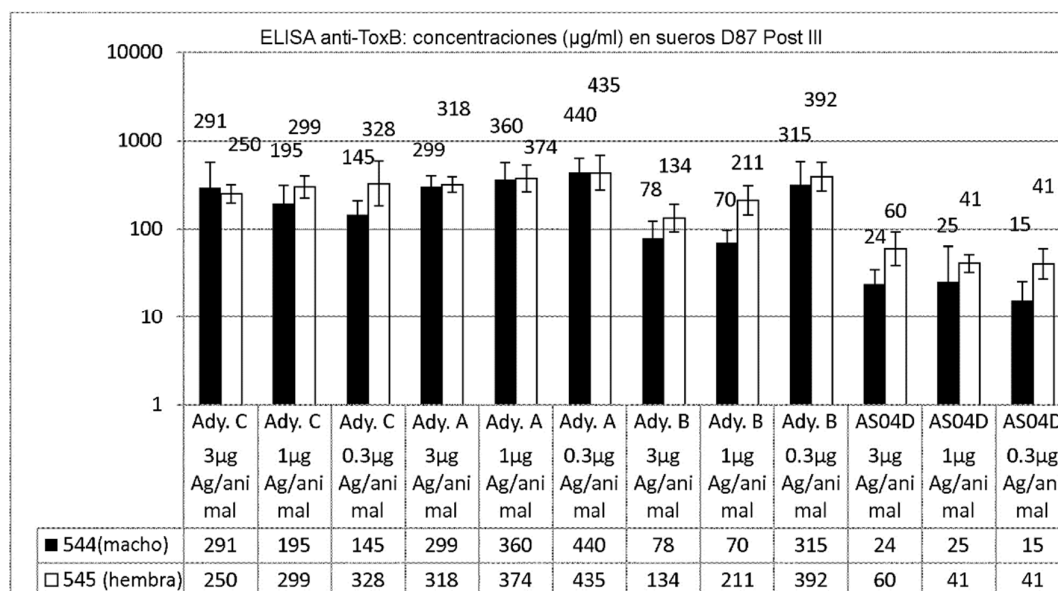
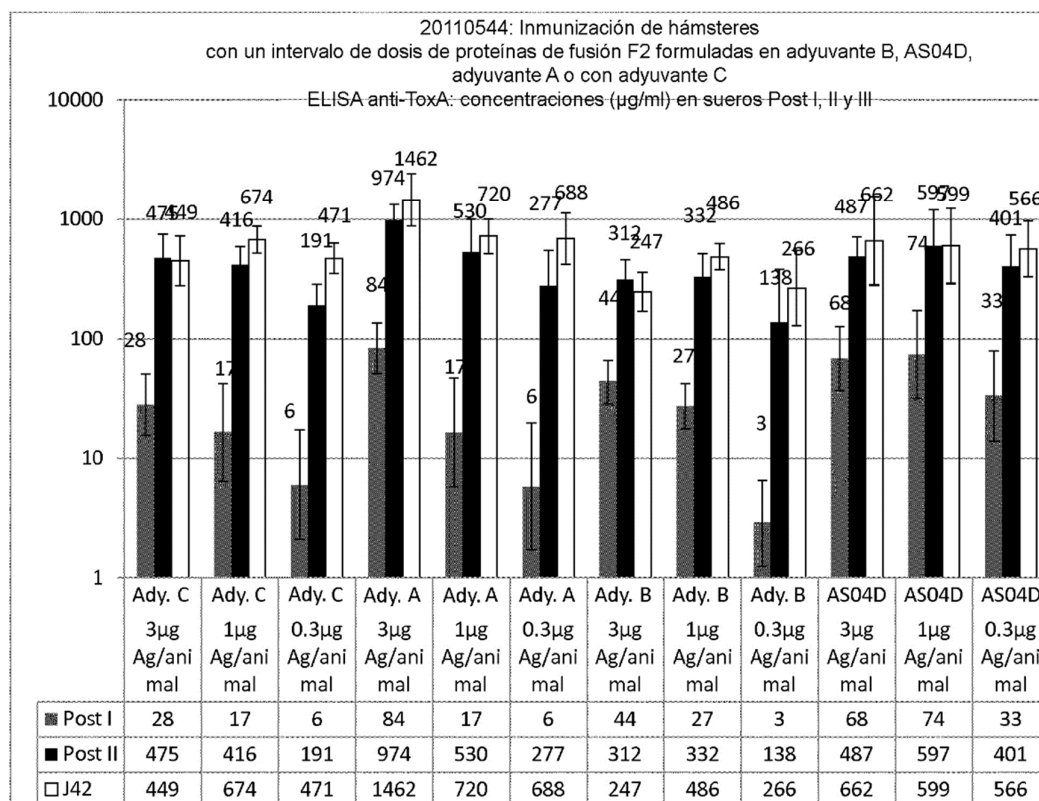


