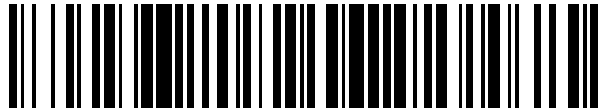


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 435**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010 E 10745031 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2411410**

54 Título: **Composiciones y métodos para examinar y usar compuestos que antagonizan interacciones espóra-superficie**

30 Prioridad:

27.03.2009 US 164154 P

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

31.08.2015

73 Titular/es:

**GOJO INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1 Gojo Plaza Suite 500
Akron, Ohio 44309, US**

72 Inventor/es:

**MACINGA, DAVID R.;
BINGHAM, JAMES EDMUND y
EDMONDS, SARAH L.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 544 435 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

Composiciones y métodos para examinar y usar compuestos que antagonizan interacciones espóra-superficie

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del control de infecciones. Particularmente, la invención se refiere a composiciones y métodos para mantener condiciones asépticas, recontaminación bacteriana y/o profilaxis de la exposición bacteriana. En una realización, la invención contempla composiciones para el control de infecciones que inhiben la unión de esporas microbianas a una superficie sustrato. Por ejemplo, la inhibición altera y/o desplaza una interacción, unión y/o estabilización de una espóra microbiana a una superficie sustrato.

Antecedentes

15 Las bacterias que forman esporas pueden ser responsables de contaminaciones incluyendo, pero sin limitarse a, infecciones hospitalarias, deterioro de alimentos y/o problemas de enfermedades transmitidas por los alimentos. A medida que la producción de productos refrigerados mínimamente procesados se vuelve más eficaz y aséptica, se elimina la microflora de fondo, y es el microorganismo que forma esporas el que finalmente puede limitar las vidas útiles de almacenamiento de estos productos. Se sospecha que las bacterias que forman esporas son responsables del deterioro de alimentos enlatados, pan, carnes envasadas al vacío, productos lácteos y zumos de frutas pasteurizados. La presencia de esporas bacterianas a altos niveles en componentes que se encuentran dentro de cualquiera de estos tipos de productos puede aumentar el posible deterioro del producto terminado.

25 En el entorno de la asistencia sanitaria, las bacterias que forman esporas provocan frecuentemente infecciones incluyendo diarrea nosocomial, tétanos y gangrena. *Clostridium difficile* es una bacteria anaerobia que forma esporas que provoca colitis pseudomembranosa y diarrea asociada a antibióticos. El reciente surgimiento de una cepa epidémica altamente patógena con morbimortalidad atribuible aumentada ha aumentado adicionalmente la importancia de este patógeno nosocomial. Se esperaría que la reducción de la transmisión infecciosa del personal hospitalario al paciente mejorase drásticamente los tiempos de recuperación dando como resultado de ese modo un alta del paciente acelerada. Esto es beneficioso desde los puntos de vista de la salud del paciente y el coste social. A pesar de los esfuerzos de la comunidad médica para aumentar el uso de antisépticos para prevenir la transmisión microbiana, la aparición de infección y reinfección de pacientes conduce a morbimortalidad innecesarias.

35 Las bacterias que forman esporas pueden residir en una forma latente durante décadas antes de germinar en una célula huésped y pueden ser responsables de contaminación inesperada, ya esté relacionada con la industria alimentaria o en la práctica de la medicina. Además, las endosporas bacterianas son resistentes a desinfectantes de superficies y de la piel y por tanto las medidas antimicrobianas actuales son en gran medida ineficaces. Lo que se necesita es un método para examinar composiciones para el control de infecciones que eliminen y/o impidan la unión a, y la infección posterior de, un huésped por una espóra microbiana.

40 Sumario

Según un primer aspecto de la invención se proporciona un método de examen para examinar composiciones para el control de infecciones según la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas.

45 La presente invención se refiere al campo del control de infecciones. Particularmente, la invención se refiere a composiciones y métodos para mantener condiciones asépticas, descontaminación bacteriana y/o profilaxis de la exposición bacteriana. En una realización, la invención contempla composiciones para el control de infecciones que inhiben la unión de esporas microbianas a una superficie sustrato. Por ejemplo, la inhibición antagoniza, altera y/o desplaza una interacción, unión y/o estabilización de una espóra microbiana a una superficie sustrato.

50 En una realización, la presente invención contempla una composición para el control de infecciones que puede bloquear y/o inhibir la unión de una espóra microbiana a una superficie sustrato. En una realización, la composición comprende una molécula orgánica pequeña. En una realización, la composición comprende una proteína. En una realización, el péptido comprende un péptido de superficie de esporas. En una realización, el péptido se deriva de una proteína de superficie de esporas de clostridios. En una realización, la proteína de superficie de esporas de clostridios comprende una proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*. En otras realizaciones no reivindicadas, el péptido se deriva de una proteína de superficie de esporas de *Bacillus*. La proteína de superficie de esporas de *Bacillus* comprende una proteína de superficie de esporas de *Bacillus anthracis*. En una realización, el péptido de superficie de esporas de *Clostridium difficile* comprende SEQ ID NO: 1 o un homólogo de SEQ ID NO: 1. En una realización, el péptido de superficie de esporas se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 15. En una realización, la composición comprende un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, la composición comprende un péptido sintético. En una realización, la composición comprende un complejo de ión inorgánico. En una realización, la composición comprende un mimético de proteína. En una realización, la superficie sustrato comprende una superficie inanimada. En una realización, comprende una

superficie animada. En una realización, la superficie animada comprende una superficie de tejido corporal. En una realización, la superficie de tejido corporal comprende una superficie epitelial. En una realización, la superficie epitelial comprende una superficie de piel de mamífero. En una realización, la superficie inanimada comprende acero inoxidable. En una realización, la superficie inanimada comprende cerámica. En una realización, la superficie inanimada comprende vinilo. En una realización, la superficie inanimada comprende azulejos. En una realización, la composición comprende además al menos un fármaco antimicrobiano. En una realización, la composición comprende además un portador. En una realización, el portador comprende además un detergente. En una realización, el portador es estéril y adecuado para administración a seres humanos. En una realización, el portador comprende un limpiador cutáneo antimicrobiano. En una realización, el limpiador cutáneo comprende un limpiador para lavarse las manos. En una realización, el portador comprende un limpiador de superficie antimicrobiano.

También se describe pero no se reivindica una composición para el control de infecciones que comprende una secuencia de aminoácidos que puede bloquear y/o inhibir la unión de una spora microbiana a una superficie sustrato, en la que la secuencia de aminoácidos tiene homología sustancial con una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la homología sustancial comprende aproximadamente el 75% de homología, preferiblemente el 85% de homología, pero lo más preferiblemente el 90% o el 95% de homología. En una realización, la proteína de superficie comprende una proteína de superficie de esporas. En una realización, la proteína de superficie de esporas es una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Clostridium* es una proteína de superficie de esporas de *C. difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas es una proteína de superficie de esporas de *Bacillus*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Bacillus* es una proteína de superficie de esporas de *B. anthracis*. En una realización, la proteína de superficie de esporas comprende un péptido de superficie de esporas. En una realización, el péptido se deriva de una proteína de superficie de clostridios. En una realización, la proteína de superficie de clostridios comprende una proteína de superficie de *Clostridium difficile*. En una realización, el péptido se deriva de una proteína de superficie de *Bacillus*. En una realización, la proteína de superficie de *Bacillus* comprende una proteína de superficie de *Bacillus anthracis*. En una realización, el péptido de superficie de esporas de *Clostridium difficile* comprende SEQ ID NO: 1 o un homólogo de SEQ ID NO: 1. En una realización, el péptido de superficie de esporas se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 15. En una realización, la secuencia de aminoácidos se deriva de un extremo C-terminal de la proteína de superficie de esporas. En una realización, la secuencia de aminoácidos se deriva de un extremo N-terminal de una proteína de superficie de esporas. En una realización, la composición comprende además un portador. En una realización, el portador comprende un detergente. En una realización, la composición comprende además al menos un fármaco antimicrobiano. En una realización, el portador es adecuado para su administración a seres humanos. En una realización, la composición comprende además un limpiador cutáneo antimicrobiano. En una realización, el limpiador cutáneo es un limpiador para lavarse las manos. En una realización, la composición comprende además un limpiador de superficie antimicrobiano. En una realización, la composición comprende además una barrera cutánea. En una realización, la composición comprende además una barrera de superficie.

También se describe una composición para el control de infecciones que comprende un compuesto antagonista, en la que el compuesto tiene afinidad por una secuencia de aminoácidos de proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la afinidad se dirige a un sitio de unión específico de sustrato de superficie. En una realización, el compuesto comprende un anticuerpo. En una realización, el compuesto comprende una molécula orgánica pequeña. En una realización, la secuencia de aminoácidos de proteína de superficie de esporas comprende un fragmento de péptido. En una realización, el fragmento de péptido se deriva de un extremo C-terminal de la proteína de superficie de esporas. En una realización, el fragmento de péptido se deriva de un extremo N-terminal de la proteína de superficie de esporas. En una realización, la proteína de superficie de esporas es una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Clostridium* es una proteína de superficie de esporas de *C. difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas es una proteína de superficie de esporas de *Bacillus*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Bacillus* es una proteína de superficie de esporas de *B. anthracis*. En una realización, la composición comprende además al menos un fármaco antimicrobiano. En una realización, la composición comprende además un portador. En una realización, el portador es adecuado para administración a seres humanos. En una realización, la composición comprende además un limpiador de manos antimicrobiano. En una realización, la composición comprende además un limpiador de superficie antimicrobiano.