Figura 7



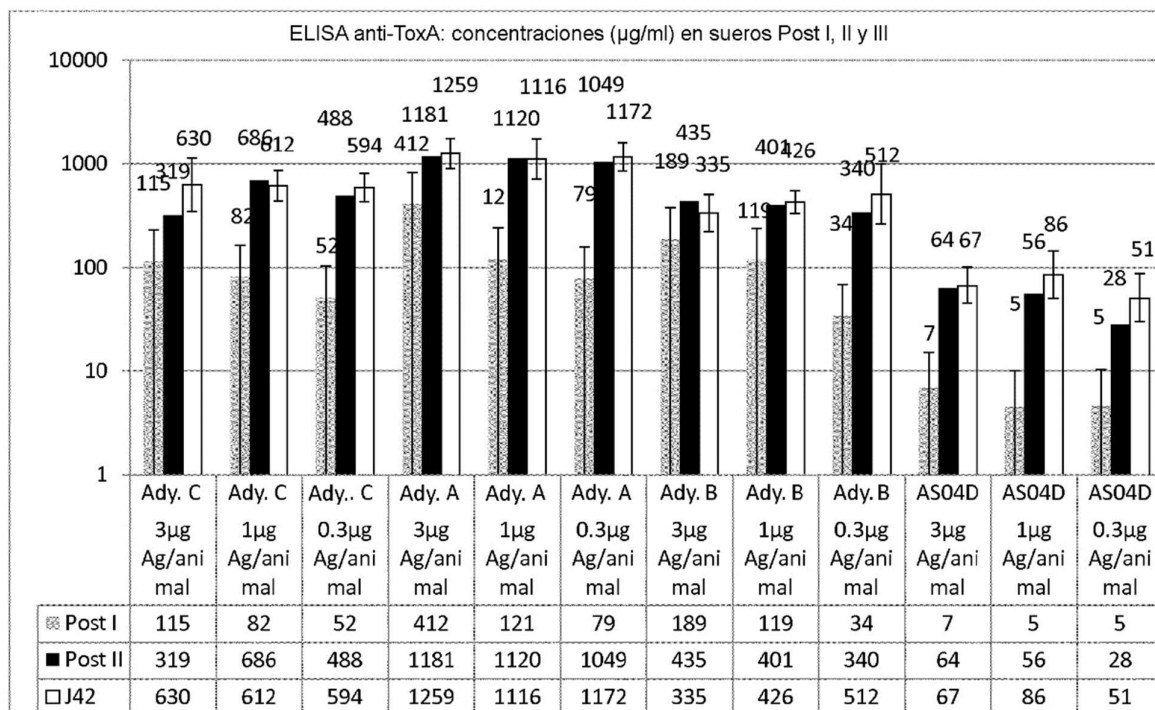
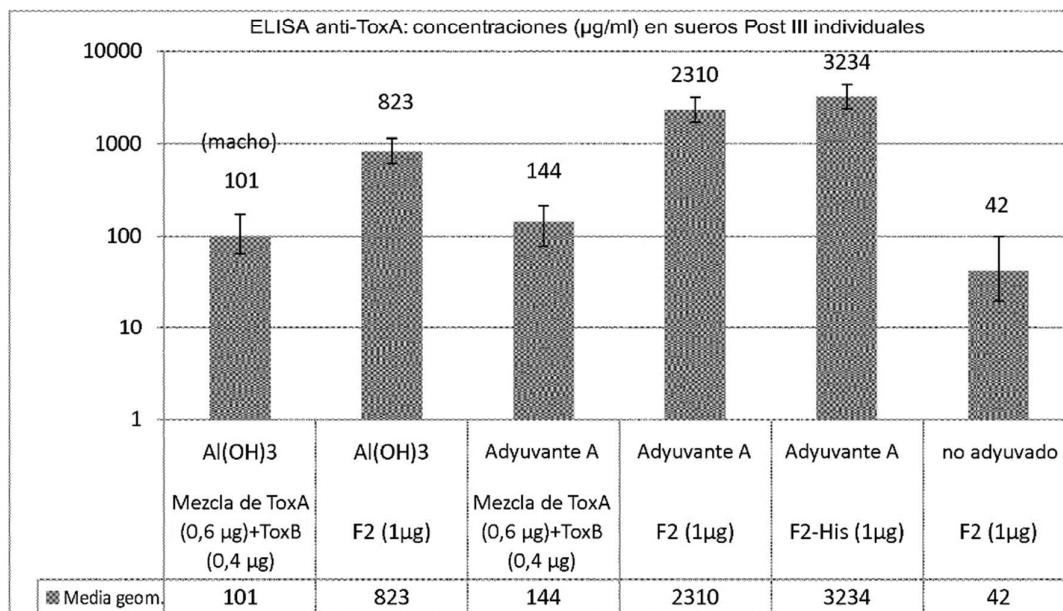


Figura 8

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



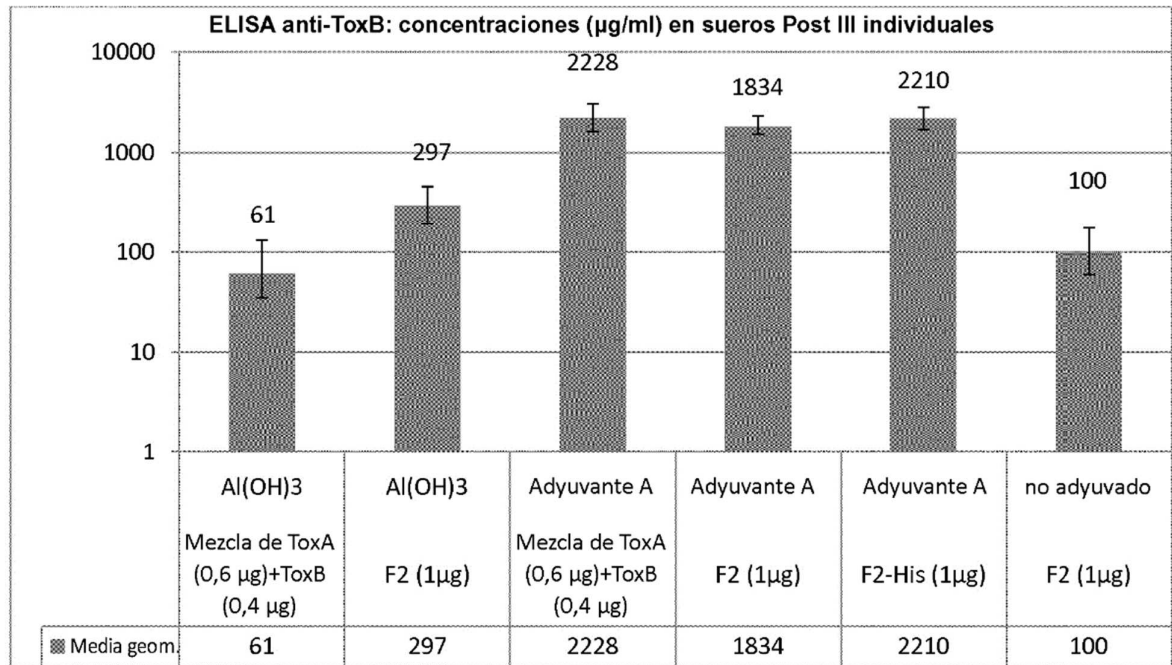


Figura 9

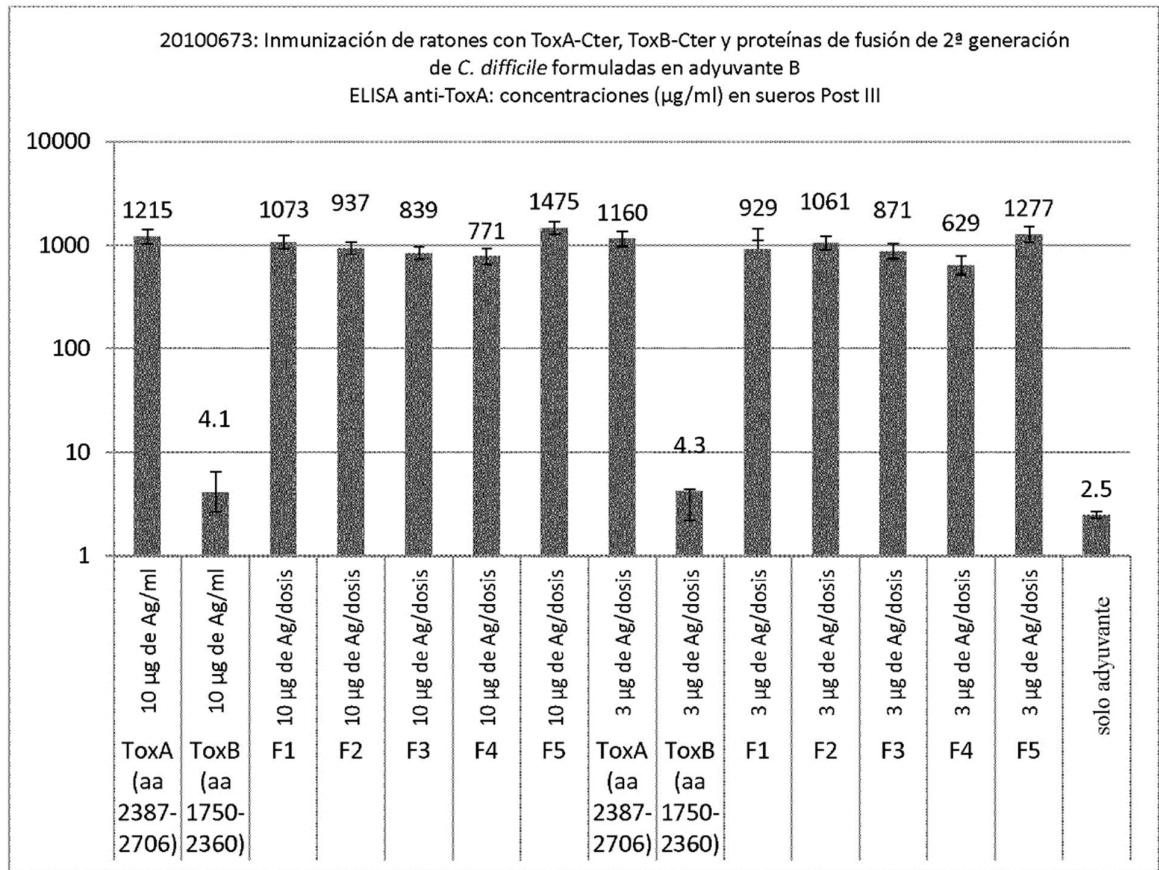