También se describe pero no se reivindica un método, que comprende: a) proporcionar: i) un sujeto que corre el riesgo de exposición a un microbio, en el que la exposición es probable que dé como resultado una infección microbiana; y ii) una composición para el control de infecciones; b) administrar la composición al sujeto antes de la exposición microbiana, en condiciones tales que se forma una barrera frente a la infección microbiana. En una realización, la barrera frente a la infección microbiana reduce la infección microbiana. En una realización, la barrera frente a la infección microbiana previene la infección microbiana. En una realización, el microbio comprende una bacteria. En una realización, la bacteria se selecciona del grupo que comprende clostridios, *Bacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* o *Thermoactinomyces*. En una realización, la bacteria comprende una spora bacteriana. En una realización, la spora bacteriana comprende al menos una proteína de superficie de esporas. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Clostridium* es una proteína de superficie de esporas de *C. difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Bacillus* es una

proteína de superficie de esporas de *B. anthracis*. En una realización, la composición para el control de infecciones comprende una secuencia de aminoácidos. En una realización, la secuencia de aminoácidos se deriva de una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la secuencia de aminoácidos tiene homología sustancial con una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la composición para el control de infecciones puede inhibir, antagonizar, alterar, desplazar y/o bloquear la unión de una espora microbiana a una superficie sustrato. En una realización, la composición para el control de infecciones comprende además un compuesto antagonista, en la que el compuesto tiene afinidad por una secuencia de aminoácidos de proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la composición comprende además un portador. En una realización, la composición para el control de infecciones comprende además al menos un fármaco antimicrobiano. En una realización, el sujeto que corre riesgo es un trabajador sanitario. En una realización, el sujeto que corre el riesgo es un miembro del personal de emergencias. En una realización, el sujeto que corre el riesgo es un paciente médico. En una realización, el paciente está en un entorno hospitalario. En una realización, al paciente médico se le ha administrado al menos un antibiótico. En una realización, el sujeto que corre el riesgo es un bombero. En una realización, el sujeto que corre el riesgo es un policía. En una realización, el sujeto que corre el riesgo es un miembro del personal militar. En una realización, el sujeto que corre el riesgo es un manipulador de alimentos. En una realización, el sujeto que corre el riesgo es una superficie y/u objeto inanimado. En una realización, la administración se selecciona del grupo que comprende tópica, oral, parenteral, pulmonar, anal, vaginal, ocular o intranasal.

También se describe un método, que comprende: a) proporcionar: i) un sujeto que se ha expuesto a un microbio, en el que la exposición dio como resultado una infección microbiana; ii) una composición para el control de infecciones; b) administrar la composición al sujeto tras la exposición microbiana, en condiciones tales que se reduce la infección microbiana. En una realización, el microbio comprende una bacteria. En una realización, la bacteria se selecciona del grupo que comprende clostridios, *Bacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* o *Thermoactinomyces*. En una realización, la bacteria comprende una espora bacteriana. En una realización, la espora bacteriana comprende al menos una proteína de superficie de esporas. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Clostridium* es una proteína de superficie de esporas de *C. difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Bacillus* es una proteína de superficie de esporas de *B. anthracis*. En una realización, la composición para el control de infecciones comprende una secuencia de aminoácidos. En una realización, la secuencia de aminoácidos se deriva de una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la secuencia de aminoácidos tiene homología sustancial con una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la composición para el control de infecciones puede inhibir, antagonizar, alterar, desplazar y/o bloquear la unión de una espora microbiana a una superficie sustrato. En una realización, la composición para el control de infecciones comprende además un compuesto antagonista, en la que el compuesto tiene afinidad por una secuencia de aminoácidos de proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la composición comprende además un portador. En una realización, la composición para el control de infecciones comprende además al menos un fármaco antimicrobiano. En una realización, el sujeto expuesto es un trabajador sanitario. En una realización, el sujeto expuesto es un miembro del personal de emergencias. En una realización, el sujeto expuesto es un bombero. En una realización, el sujeto expuesto es un policía. En una realización, el sujeto expuesto es un miembro del personal militar. En una realización, la administración se selecciona del grupo que comprende tópica, oral, parenteral, pulmonar, anal, vaginal, ocular o intranasal. En una realización, el sujeto expuesto es una superficie y/u objeto inanimado.

También se describe un método de examen que comprende: a) proporcionar; i) un péptido aislado, en el que el péptido se deriva de una proteína de superficie de esporas microbianas; y ii) un compuesto de prueba de control de infecciones que se sospecha que tiene una interacción con el péptido; b) poner en contacto el péptido con el compuesto de prueba de control de infecciones; y c) detectar la interacción del péptido con el compuesto de prueba de control de infecciones. En una realización, el método comprende además un sustrato que puede unirse al péptido aislado. En una realización, la superficie sustrato comprende piel de cerdo. En una realización, el péptido se deriva de una proteína de superficie de esporas de clostridios. En una realización, la proteína de superficie de esporas de clostridios comprende un exosporio de *Clostridium difficile*. El péptido puede derivarse de una proteína de superficie de esporas de *Bacillus*. Alternativamente, el exosporio de *Bacillus* comprende una proteína de superficie de esporas de *Bacillus anthracis*. En una realización, el péptido comprende un péptido de superficie de esporas. En una realización, el péptido de superficie de esporas de *Clostridium difficile* comprende SEQ ID NO: 1 o un homólogo de SEQ ID NO: 1. En una realización, el péptido de superficie de esporas se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 15. En una realización, el compuesto de prueba de control de infecciones comprende una molécula orgánica pequeña. En una realización, el compuesto de prueba de control de infecciones comprende un péptido sintético. En una realización, el compuesto de prueba de control de infecciones comprende un mimético de proteína. En una realización, el compuesto de prueba de control de infecciones comprende un anticuerpo.

También se describe un método, que comprende: a) proporcionar; i) un péptido de superficie de esporas microbianas marcado aislado, en el que dicho péptido crea un primer patrón de intensidad de fluorescencia; y ii) un compuesto de prueba de control de infecciones que puede interaccionar con dicho péptido; b) poner en contacto dicho péptido con dicho compuesto para producir un péptido contactado que tiene un segundo patrón de intensidad de fluorescencia; c) comparar dicho primer patrón de intensidad con el segundo patrón de intensidad de

fluorescencia. En una realización, el método comprende además la etapa d) detectar una diferencia entre el primer patrón de intensidad y el segundo patrón de intensidad. En una realización, la diferencia indica que dicho compuesto se une a dicho péptido. En una realización, el péptido se deriva de una proteína de superficie de esporas bacterianas. En una realización, la proteína de superficie de esporas bacterianas se deriva de una proteína de superficie de esporas de clostridios. En una realización, la proteína de superficie de esporas de clostridios comprende proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas bacterianas se deriva de una proteína de superficie de esporas de *Bacillus*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Bacillus* comprende proteína de superficie de esporas de *Bacillus anthracis*. En una realización, la proteína de superficie de esporas comprende un fragmento de péptido. En una realización, el péptido se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9. En una realización, el marcador se selecciona del grupo que consiste en 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), sulfonato de anilinaftaleno (ANS), bis-ANS (sulfonato de bisanilinaftaleno), N-fenil-1-naftaleno (NPN), rojo de rutenio, violeta de cresol y 4-(dicianovinil)julolidina (DCVJ).

También se describe un método de examen de un compuesto, que comprende: a) proporcionar; i) una bacteria que comprende un vector de expresión recombinante, en el que dicho vector comprende al menos una porción de una secuencia de oligonucleótido de superficie de esporas; y ii) un compuesto que se sospecha que tiene actividad de control de infecciones; b) expresar dicho vector de manera que se presenta una proteína de superficie de esporas sobre la membrana bacteriana; c) poner en contacto dicha bacteria con dicho compuesto; y d) detectar la actividad de control de infecciones de dicho compuesto. En una realización, la actividad de control de infecciones comprende formar una pareja de unión de dicho compuesto con dicha proteína presentada. En una realización, la secuencia de oligonucleótido comprende SEQ ID NO: 2. En una realización, la secuencia de oligonucleótido se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 16. En una realización, el vector de expresión recombinante comprende además una secuencia de fusión, en la que la secuencia de fusión comprende una secuencia indicadora. En una realización, la secuencia indicadora es una secuencia de β -galactosidasa.

También se describe un método para detectar la presencia de secuencias de polinucleótido que codifican para al menos una porción de un gen de proteína de superficie de esporas microbianas en una muestra, comprendiendo el método: a) proporcionar; i) al menos una porción de SEQ ID NO: 2; y ii) una muestra que se sospecha que contiene una secuencia de oligonucleótido de superficie de esporas; b) combinar la porción de SEQ ID NO: 2 y la muestra en condiciones tales que se forma un complejo de hibridación entre la porción de SEQ ID NO: 2 y la secuencia de oligonucleótido de superficie de esporas; y c) detectar el complejo de hibridación. En una realización, el oligonucleótido de superficie de esporas se deriva de una espora microbiana. En una realización, la espora se deriva de una especie de clostridio. En una realización, la espora se deriva de una especie de *Bacillus*. En una realización, la secuencia de oligonucleótido es ARN. En una realización, la secuencia de oligonucleótido es ADN.