Figura 10

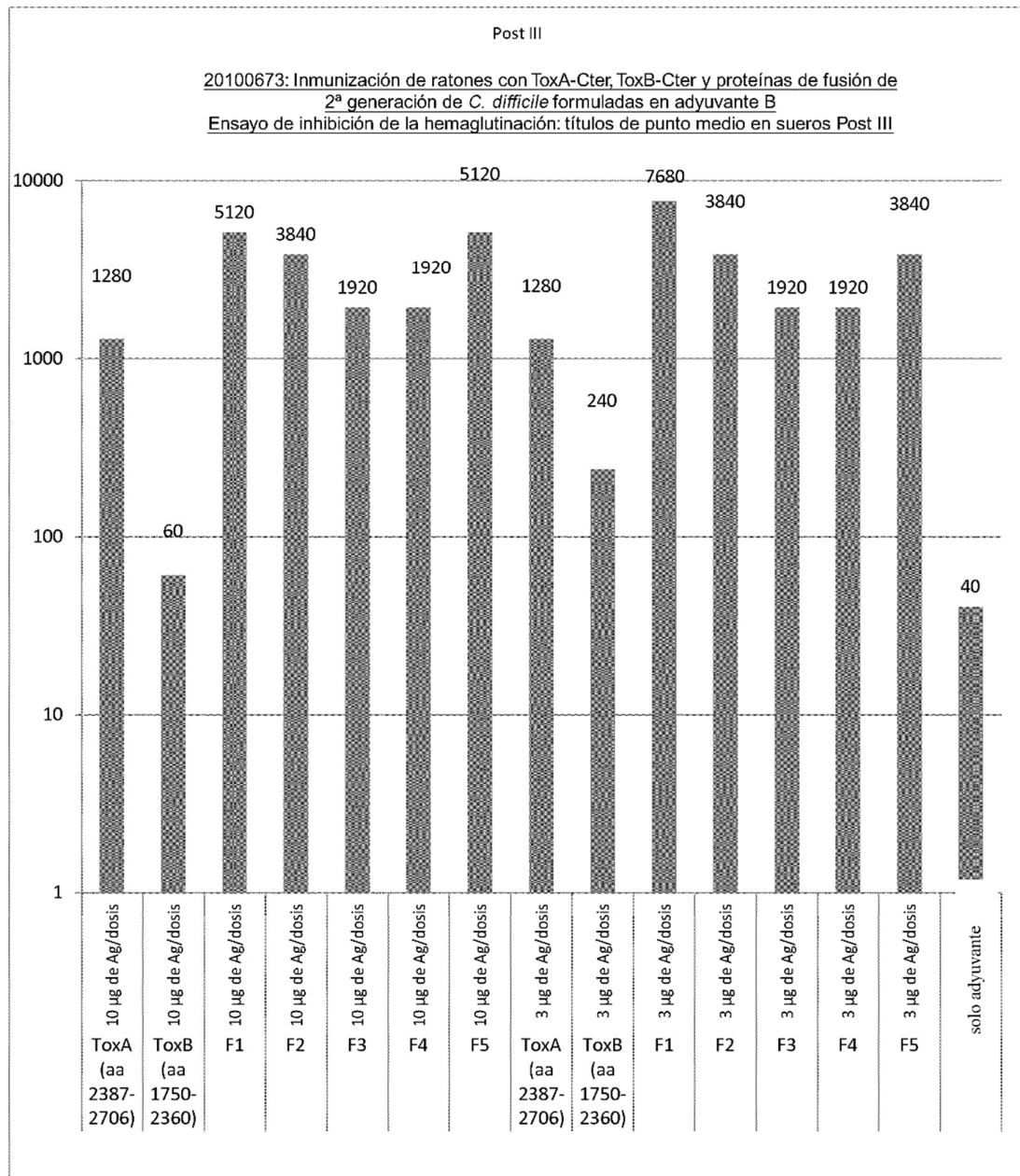


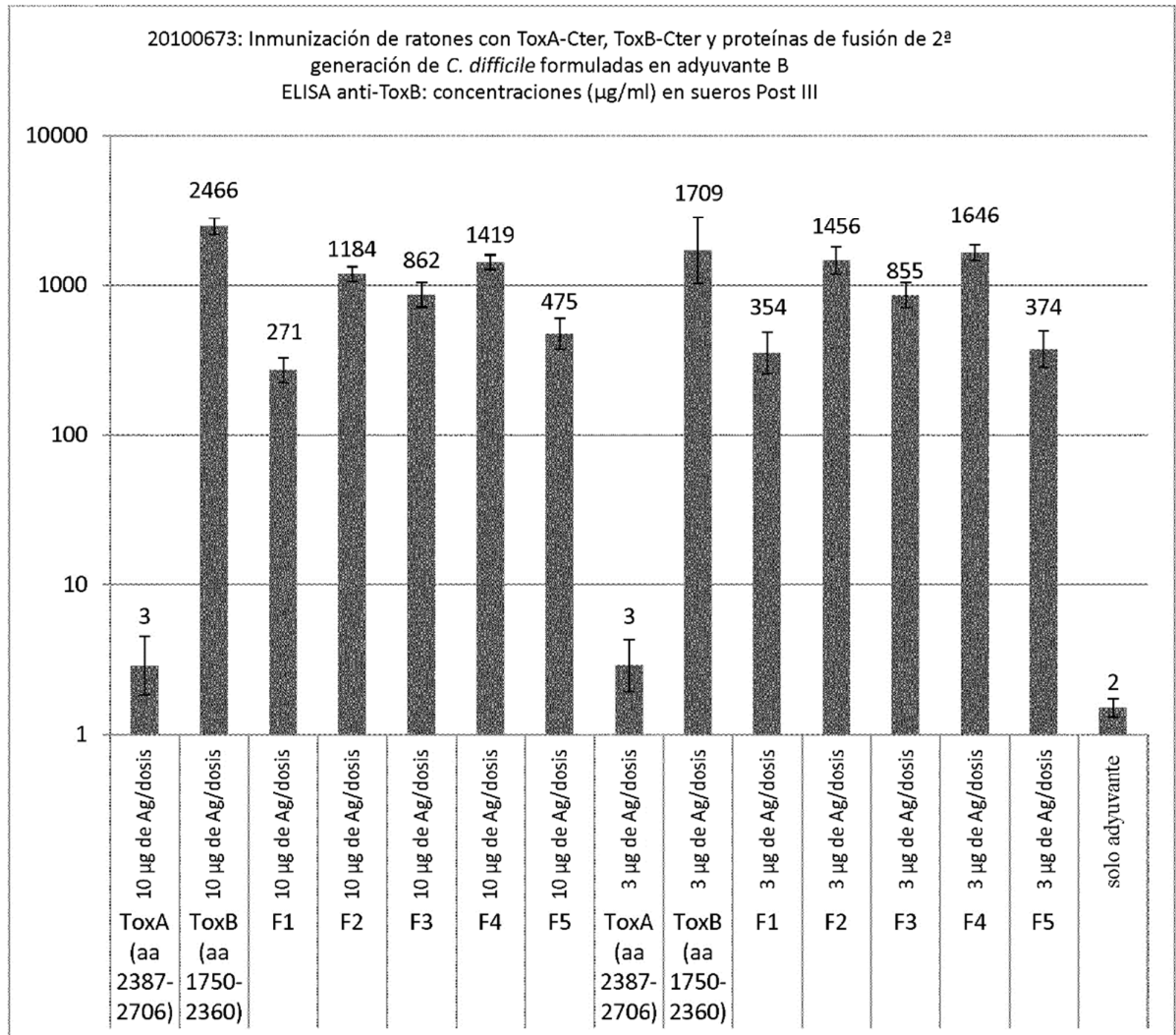
Figura 11

Figura 12