También se describe un método que comprende; proporcionar una composición para el control de infecciones y una superficie sustrato que comprende esporas bacterianas; aplicar la composición a la superficie, en el que al menos el 50%, preferiblemente el 60%, más preferiblemente el 70%, incluso más preferiblemente el 80%, lo más preferiblemente el 90% o el 100% de las esporas se eliminan de la superficie. En una realización, la superficie puede seleccionarse del grupo que consiste en piel, tejidos corporales, superficies inorgánicas (es decir, por ejemplo, acero inoxidable, granito, plásticos, azulejos, cerámica, etc.), guantes, batas de laboratorio o instrumentos médicos.

También se describe un método que comprende; proporcionar una composición para el control de infecciones y una superficie sustrato con alto riesgo de unión de esporas bacterianas; aplicar la composición a la superficie, en el que se impide al menos el 50%, preferiblemente el 60%, más preferiblemente el 70%, incluso más preferiblemente el 80%, lo más preferiblemente el 90% o el 100% de la unión de esporas bacterianas. En una realización, la superficie puede seleccionarse del grupo que consiste en piel, tejidos corporales, superficies inorgánicas (es decir, por ejemplo, acero inoxidable, granito, plástico, azulejos, cerámica, etc.) o instrumentos médicos.

También se describe un método de examen de una pluralidad de composiciones para el control de infecciones para detectar la unión a una proteína de esporas microbianas, que comprende: a) proporcionar una columna de cromatografía que comprende perlas que portan dichas proteínas de esporas microbianas; b) poner en contacto dicha pluralidad de composiciones para el control de infecciones con dichas perlas en condiciones tales que al menos una de dichas composiciones para el control de infecciones forma una pareja de unión con dichas perlas; c) liberar de manera controlable dicha al menos una composición para el control de infecciones unida de dicha perla; d) detectar dicha al menos una composición para el control de infecciones unida. En una realización, dicha pareja de unión comprende una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la detección de la al menos una composición para el control de infecciones unida comprende la producción de una señal de fluorescencia. En una realización, la detección de la al menos una composición para el control de infecciones unida comprende la formación de un producto de enzima-sustrato. En una realización, la etapa de liberar de manera controlable comprende exponer las perlas a un agente de liberación. En una realización, el agente de liberación se selecciona de un grupo que consiste en luz, ácido y base.

También se describe una composición para el control de infecciones que comprende un compuesto mimético de

proteína y un portador, en la que el compuesto mimético de proteína tiene un primer patrón de sitio de unión específica sobre una superficie sustrato en la que el primer patrón de unión tiene al menos el 50% de identidad, preferiblemente el 60% de identidad, más preferiblemente el 70% de identidad, incluso más preferiblemente el 80% de identidad, lo más preferiblemente el 90% de identidad o el 100% de identidad con un segundo patrón de sitio de unión específica de una secuencia de aminoácidos, en la que la secuencia tiene homología sustancial con una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, el compuesto mimético de proteína comprende una molécula orgánica pequeña. En una realización, el compuesto mimético de proteína comprende un péptido sintético. En una realización, el compuesto mimético de proteína comprende un complejo de ión inorgánico. En una realización, la proteína de superficie comprende una proteína de superficie de esporas. En una realización, la proteína de superficie de esporas microbianas se deriva de una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Clostridium* es una proteína de superficie de esporas de *C. difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas se deriva de una proteína de superficie de esporas de *Bacillus*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de *Bacillus* es una proteína de superficie de esporas de *B. anthracis*. En una realización, la secuencia de aminoácidos se deriva de un extremo C-terminal de la proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la secuencia de aminoácidos se deriva de un extremo N-terminal de la proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, la superficie sustrato comprende una superficie animada. En una realización, la superficie sustrato comprende una superficie inanimada. En una realización, la superficie animada comprende una superficie de tejido corporal. En una realización, la superficie de tejido corporal comprende una superficie de piel de mamífero. En una realización, la superficie inanimada comprende acero inoxidable. En una realización, la superficie inanimada comprende cerámica. En una realización, la superficie inanimada comprende vinilo. En una realización, la superficie inanimada comprende azulejos. En una realización, el portador comprende un detergente. En una realización, la composición comprende además al menos un fármaco antimicrobiano. En una realización, el portador es estéril y adecuado para administración a seres humanos. En una realización, la composición comprende además un limpiador cutáneo antimicrobiano. En una realización, la composición comprende además un limpiador de superficie antimicrobiano.

Definiciones

El término “farmacéuticamente” o “farmacológicamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras no deseadas cuando se administran a un animal o un ser humano.

El término “portador farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de disolventes, o un medio de dispersión incluyendo, pero sin limitarse a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, liposomas, limpiadores disponibles comercialmente, y similares. También pueden incorporarse componentes bioactivos complementarios en tales portadores.

El término, “purificado” o “aislado”, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a una composición de péptidos que se ha sometido a tratamiento (es decir, por ejemplo, fraccionamiento) para eliminar otros diversos componentes, y composición que sustancialmente conserva su actividad biológica expresada. Cuando se usa el término “sustancialmente purificado”, esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o el péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de la composición (es decir, por ejemplo, peso/peso y/o peso/volumen). El término “purificado hasta la homogeneidad” se usa para incluir composiciones que se han purificado hasta una “homogeneidad aparente” de manera que hay una única especie de proteína (es decir, por ejemplo, basándose en el análisis mediante SDS-PAGE o HPLC). Una composición purificada no pretende significar que puedan quedar algunas impurezas traza.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente purificado” se refiere a moléculas, secuencias o bien nucleicas o bien de aminoácidos, que se retiran de su entorno natural, se aíslan o se separan, y están al menos libres al 60%, preferiblemente libres al 75% y más preferiblemente libres al 90% de otros componentes con los que están asociados de manera natural. Un “polinucleótido aislado” es por tanto un polinucleótido sustancialmente purificado.

“Secuencia de ácido nucleico” y “secuencia de nucleótidos” tal como se usan en el presente documento se refieren a un oligonucleótido o polinucleótido, y fragmentos o porciones de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser mono o bicatenario, y representar la hebra sentido o antisentido.

El término “un ácido nucleico aislado”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su estado natural (por ejemplo, retirado de una célula) y que, en una realización preferida, está libre de otro ácido nucleico genómico.

El término “codón funcionalmente equivalente”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a codones

diferentes que codifican para el mismo aminoácido. Este fenómeno se denomina a menudo “degeneración” del código genético. Por ejemplo, seis codones diferentes codifican para el aminoácido arginina.

5 Los términos “secuencia de aminoácidos” y “secuencia de polipéptido” tal como se usan en el presente documento, son intercambiables y se refieren a una secuencia de aminoácidos.

10 El término “proteína de superficie de esporas” tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína o fragmento de péptido que se deriva de, o tiene similitud sustancial (es decir, es homólogo) a, cualquier proteína de exosporio de esporas bacterianas. Se cree que las proteínas de superficie de esporas microbianas son responsables de la unión e inmovilización de una spora microbiana a una superficie animada y/o inanimada hasta que las condiciones sean suficientes para inducir la germinación.

15 El término “derivado de” tal como se usa en el presente documento se refiere a la fuente de un compuesto o secuencia. En un sentido, un compuesto o secuencia puede derivarse de un organismo o especie particular. En otro sentido, un compuesto o secuencia puede derivarse de una secuencia o un complejo más grande.

20 Tal como se usa en el presente documento, “BclA” o “polipéptido de BclA” o “proteína BclA” u “homólogo de BclA” se usan de manera intercambiable para referirse a la secuencia de aminoácidos de proteína de tipo *Bacillus* sustancialmente purificada, obtenida de cualquier especie, particularmente especies bacterianas que incluyen bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, aerobias y anaerobias, y obtenidas de cualquier fuente ya sea natural, sintética, semisintética o recombinante. Por ejemplo, un homólogo de BclA de *Clostridium difficile* tendría la misma función y actividad que un péptido de BclA de *Bacillus anthracis*.

25 Una “variante” de una proteína se define como una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más aminoácidos de una secuencia de polipéptido (es decir, por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o cualquier homólogo de la secuencia de polipéptido. La variante puede tener cambios “conservativos”, en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades químicas o estructurales similares, por ejemplo, reemplazo de leucina por isoleucina. Más raramente, una variante puede tener cambios “no conservativos”, por ejemplo, reemplazo de una glicina por un triptófano. Variaciones minoritarias similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos (es decir, adiciones), o ambas. Puede encontrarse orientación en la determinación de cuáles y cuántos residuos de aminoácido pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse sin suprimir la actividad biológica o inmunológica usando programas informáticos incluyendo, pero sin limitarse a, el software DNASTar®.