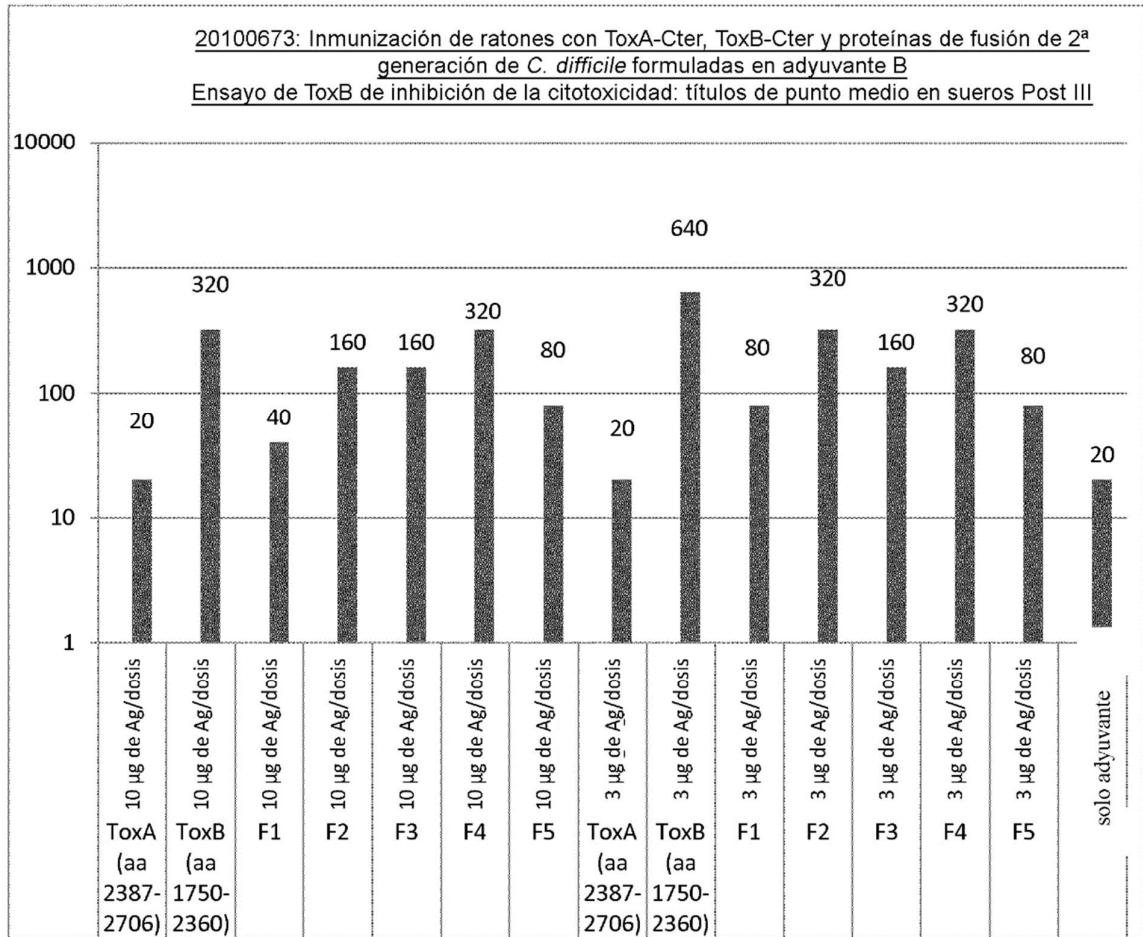


Figura 13

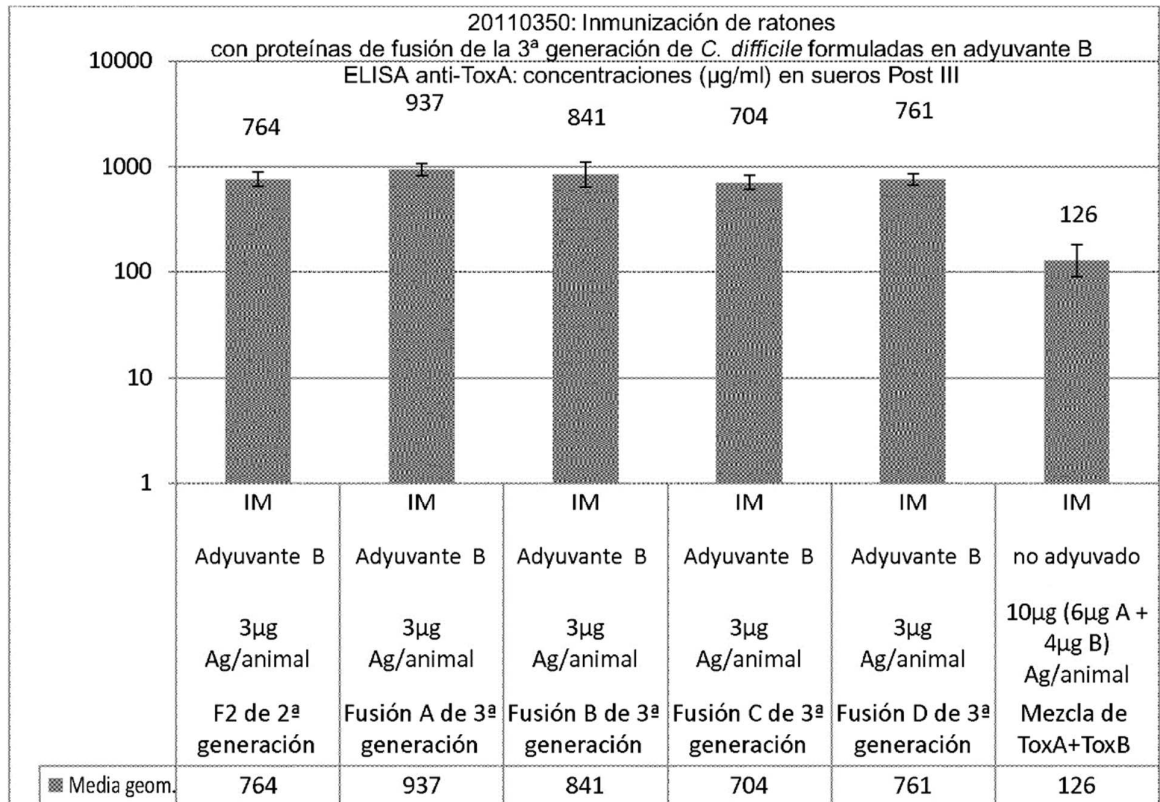


Figura 14

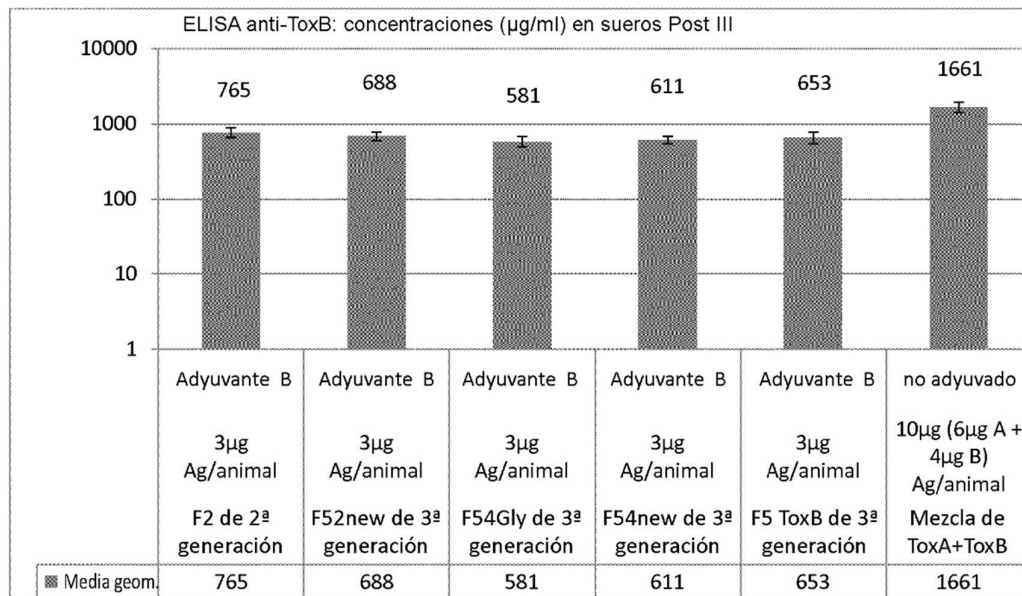


Figura 15