35 Una “variante” de un nucleótido se define como una secuencia de nucleótidos novedosa que difiere de un oligonucleótido de referencia al tener deleciones, inserciones y sustituciones. Éstas pueden detectarse usando una variedad de métodos (por ejemplo, secuenciación, ensayos de hibridación, etc.). Se incluyen dentro de esta definición alteraciones en la secuencia de ADN genómico que codifica para una proteína de superficie de esporas de *Clostridium* (es decir, por ejemplo, mediante alteraciones en el patrón de fragmentos de enzimas de restricción que pueden hibridarse con SEQ ID NO: 2 (análisis de RFLP), la incapacidad de un fragmento seleccionado de SEQ ID NO: 2 para hibridarse en condiciones de alta rigurosidad con una muestra de ADN genómico (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas específicas de alelo) e hibridación incorrecta o no esperada, tal como hibridación con un locus distinto del locus cromosómico normal para un gen de superficie de esporas de *Clostridium* (por ejemplo, usando hibridación *in situ* fluorescente (FISH)).

45 Una “delección” se define como un cambio en cualquier nucleótido o secuencia de aminoácidos en el que uno o más nucleótidos o residuos de aminoácido, respectivamente, están ausentes.

50 Una “inserción” o “adición” es el cambio en un nucleótido o secuencia de aminoácidos que ha dado como resultado la adición de uno o más nucleótidos o residuos de aminoácido, respectivamente, en comparación con, por ejemplo, la proteína de superficie de esporas de *Clostridium* que se produce de manera natural.

Una “sustitución” resulta del reemplazo de uno o más nucleótidos o aminoácidos por diferentes nucleótidos o aminoácidos, respectivamente.

55 El término “derivado” tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier modificación química de un ácido nucleico o un aminoácido. Ilustrativo de tales modificaciones sería el reemplazo de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Por ejemplo, un derivado de ácido nucleico codificaría para un polipéptido que conserva características biológicas esenciales.

60 Tal como se usa en el presente documento el término “porción” cuando hace referencia a una proteína (como en “una porción de una proteína dada”) se refiere a fragmentos de esa proteína. Los fragmentos pueden oscilar en tamaño entre cuatro residuos de aminoácido y la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido. Por ejemplo, una proteína “que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1” abarca una proteína de superficie de esporas de *Clostridium* de longitud completa y fragmentos de la misma de cuatro (4) aminoácidos o más.

65

El término “porción” cuando se usa en referencia a una secuencia de nucleótidos se refiere a fragmentos de esa secuencia de nucleótidos. Los fragmentos pueden oscilar en tamaño en 5 residuos de nucleótido y la secuencia de nucleótidos completa menos un residuo de ácido nucleico.

5 El término “biológicamente activo” se refiere a cualquier molécula que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas. Por ejemplo, puede determinarse la actividad biológica de proteínas de superficie de esporas, por ejemplo, mediante la restauración del crecimiento de tipo natural en células que carecen de actividad de proteínas de superficie de esporas (es decir, por ejemplo, células nulas y/o células “deficientes” para proteínas de superficie de esporas). Pueden producirse células que carecen de actividad de proteínas de superficie de esporas mediante
10 muchos métodos (es decir, por ejemplo, mutación puntual y mutación del marco de lectura). Se logra la complementación transfectando células que carecen de actividad de proteínas de superficie de esporas con un vector de expresión que expresa proteína de superficie de esporas, un derivado de la misma o una porción de la misma.

15 El término “inmunológicamente activo” define la capacidad de un péptido natural, recombinante o sintético (es decir, por ejemplo, una proteína de superficie de esporas), o cualquier oligopéptido del mismo, para inducir una respuesta inmunitaria específica en animales o células apropiados y/o para unirse con anticuerpos específicos.

20 El término “determinante antigénico” tal como se usa en el presente documento se refiere a la porción de una molécula que se reconoce por un anticuerpo particular (es decir, un epítipo). Cuando se usa una proteína o fragmento de una proteína para inmunizar a un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada o estructura tridimensional en la proteína; estas regiones o estructuras se denominan determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el inmunógeno usado para provocar la respuesta inmunitaria) por la unión
25 a un anticuerpo.

Los términos “inmunógeno”, “antígeno”, “inmunogénico” y “antigénico” se refieren a cualquier sustancia que pueda generar anticuerpos cuando se introduce en un animal. Por definición, un inmunógeno debe contener al menos un epítipo (la unidad bioquímica específica que puede provocar una respuesta inmunitaria), y generalmente contiene
30 muchos más. Las proteínas son las más frecuentemente usadas como inmunógenos, pero restos lipídicos y de ácido nucleico complejados con proteínas también pueden actuar como inmunógenos. Estos últimos complejos son útiles a menudo cuando moléculas más pequeñas con pocos epítipos no estimulan una respuesta inmunitaria satisfactoria por sí mismos.

35 El término “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina provocada en animales por un inmunógeno (antígeno). Se desea que el anticuerpo demuestre especificidad frente a epítipos contenidos en el inmunógeno. El término “anticuerpo policlonal” se refiere a una inmunoglobulina producida a partir de más de un único clon de células plasmáticas; en contraposición “anticuerpo monoclonal” se refiere a una inmunoglobulina producida a partir de un único clon de células plasmáticas.

40 Los términos “unión específica” o “unirse específicamente” cuando se usan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en una proteína; en otras palabras un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en vez de a proteínas en general. Por ejemplo,
45 si un anticuerpo es específico para el epítipo “A”, la presencia de una proteína que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado) en una reacción que contiene “A” marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

50 El término “molécula de ADN recombinante” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN que está compuesta por segmentos de ADN unidos entre sí por medio de técnicas de biología molecular.

El término “proteína recombinante” o “polipéptido recombinante” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de proteína que se expresa usando una molécula de ADN recombinante.

55 Tal como se usa en el presente documento, los términos “vector” y “vehículo” se usan de manera intercambiable en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento(s) de ADN de una célula a otra.

60 El término “vector de expresión” o “casete de expresión” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia codificante deseada y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariontes incluyen habitualmente un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión al ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de terminación y poliadenilación.

65 Los términos “en combinación operable”, “en orden operable” y “operativamente unido” tal como se usan en el

presente documento se refieren a la unión de secuencias de ácido nucleico de una manera tal que se produce una molécula de ácido nucleico que puede dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada. El término también se refiere a la unión de secuencias de aminoácidos de una manera tal que se produce una proteína funcional.

5 El término “transfección” tal como se usa en el presente documento se refiere a la introducción de ADN foráneo en células. La transfección puede lograrse mediante una variedad de medios conocidos en la técnica incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral, biolística (es decir, bombardeo de partículas) y similares.

10 Tal como se usa en el presente documento, los términos “complementario” o “complementariedad” se usan en referencia a “polinucleótidos” y “oligonucleótidos” (que son términos intercambiables que se refieren a una secuencia de nucleótidos) en relación con las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia “C-A-G-T” es complementaria a la secuencia “G-T-C-A”. La complementariedad puede ser “parcial” o “total”. La complementariedad “parcial” es en la que una o más bases de ácido nucleico no coinciden según las reglas de apareamiento de bases. La complementariedad “total” o “completa” entre ácidos nucleicos es en la que todas y cada una de las bases de ácido nucleico coinciden con otra base según las normas de apareamiento de bases. El grado de complementariedad entre hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en reacciones de amplificación, así como en métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

15 Los términos “homología” y “homólogo” tal como se usan en el presente documento en referencia a secuencias de nucleótidos se refieren a un grado de complementariedad con otras secuencias de nucleótidos. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia de nucleótidos que es parcialmente complementaria, es decir, “sustancialmente homóloga”, a una secuencia de ácido nucleico es una que inhibe al menos parcialmente la hibridación de una secuencia completamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico diana. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia de tipo Southern o Northern, hibridación en disolución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia completamente homóloga con una secuencia diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permite una unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede someterse a prueba mediante el uso de una segunda secuencia diana que carece incluso de un grado de complementariedad parcial (por ejemplo, menos de aproximadamente el 30% de identidad); en ausencia de unión no específica la sonda no se hibridará con la segunda diana no complementaria.

20 Los términos “homología” y “homólogo” tal como se usan en el presente documento en referencia a secuencias de aminoácidos se refieren al grado de identidad de la estructura primaria entre dos secuencias de aminoácidos. Un grado de identidad de este tipo puede referirse a una porción de cada secuencia de aminoácidos, o a la longitud completa de la secuencia de aminoácidos. Dos o más secuencias de aminoácidos que son “sustancialmente homólogas” pueden tener al menos el 50% de identidad, preferiblemente al menos el 75% de identidad, más preferiblemente al menos el 85% de identidad, lo más preferiblemente al menos el 95% o el 100% de identidad.

25 Una secuencia de oligonucleótido que es un “homólogo” de una secuencia de ácido nucleico de proteína de superficie de esporas de *Clostridium* (es decir, por ejemplo, SEQ ID NO: 2) se define en el presente documento como una secuencia de oligonucleótido que presenta más de o igual al 50% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 2 cuando se comparan secuencias que tienen una longitud de 100 pb o mayor. Alternativamente, un homólogo de SEQ ID NO: 2 se define como una secuencia de oligonucleótido que codifica para una secuencia de aminoácidos de proteína de superficie de esporas de *Clostridium* activa. Por ejemplo, un homólogo de proteína de superficie de esporas de *Clostridium* puede comprender una porción de una secuencia de oligonucleótido que codifica para una proteína de superficie de esporas.