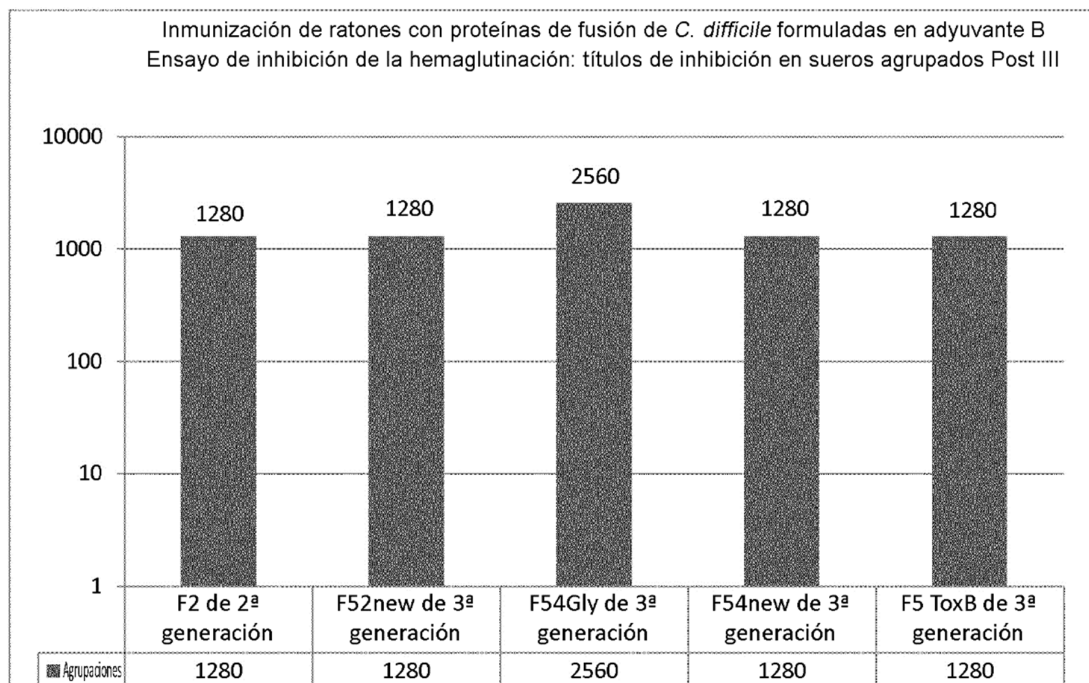


Figura 16

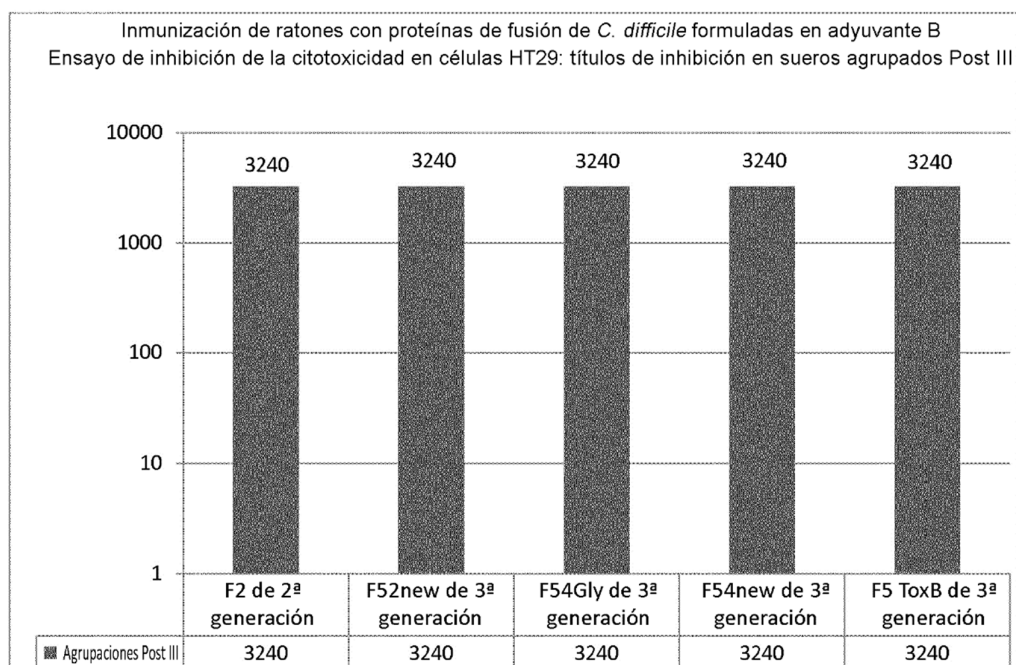


Figura 17

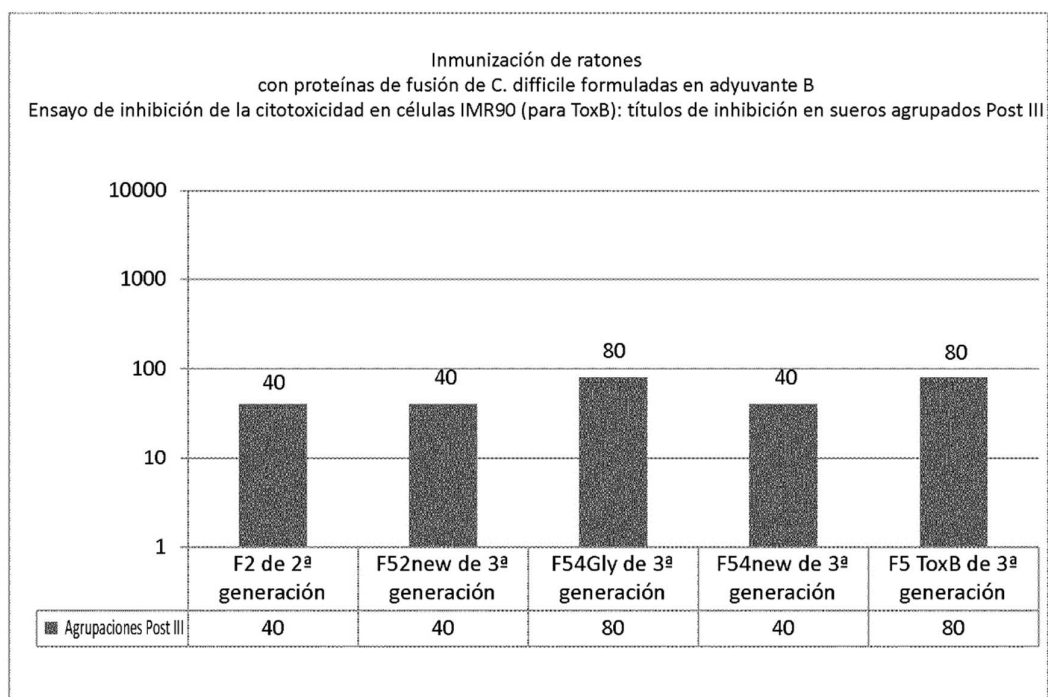


Figura 20

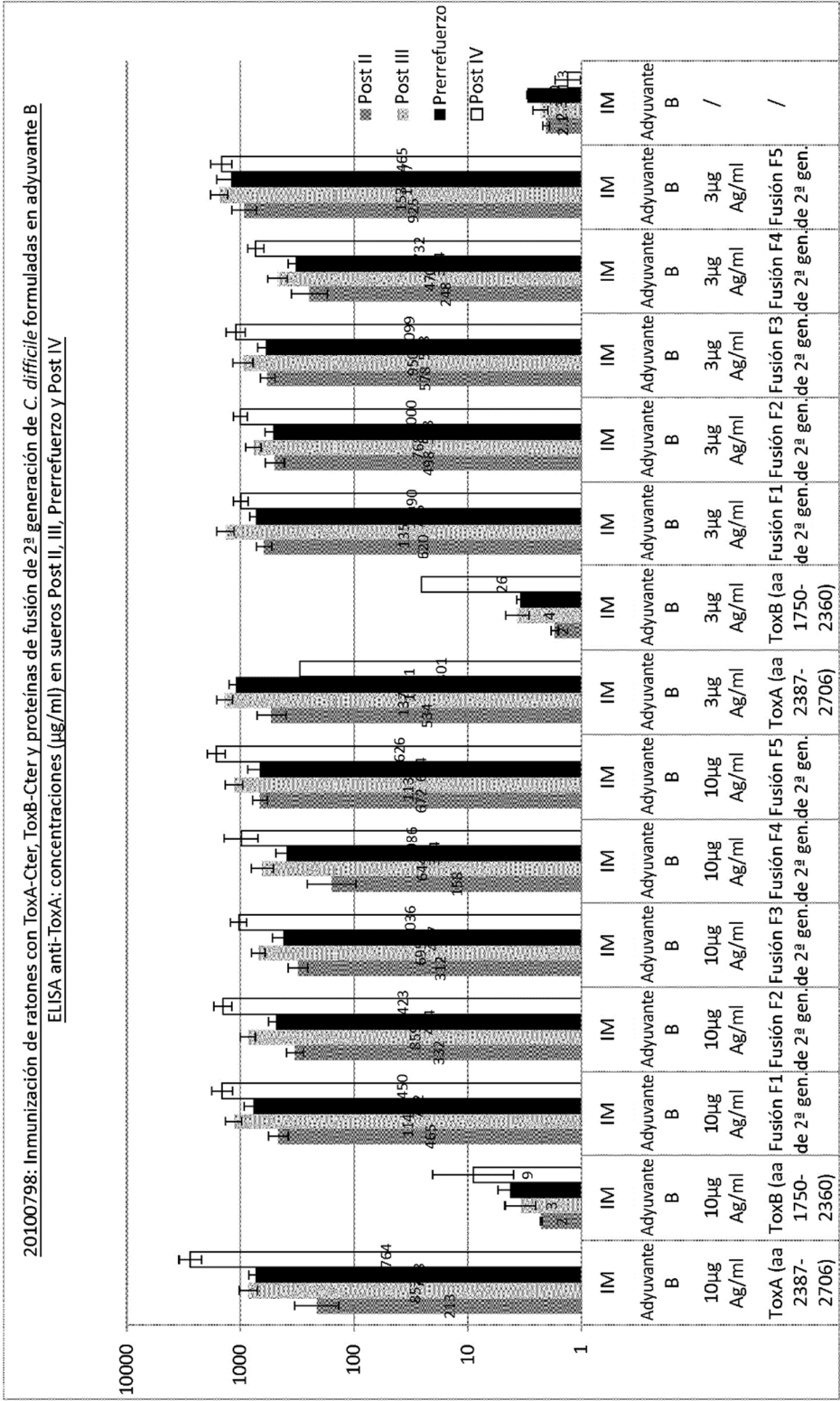


Figura 21

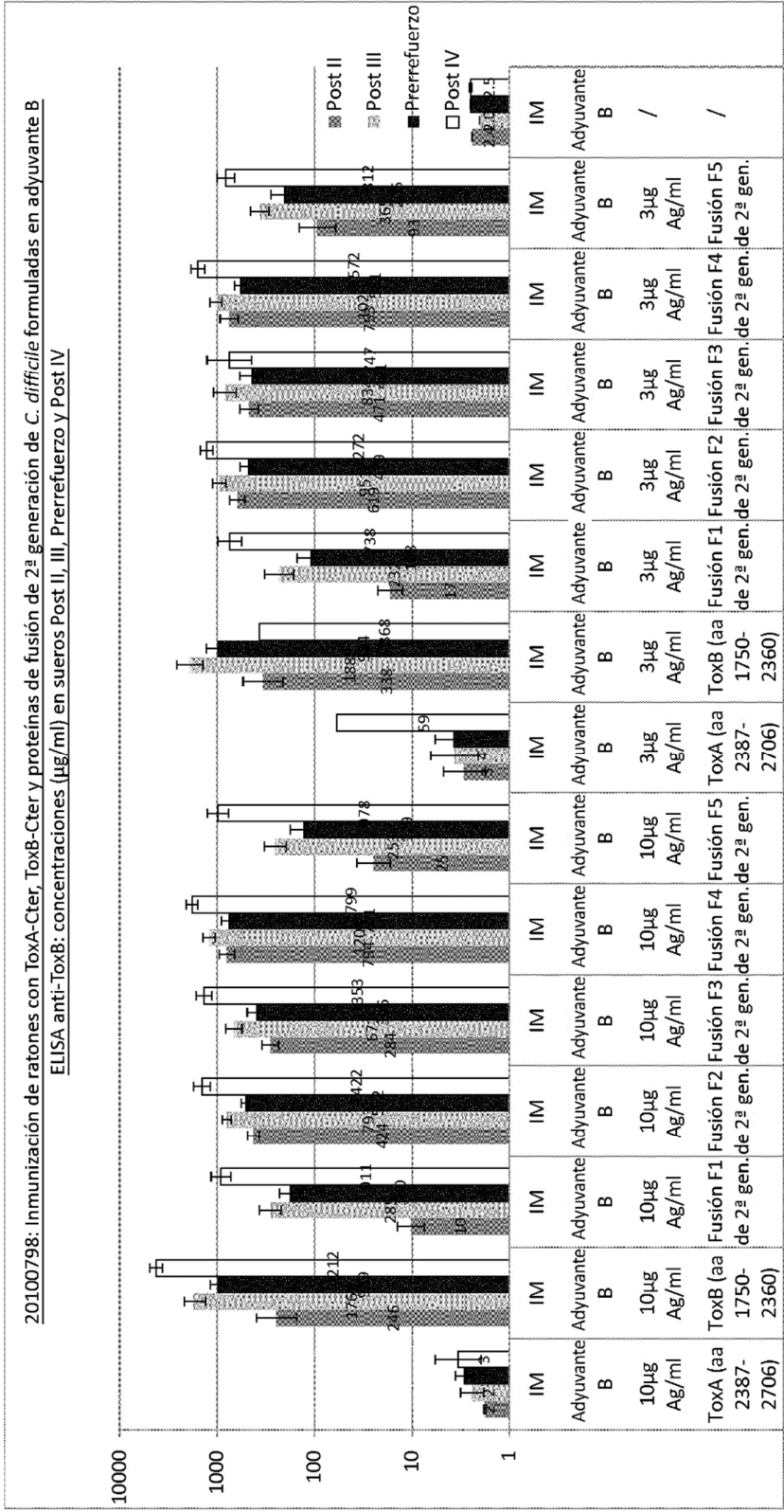


Figura 22