30 Las condiciones de baja rigurosidad comprenden condiciones equivalentes a unión o hibridación a 42°C en una disolución que consiste en 5 x SSPE (NaCl 43,8 g/l, NaH₂PO₄-H₂O 6,9 g/l y EDTA 1,85 g/l, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,1%, reactivo de Denhardt 5x {Denhardt 50x contiene por 500 ml: 5 g de Ficoll (tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (fracción V; Sigma)} y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml seguido por lavado en una disolución que comprende SSPE 5x, SDS al 0,1% a 42°C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. También pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para comprender condiciones de baja rigurosidad; factores tales como la longitud y naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en disolución o inmovilizada, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol), así como componentes de la disolución de hibridación pueden variarse para generar condiciones de hibridación de baja rigurosidad diferentes de, pero equivalentes a, las condiciones enumeradas anteriormente. Además, también pueden usarse condiciones que promueven la hibridación

en condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, aumento de la temperatura de las etapas de hibridación y/o lavado, el uso de formamida en la disolución de hibridación, etc.).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “hibridación” se usa en referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios usando cualquier procedimiento mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través de apareamiento de bases para formar un complejo de hibridación. La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ve afectada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la T_m del híbrido formado y la razón G:C dentro de los ácidos nucleicos.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “complejo de hibridación” se refiere a un complejo formado entre dos secuencias de ácido nucleico en virtud de la formación de enlaces de hidrógeno entre bases G y C complementarias y entre bases A y T complementarias; estos enlaces de hidrógeno pueden estabilizarse adicionalmente mediante interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias de ácido nucleico complementaria se unen por enlaces de hidrógeno en una configuración antiparalela. Puede formarse un complejo de hibridación en disolución (por ejemplo, análisis $C_o t$ o $R_o t$) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en disolución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada a un soporte sólido (por ejemplo, una membrana de nailon o un filtro de nitrocelulosa tal como se emplea en transferencia de tipo Southern y Northern, transferencia puntual o un portaobjetos de vidrio tal como se emplea en hibridación *in situ*, incluyendo FISH (hibridación *in situ* fluorescente)).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “ T_m ” se usa en referencia a la “temperatura de fusión”. La temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico bicatenarias se disocian a la mitad en hebras individuales. Tal como se indica por referencias convencionales, puede calcularse una estimación sencilla del valor de T_m mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ de G+C})$, cuando un ácido nucleico está en disolución acuosa a NaCl 1 M. Anderson *et al.*, “Quantitative Filter Hybridization” En: Nucleic Acid Hybridization (1985). Cálculos más sofisticados tienen en cuenta características estructurales, así como de secuencia, para el cálculo de T_m .

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “rigurosidad” se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, en la que se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. La “rigurosidad” se produce normalmente en un intervalo de desde aproximadamente T_m hasta aproximadamente de 20°C a 25°C por debajo de T_m . Una “hibridación rigurosa” puede usarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótido idénticas o para identificar o detectar secuencias de polinucleótido similares o relacionadas. Por ejemplo, cuando se emplean fragmentos de SEQ ID NO: 2 en reacciones de hibridación en condiciones rigurosas, se favorece la hibridación de fragmentos de SEQ ID NO: 2 que contienen secuencias únicas (es decir, regiones que son o bien no homólogas a o bien que contienen menos de aproximadamente el 50% homología o complementariedad con SEQ ID NO: 2). Alternativamente, cuando se usan condiciones de rigurosidad “débil” o “baja” puede producirse hibridación con ácidos nucleicos que se derivan de organismos que son genéticamente diversos (es decir, por ejemplo, la frecuencia de secuencias complementarias es habitualmente baja entre tales organismos).

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico amplificable” se usa en referencia a ácidos nucleicos que pueden amplificarse mediante cualquier método de amplificación. Se contempla que un “ácido nucleico amplificable” comprenderá habitualmente un “molde de muestra”.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “molde de muestra” se refiere a ácido nucleico que se origina a partir de una muestra que se analiza para detectar la presencia de una secuencia diana de interés. En contraposición, “molde de fondo” se usa en referencia a un ácido distinto del molde de muestra que puede estar presente o no en una muestra. El molde de fondo es lo más a menudo involuntario. Puede ser el resultado del remanente, o puede deberse a la presencia de contaminantes de ácido nucleico que se busca eliminar por purificación de la muestra. Por ejemplo, pueden estar presentes ácidos nucleicos de organismos distintos de los que van a detectarse como fondo en una muestra de prueba.

55 “Amplificación” se define como la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y se lleva a cabo generalmente usando reacción en cadena de la polimerasa. Dieffenbach C. W. y G. S. Dveksler (1995) En: PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “reacción en cadena de la polimerasa” (“PCR”) se refiere al método de K.B. Mullis, patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195 y 4.683.202, incorporadas en el presente documento como referencia, que describen un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina mediante las posiciones relativas de dos cebadores de oligonucleótido entre sí, y por tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto de repetición del procedimiento, el método se denomina “reacción en cadena de la polimerasa” (a continuación en el presente documento “PCR”). Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las secuencias

predominantes (en cuanto a concentración) en la mezcla, se dice que están “amplificados por PCR”. Con PCR, es posible amplificar una única copia de una secuencia diana específica en ADN genómico hasta un nivel detectable mediante varias metodologías diferentes (por ejemplo, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores biotinilados seguido por detección de conjugados de avidina-enzima; incorporación de trifosfatos de desoxinucleótido marcados con ³²P, tales como dCTP o dATP, en el segmento amplificado). Además de ADN genómico, puede amplificarse cualquier secuencia de oligonucleótido con el conjunto apropiado de moléculas de cebador. En particular, los segmentos amplificados creados por el propio procedimiento de PCR son, por sí mismos, moldes eficaces para amplificaciones por PCR posteriores.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido, ya se produzca de manera natural como en un digesto de restricción purificado o se produzca de manera sintética, que puede actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es preferiblemente monocatenario para lograr una eficacia máxima en la amplificación, pero puede ser alternativamente bicatenario. Si es bicatenario, en primer lugar se trata el cebador para separar sus hebras antes de usarse para preparar productos de extensión. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo como para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente de cebador y el uso del método.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sonda” se refiere; a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya se produzca de manera natural como en un digesto de restricción purificado o se produzca de manera sintética, de manera recombinante o mediante amplificación por PCR, que puede hibridarse con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas particulares. Se contempla que cualquier sonda usada estará marcada con cualquier “molécula indicadora”, de modo que pueda detectarse en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero sin limitarse sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención se limite a ningún marcador o sistema de detección particular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

Se dice que las moléculas de ADN tienen “extremos 5'” y “extremos 3'” porque se hacen reaccionar mononucleótidos para preparar oligonucleótidos de una manera tal que el fosfato en 5' de un anillo de pentosa de mononucleótido se une al oxígeno en 3' de su vecino en un sentido por medio de una unión fosfodiéster. Por tanto, un extremo de un oligonucleótido se denomina “extremo 5'” si su fosfato en 5' no está unido al oxígeno en 3' de un anillo de pentosa de mononucleótido. Un extremo de un oligonucleótido se denomina “extremo 3'” si su oxígeno en 3' no está unido a un fosfato en 5' de otro anillo de pentosa de mononucleótido. Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico, incluso si es interna a un oligonucleótido más grande, también puede decirse que tiene extremos 5' y 3'. En una molécula de ADN o bien lineal o bien circular, se hace referencia a elementos diferenciados estando “en el sentido de 5'” o en 5' de los elementos “en el sentido de 3'” o en 3'. Esta terminología refleja el hecho de que la transcripción avanza de un modo de 5' a 3' a lo largo de la hebra de ADN. Los elementos promotores y potenciadores que dirigen la transcripción de un gen unido se ubican generalmente en 5' o en el sentido de 5' de la región codificante. Sin embargo, los elementos potenciadores pueden ejercer su efecto incluso cuando se ubican en 3' del elemento promotor y la región codificante. Se ubican señales de poliadenilación y terminación de la transcripción en 3' o en el sentido de 3' de la región codificante.

Tal como se usa en el presente documento, el término “un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para un gen” significa una secuencia de ácido nucleico que comprende la región codificante de un gen, es decir la secuencia de ácido nucleico que codifica para un producto génico. La región codificante puede estar presente en una forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en una forma de ADN, el oligonucleótido puede ser monocatenario (es decir, la hebra sentido) o bicatenario. Pueden colocarse elementos de control adecuados tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación, etc. en proximidad estrecha a la región codificante del gen si es necesario para permitir un inicio apropiado de la transcripción y/o un procesamiento correcto del transcrito de ARN primario. Alternativamente, la región codificante utilizada en los vectores de expresión puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de corte y empalme, secuencias intermedias, señales de poliadenilación, etc. o una combinación de elementos de control tanto endógenos como exógenos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “elemento regulador” se refiere a un elemento genético que controla algún aspecto de la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor es un elemento regulador que facilita el inicio de la transcripción de una región codificante operativamente unida. Otros elementos reguladores son señales de corte y empalme, señales de poliadenilación, señales de terminación, etc.

Las señales de control de la transcripción en eucariotas comprenden elementos “promotores” y “potenciadores”. Los promotores y potenciadores consisten en una serie corta de secuencias de ADN que interactúan específicamente con proteínas celulares implicadas en la transcripción. Maniatis, T. *et al.*, Science 236:1237 (1987). Se han aislado elementos promotores y potenciadores de una variedad de fuentes eucariotas incluyendo genes en virus y células vegetales, de levaduras, de insectos y de mamíferos (también se encuentran elementos de control análogos, es decir, promotores, en procariotas). La selección de un promotor y potenciador particular depende de qué tipo de célula esté usándose para expresar la proteína de interés.

La presencia de “señales de corte y empalme” en un vector de expresión a menudo da como resultado niveles de expresión superiores del transcrito recombinante. Señales de corte y empalme median en la eliminación de intrones del transcrito de ARN primario y consisten en un sitio donador y aceptor de corte y empalme. Sambrook, J. *et al.*, En: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989) págs. 16.7-16.8. Un sitio donador y aceptor de corte y empalme comúnmente usado es la unión de corte y empalme del ARN 16S de SV40.

El término “sitio de poli A” o “secuencia de poli A” tal como se usa en el presente documento indica una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente. Es deseable una poliadenilación eficaz del transcrito recombinante ya que los transcritos que carecen de cola de poli A son inestables y se degradan rápidamente. La señal de poli A utilizada en un vector de expresión puede ser “heteróloga” o “endógena”. Una señal de poli A endógena es una que se encuentra de manera natural en el extremo 3' de la región codificante de un gen dado en el genoma. Una señal de poli A heteróloga es una que se aísla de un gen y se coloca en 3' de otro gen. La expresión eficaz de secuencias de ADN recombinantes en células eucariotas implica la expresión de señales que dirigen la terminación y poliadenilación eficaces del transcrito resultante. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente en el sentido de 3' de la señal de poliadenilación y tienen unos cuantos cientos de nucleótidos de longitud.

El término “transfección” o “transfectado” se refiere a la introducción de ADN foráneo en una célula.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “molécula de ácido que codifica para”, “secuencia de ADN que codifica para” y “ADN que codifica para” se refieren al orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una hebra de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena de polipéptido (proteína). La secuencia de ADN codifica por tanto para la secuencia de aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “antisentido” se usa en referencia a secuencias de ARN que son complementarias a una secuencia de ARN específica (por ejemplo, ARNm). Puede producirse ARN antisentido mediante cualquier método, incluyendo síntesis mediante corte y empalme del/de los gene(s) de interés en una orientación inversa a un promotor viral que permite la síntesis de una hebra codificante. Una vez que se introduce en una célula, esta hebra transcrita se combina con ARNm natural producido por la célula para formar dúplex. Estos dúplex bloquean entonces o bien la transcripción adicional del ARNm o bien su traducción. De esta manera, pueden generarse fenotipos mutantes. El término “hebra antisentido” se usa en referencia a una hebra de ácido nucleico que es complementaria a la hebra “sentido”. La designación (-) (es decir, “negativa”) se usa algunas veces en referencia a la hebra antisentido, usándose algunas veces la designación (+) en referencia a la hebra sentido (es decir, “positiva”).

El término “hibridación de tipo Southern” se refiere al análisis de ADN sobre geles de agarosa o acrilamida para fraccionar el ADN según el tamaño, seguido por transferencia e inmovilización del ADN del gel a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa o nailon. Entonces, el ADN inmovilizado se estudia con sonda con una sonda de oligodesoxirribonucleótido marcada o sonda de ADN para detectar especies de ADN complementarias a la sonda usada. El ADN puede escindirse con enzimas de restricción antes de la electroforesis. Tras la electroforesis, el ADN puede despurinarse parcialmente y desnaturalizarse antes de o durante la transferencia al soporte sólido. Las transferencias de tipo Southern son una herramienta convencional del biólogo molecular. J. Sambrook *et al.* (1989) En: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, págs. 9.31-9.58.

El término “hibridación de tipo Northern” tal como se usa en el presente documento se refiere al análisis de ARN mediante electroforesis de ARN sobre geles de agarosa para fraccionar el ARN según el tamaño seguido por transferencia del ARN del gel a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa o nailon. Entonces, el ARN inmovilizado se estudia con sonda con una sonda de oligodesoxirribonucleótido marcada o sonda de ADN para detectar especies de ARN complementarias a la sonda usada. Las hibridaciones de tipo Northern son una herramienta convencional del biólogo molecular. J. Sambrook, J. 20 *et al.* (1989) citado anteriormente, págs. 7.39-7.52.

El término “hibridación de tipo Northern inversa” tal como se usa en el presente documento se refiere al análisis de ADN mediante electroforesis de ADN sobre geles de agarosa para fraccionar el ADN basándose en el tamaño seguido por transferencia del ADN fraccionado del gel a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa

o nailon. Entonces, el ADN inmovilizado se estudia con sonda con una sonda de oligorribonucleótido marcada o sonda de ARN para detectar especies de ADN complementarias a la ribosonda usada.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “región codificante” cuando se usa en referencia a un gen estructural se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican para los aminoácidos que se encuentran en el polipéptido naciente como resultado de la traducción de una molécula de ARNm. La región codificante tiene unido, en eucariotas, en el lado 5’ el triplete de nucleótidos “ATG” que codifica para la metionina iniciadora y en el lado 3’ uno de los tres tripletes que especifican codones de terminación (es decir, TAA, TAG, TGA).

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “gen estructural” se refiere a una secuencia de ADN que codifica para ARN o una proteína. En contraposición, los “genes reguladores” son genes estructurales que codifican para productos que controlan la expresión de otros genes (por ejemplo, factores de transcripción).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” significa las secuencias de desoxirribonucleótido que comprenden la región codificante de un gen estructural y que incluyen secuencias ubicadas adyacentes a la región codificante en ambos de los extremos 5’ y 3’ para una distancia de aproximadamente 1 kb en cualquier extremo de manera que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que se ubican en 5’ de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas en 5’. Las secuencias que se ubican en 3’ o en el sentido de 3’ de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas en 3’. El término “gen” abarca tanto ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas “intrones” o “regiones intermedias” o “secuencias intermedias”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben para dar ARN heterogéneo nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o “se separan por corte y empalme” del transcrito nuclear o primario; por tanto los intrones están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción especificando la secuencia o el orden de aminoácidos en un polipéptido naciente.

25 Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen pueden incluir también secuencias ubicadas en el extremo tanto 5’ como 3’ de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones “flanqueantes” (estas secuencias flanqueantes se ubican en 5’ o 3’ con respecto a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante en 5’ puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante en 3’ puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión postranscripcional y la poliadenilación.

30 El término “muestra” tal como se usa en el presente documento se usa en su sentido más amplio e incluye muestras biológicas y ambientales. Las muestras ambientales incluyen material del entorno tal como suelo y agua. Las muestras biológicas pueden ser animales, incluyendo, humanas, fluido (por ejemplo, sangre, plasma y suero), sólidas (por ejemplo, deposiciones), tejido, alimentos líquidos (por ejemplo, leche) y alimentos sólidos (por ejemplo, verduras). Una muestra biológica que se sospecha que contiene ácido nucleico que codifica para una proteína de superficie de esporas puede comprender una célula, extracto tisular, fluido corporal, cromosomas o elementos extracromosómicos aislados de una célula, ADN genómico (en disolución o unido a un soporte sólido tal como para análisis de transferencia de tipo Southern), ARN (en disolución o unido a un soporte sólido tal como para transferencia de tipo Northern), ADNc (en disolución o unido a un soporte sólido) y similares.

35 El término “composición para el control de infecciones” se refiere a cualquier compuesto o compuestos que previenen y/o reducen la tasa de crecimiento de un organismo (es decir, por ejemplo, un organismo microbiano, incluyendo esporas derivadas de un organismo microbiano) en comparación con la tasa de crecimiento del organismo en ausencia de la composición. Una composición para el control de infecciones puede ser natural (por ejemplo, derivada de un microbio tal como una bacteria, virus, hongos, algas, moho, etc.), sintética o recombinante. Una composición para el control de infecciones puede ser un inhibidor competitivo de una proteína de esporas microbianas y/o una proteína de superficie de esporas microbianas. Alternativamente, una composición para el control de infecciones puede formar parejas de unión estables y/o transitorias con proteínas de esporas microbianas y/o proteínas de superficie de esporas microbianas. Una “composición para el control de infecciones” también puede incluir agentes y/o fármacos antibacterianos y/o antimicrobianos (es decir, por ejemplo, antibióticos). En consecuencia, la “actividad de control de infecciones” se interpreta queriendo decir cualquier reducción y/o prevención del crecimiento microbiano como resultado de la aplicación de una composición para el control de infecciones a una superficie.

40 El término “antibacteriano” y “antimicrobiano” se usan de manera intercambiable para referirse a una composición que previene y/o reduce la tasa de crecimiento de un organismo en comparación con la tasa de crecimiento del organismo en ausencia de la composición. Una composición antibacteriana y/o antimicrobiana puede ser bacteriostática, bactericida, ambas o ninguna. Una composición antibacteriana y/o antimicrobiana es bacteriostática si inhibe la división celular sin afectar a la viabilidad de la célula inhibida. Una composición antibacteriana y/o antimicrobiana es bactericida si provoca muerte celular. Se detecta comúnmente muerte celular por la ausencia de crecimiento celular en medio de crecimiento líquido (por ejemplo, ausencia de turbidez) o sobre una superficie sólida

(por ejemplo, ausencia de formación de colonias sobre agar). Una composición antibacteriana y/o antimicrobiana puede ser eficaz para reducir la tasa de crecimiento y/o provocar muerte celular para virus, mohos y hongos. Una composición que es bacteriostática a una concentración dada puede ser bactericida a una concentración superior, mientras que otras composiciones bacteriostáticas determinadas no son bactericidas a ninguna concentración.