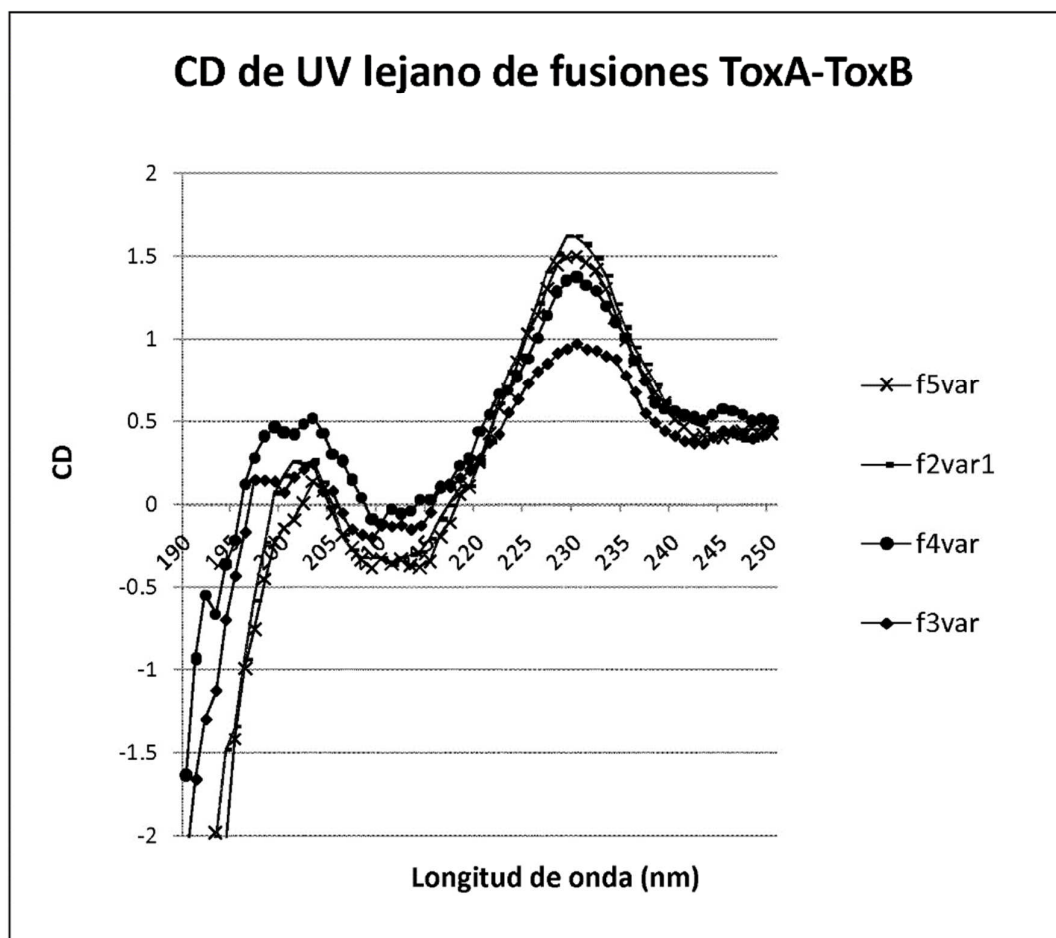


Figura 23

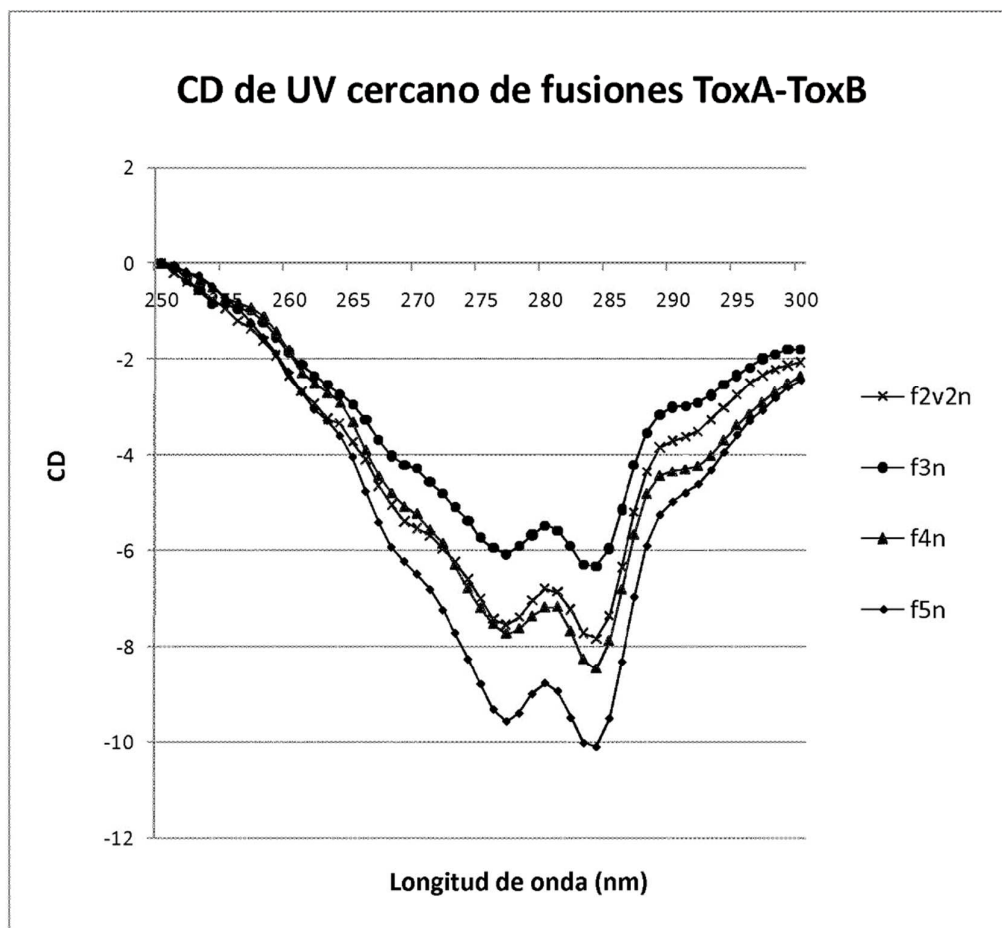


Figura 24

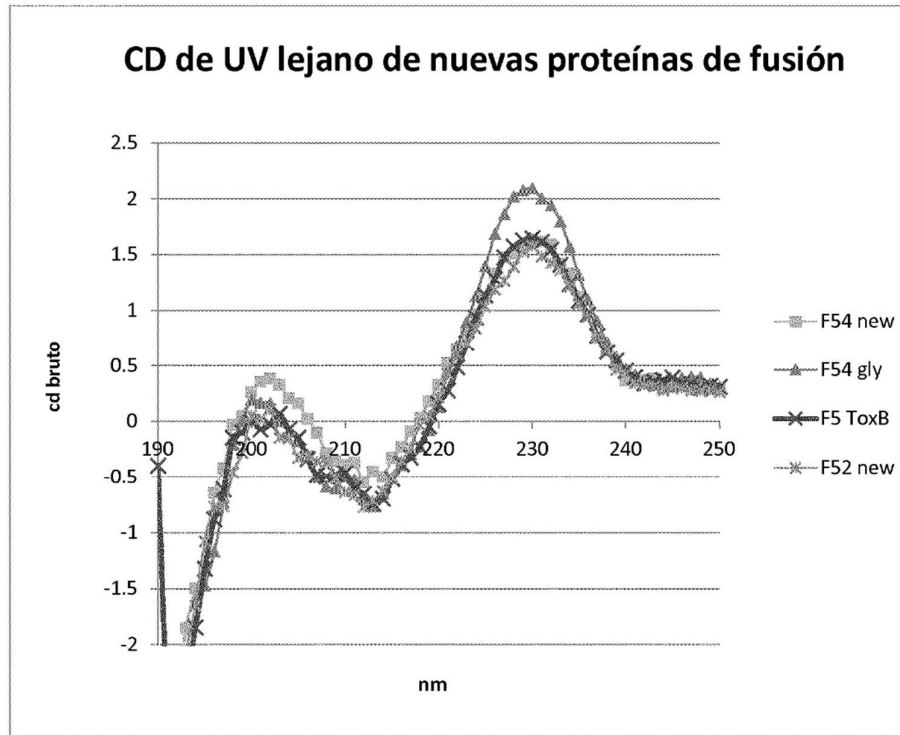


Figura 25