5 El término "bacterias" y "bacteria" se refieren a todos los organismos procariotas, incluyendo aquellos dentro de todos los fila del reino procariota. Se pretende que el término abarque todos los microorganismos que se considera que son bacterias incluyendo, pero sin limitarse a, clostridios, *Bacillus*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Actinomyces*, *Streptomyces* y *Rickettsia*. Todas las formas de bacterias se incluyen dentro de esta definición incluyendo cocos, bacilos, espiroquetas, esferoplastos, protoplastos, esporas, etc. También se incluyen dentro de este término organismos procariotas que son Gram-negativos o Gram-positivos. "Gram-negativo" y "Gram-positivo" se refieren a patrones de tinción con el proceso de tinción de Gram. Finegold y Martin, En: Diagnostic Microbiology, 6ª ed. (1982), C. V. Mosby St. Louis, págs. 13-15. Las "bacterias Gram-positivas" son bacterias que conservan el colorante primario usado en la tinción de Gram, provocando que las células teñidas aparezcan de color azul oscuro a púrpura bajo el microscopio. Las "bacterias Gram-negativas" no conservan el colorante primario usado en la tinción de Gram, sino que se tiñen por una contratinción. Por tanto, las bacterias Gram-negativas aparecen de color rojo.

20 El término "agente de prueba" se refiere a un agente que va a examinarse en uno o más de los ensayos descritos en el presente documento. El agente puede ser prácticamente cualquier compuesto químico. Puede existir como compuesto aislado individual o puede ser un miembro de una biblioteca química (por ejemplo, combinatoria). En una realización particularmente preferida, el agente de prueba será una molécula orgánica pequeña.

25 El término "molécula orgánica pequeña" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas usadas generalmente en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas oscilan en tamaño entre aproximadamente 10 Da y aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

30 El término "marcador" o "marcador detectable" se usa en el presente documento para referirse a cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Tales marcadores incluyen biotina para teñir con conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads®), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y marcadores calorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.ºs 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241 (todas incorporadas en el presente documento como referencia). Los marcadores contemplados en la presente invención pueden detectarse mediante muchos métodos. Por ejemplo, pueden detectarse radiomarcadores usando película fotográfica o contadores de centelleo, pueden detectarse marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y se detectan marcadores calorimétricos simplemente visualizando el marcador coloreado.

45 El término "tensioactivo primario" tal como se usa en el presente documento significa cualquier tensioactivo que actúa tras o conjuntamente con un fenol sustituido potenciando adicionalmente, o al menos, no reduciendo significativamente la actividad de control de infecciones de un fenol sustituido.

50 El término "inhibir", "alterar", "desplazar", "antagonizar" o "bloquear" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier medio en el que una espora microbiana y/o proteína de superficie de esporas microbianas se elimina de, y/o se impide que se una a, una superficie sustrato.

55 El término "antagonista" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que pueda impedir la unión de un microbio (es decir, por ejemplo, bacterias, virus, moho, hongos, etc.) y/o un componente reproductor del microbio (es decir, por ejemplo, una espora) a una superficie. El "antagonista" puede impedir la unión o bien mediante desplazamiento competitivo formando una pareja de unión (es decir, por ejemplo, estable o transitoria) con el microbio y/o componente reproductor del microbio. Por ejemplo, un antagonista puede prevenir la unión de una espora bacteriana a una superficie uniéndose a una proteína de superficie de esporas.

60 El término "antagonista de unión" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que pueda formar una pareja de unión con o bien una proteína de capa de pelusa de esporas microbianas (es decir, por ejemplo, una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*) o bien una superficie sustrato. La formación de cualquier pareja de unión impide y/o desplaza la unión de una espora microbiana a una superficie sustrato.

65 El término "superficie sustrato" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material que comprende un sitio de unión para la unión de una proteína de superficie de esporas microbianas. Una superficie

sustrato puede incluir pero no se limita a, una superficie animada y/o una superficie inanimada.

El término “superficie inanimada” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material no vivo. Por ejemplo, una superficie inanimada puede incluir pero no se limita a, vinilo, acero inoxidable, plástico, madera, cerámica, vidrio, cromo, azulejos, etc. Tales superficies se encuentran comúnmente pero sin limitarse a en mostradores, sillas, mesas, equipo quirúrgico, dispositivos médicos, suelos, paredes, ventanas, fregaderos, vitrinas, etc.

El término “superficie animada” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material vivo. Por ejemplo, una superficie animada puede incluir pero no se limita a, superficies cutánea epidérmicas, superficies de tejido epitelial mucoso y/o superficies de órganos internos. Tal como se usa en el presente documento, el término “superficie animada” también comprende superficies vegetativas incluyendo pero sin limitarse a, superficies de frutas (es decir, por ejemplo, fresas, manzanas, naranjas, mandarinas, etc.), superficies de verduras (berenjena, calabaza, tomates, patata, etc.), superficies de legumbres (es decir, por ejemplo, cacahuets, anacardos, judías, etc.), superficies de cereales (es decir, por ejemplo, trigo, soja, arroz, centeno, etc.), superficies de flores, superficies de tallos, superficies de pedúnculos, superficies de hojas, superficies de corteza, superficies de ramas, superficies de ramificaciones, etc.

El término “antagonista de interacción” tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que pueda interferir con la formación de una pareja de unión de proteína de capa de pelusa de esporas microbianas/superficie sustrato.

El término “unión” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier interacción entre una composición para el control de infecciones y una superficie. Tal superficie se define como “superficie de unión”. La unión puede ser reversible o irreversible. Tal unión puede ser, pero no se limita a, unión no covalente, unión covalente, unión iónica, fuerzas de Van der Waals o fricción, y similares. Una composición para el control de infecciones se une a una superficie si se impregna, incorpora, recubre, está en suspensión con, está en disolución con, se mezcla con, etc.

El término “composición de prueba de control de infecciones”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la colección de compuestos que van a examinarse para determinar su capacidad para impedir la unión de esporas microbianas a una superficie. Tales composiciones de prueba pueden incluir, pero no se limitan a, una amplia variedad de diferentes compuestos, incluyendo compuestos químicos, mezclas de compuestos químicos, por ejemplo, polisacáridos, moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas, macromoléculas biológicas, por ejemplo, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos o un extracto preparado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales, composiciones que se producen de manera natural o sintéticas.

El término “en riesgo” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier persona o superficie inanimada que tiene una probabilidad mayor del promedio (es decir, mayor del 50%) de contaminarse con un microbio. Pueden encontrarse probabilidades de exposición “en riesgo” en vocaciones tales como personal de emergencias incluyendo, pero sin limitarse a, bomberos, policías, personal médico de urgencias. Pueden encontrarse también probabilidades de exposición “en riesgo” en vocaciones tales como trabajadores sanitarios incluyendo, pero sin limitarse a, médicos, enfermeras, auxiliares, personal de limpieza del hospital y similares. Pueden encontrarse también probabilidades de exposición “en riesgo” en vocaciones tales como personal militar incluyendo, pero sin limitarse a, personal del ejército de tierra, personal de la armada, personal del ejército del aire, personal de los marines, personal de la Guardia Nacional, personal de la Guardia Costera. También pueden encontrarse probabilidades de exposición “en riesgo” en pacientes médicos, incluyendo, pero sin limitarse a, pacientes inmunocomprometidos, pacientes con quemaduras, pacientes con disparos, etc.

El término “patrón de sitio de unión específica” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier conjunto reproducible de sitios de unión en o bien una superficie corporal o bien una superficie inanimada. Tales sitios de unión tienen afinidad inherente por composiciones que incluyen, pero no se limitan a, espora microbianas, composiciones para el control de infecciones o moléculas orgánicas pequeñas tal como se comenta en el presente documento. Aunque no es necesario entender el mecanismo de una invención, se cree que un patrón de unión de este tipo es un resultado de disposiciones únicas de grupos químicos de superficie y/o topografía que es compatible tridimensionalmente (es decir, por ejemplo, por medio de interacciones de grupos químicos estereoespecíficos) con una composición. Se cree además que un patrón de sitio de unión específica predice una disposición de unión no específica (es decir, la unión no mediada por un receptor especializado) dentro de un área de superficie designada.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 presenta una micrografía electrónica de barrido a modo de ejemplo de endosporas de *C. sporogens* (S) que tienen proyecciones de membrana exosporial largas, sinuosas o filiformes (flechas). Las proyecciones orientadas hacia la superficie forman contactos firmes.

Figura 2 presenta una micrografía electrónica a modo de ejemplo que muestra una endospora elíptica, de superficie

lisa de *C. difficile* 43594 antes de la activación (recuadro) y cubierta con proyecciones exosporiales (flechas) tras la activación.

5 La figura 3 presenta una micrografía electrónica a modo de ejemplo que muestra una espora de *C. difficile* 43594 a medida que avanza la germinación en la que una membrana exosporial está cubierta con protuberancias pequeñas y una estructura de anclaje gruesa en un polo, designado región de cola (T, *tail*).

10 La figura 4 presenta datos a modo de ejemplo que muestran un gel de SDS-PAGE que identifica las proteínas de esporas totales presentes en la banda de 18 kDa (véase la flecha). Esta banda de 18 kDa se corresponde con las bandas de 18 kDa de la inmunotransferencia de tipo Western que pueden hibridarse con anticuerpos frente a *C. difficile*.

15 La figura 5 presenta datos a modo de ejemplo que muestran un gel de SDS-PAGE que identifica las proteínas de esporas totales presentes en las bandas de 140, 150 y 10 kDa (véanse p1, p2 y p3, respectivamente). Estas bandas de 140, 150 y 10 kDa se corresponden con las bandas de 140, 150, y 160 kDa de la inmunotransferencia de tipo Western que pueden hibridarse con anticuerpos frente a *C. difficile*.

20 La figura 6A presenta datos a modo de ejemplo que muestran un gel de SDS-PAGE usado para identificar proteínas de exosporio de *C. difficile* a aproximadamente 300 kDa (flecha 1); 275 kDa (flecha 2); 250 kDa (flecha 3); 160 kDa (flecha 4); 150 kDa (flecha 5); 140 kDa (flecha 6); 35 kDa (flecha 7); 28 kDa (flecha 8); y 15 kDa (flecha 9). También se identificaron otras seis bandas no hibridantes (flechas 10-15) para determinar las proteínas de exosporio no inmunorreactivas.

25 Las figuras 6B y 6C presentan datos a modo de ejemplo que muestran inmunotransferencias de tipo Western que demuestran la hibridación de anticuerpos frente a *C. difficile* con las bandas de 300 kDa (flecha 1); 275 kDa (flecha 2); 250 kDa (flecha 3); 160 kDa (flecha 4); 150 kDa (flecha 5); 140 kDa (flecha 6); 35 kDa (flecha 7); 28 kDa (flecha 8); y 15 kDa (flecha 9) correspondientes a las bandas mostradas en la figura 6A.

30 La figura 7 presenta una realización de una estructura para: monómeros de BclA (verde) y Clq (malva) (A y B), respectivamente y su superposición (C). Los extremos N y C terminales y las hebras β están marcados.

La figura 8 presenta una realización de trímeros de BelA (A) y Clq (B) observada desde el lateral y desde arriba. Los tres monómeros que comprenden cada trímero están coloreados de azul, verde y rojo.

35 La figura 9A presenta una micrografía electrónica de transmisión a modo de ejemplo de una espora de *B. cereus* ATCC 10876 que muestra el exosporio.

40 La figura 9B presenta una micrografía electrónica de transmisión a modo de ejemplo de una espora de *B. anthracis* que muestra una capa de pelusa que sobresale desde el exosporio.

La figura 9C presenta un primer plano a modo de ejemplo de una capa de exosporio de *B. anthracis* que muestra la capa de pelusa de BclA y la capa basal interior.

45 La figura 10 presenta una ilustración de realizaciones que muestra interacciones de esporas microbianas con sustratos de superficie (es decir, por ejemplo, superficies cutáneas).

La figura 10A ilustra la unión de una capa de pelusa de espora microbiana (es decir, por ejemplo, mediante proyecciones de proteína de superficie de esporas) a la capa epitelial de piel de mamífero.

50 La figura 10B ilustra la unión de una proteína de superficie de esporas microbianas (es decir, por ejemplo una proteína nativa a un sustrato de superficie) y diversas composiciones para el control de infecciones que pueden alterar la unión de la proteína de superficie de esporas microbianas a un sustrato de superficie.

55 La figura 11 presenta un esquema de una realización de un plásmido pET-19b que comprende un gen de proteína de superficie de esporas.

60 La figura 12 presenta datos a modo de ejemplo que muestran una separación electroforética en SDS-PAGE de la expresión de CD 1067 recombinante (flecha roja) a partir de un vector pET-19b. Carril 1: marcador de tamaño molecular de patrones de PM. Carril 2: muestra de 1 hora. Carril 3: muestra de 2 horas. Carril 4: muestra de 3 horas: Carril 5: muestra de 4 horas: Carril 6: muestra de 5 horas. Carril 7: muestra de 6 horas. Tinción de proteínas: azul de Coomassie.

65 La figura 13 presenta datos a modo de ejemplo que muestran el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de CD1067 recombinante (flechas rojas) a partir de un vector pET-19b. Carril 1: marcador de tamaño molecular de patrones de PM. Carril 2: muestra de 1 hora. Carril 3: muestra de 2 horas. Carril 4: muestra de 3 horas: Carril 5: muestra de 4 horas: Carril 6: muestra de 5 horas. Carril 7: muestra de 6 horas.

Figura 13A: Detección usando anticuerpo F1373 anti-*C. difficile*.

Figura 13B: Detección usando anticuerpo anti-HIS.

La figura 14 presenta datos a modo de ejemplo que muestran una separación electroforética en SDS-PAGE de la expresión de CD3620 recombinante (flecha roja) a partir de un vector pET-19b. Carril 1: marcador de tamaño molecular de patrones de PM. Carril 2: muestra de 0 horas. Carril 3: muestra de 1 hora. Carril 4: muestra de 2 horas: Carril 5: muestra de 3 horas: Carril 6: muestra de 4 horas. Carril 7: muestra de 4,5 horas. Tinción de proteínas: azul de Coomassie.

La figura 15 presenta datos a modo de ejemplo que muestran el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de CD3620 recombinante (flechas rojas) a partir de un vector pET-19b. Carril 1: marcador de tamaño molecular de patrones de PM. Carril 2: muestra de 0 horas. Carril 3: muestra de 1 hora. Carril 4: muestra de 2 horas: Carril 5: muestra de 3 horas: Carril 6: muestra de 4 horas. Carril 7: muestra de 4,5 horas.

Figura 15A: Detección usando anticuerpo F1373 anti-*C. difficile*.

Figura 15B: Detección usando anticuerpo anti-HIS.

La figura 16 presenta datos a modo de ejemplo que muestran datos de control de la detección mediante anticuerpos para la expresión de CD3620 recombinante (flechas rojas) a partir de un vector pET-19b. Carril 1: marcador de tamaño molecular de patrones de PM. Carril 2: muestra de pJEB02 de 6 horas. Carril 3: muestra de pJEB03 de 4,5 horas.

Figura 16A: Separación mediante electroforesis de SDS-PAGE con referencia a azul de Coomassie que identifica CD1067 recombinante (flecha roja superior) y CD3620 recombinante (flecha roja inferior).

Figura 16B: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando detección con F1373 preinmunitaria.

Figura 16C: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando detección con F1997 preinmunitaria.

Figura 16D: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando detección mediante anticuerpo F1997 anti-*C. difficile*.

La figura 17 ilustra varias realizaciones de un método para eliminar un recubrimiento de exosporio de *C. difficile* (véase el ejemplo IV).

La figura 18A representa una espora de *C. difficile* 630 representativa que puede usarse como material de partida.

La figura 18B representa una espora de *C. difficile* 630 representativa tras la separación del exosporio.

La figura 18C representa una espora de *C. difficile* 630 representativa purificada y concentrada tras la separación del exosporio.

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere al campo del control de infecciones. En particular, se describen composiciones y métodos para el mantenimiento de condiciones asépticas, descontaminación bacteriana y/o profilaxis de la exposición bacteriana. En una realización, se describen composiciones para el control de infecciones que inhiben la unión de esporas microbianas a una superficie sustrato. Por ejemplo, la inhibición altera y/o desplaza una interacción, unión y/o estabilización de una espora microbiana a una superficie sustrato.

Durante aproximadamente 70 años, la primera línea de defensa frente a la infección bacteriana han sido los antibióticos. Los primeros antibióticos se usaron clínicamente en las décadas de 1940 y 1950, y su uso ha ido creciendo significativamente desde ese periodo. Aunque son avance inestimable, la terapia con antibióticos y antimicrobiana adolece de varios problemas. En primer lugar, los antibióticos son ineficaces contra las esporas. En segundo lugar, el desarrollo de resistencia a antibióticos es un acontecimiento grave y potencialmente mortal de importancia mundial. Por ejemplo, se sabe que algunas cepas microbianas son inmunes a la mayoría de los antibióticos disponibles (Travis, Science 264:360-362 (1994). Entre otros organismos resistentes a fármacos están: neumococos que provocan neumonía y meningitis; *Cryptosporidium* y *E. coli* que provocan diarrea; y enterococos que provocan infecciones del torrente sanguíneo, de heridas quirúrgicas y del tracto urinario (Berkelman *et al.*, J Infect Dis. 170:272-277 (1994). La presente invención contempla composiciones y métodos dirigidos a solucionar problemas referentes al control de la contaminación de esporas microbianas y a la resistencia clínica de la infección microbiana a la administración de antibióticos convencionales.

I. Esporas bacterianas

Algunos microbios diseminan esporas que entran en fase latente cuando se exponen a entornos que no favorecen su crecimiento y proliferación. La supervivencia de las esporas se potencia cuando se produce unión y/o adhesión a una superficie sólida. Cuando las condiciones del entorno cambian de nuevo favoreciendo el crecimiento y la proliferación, la spora microbiana germina y se desarrolla contaminando la zona circundante. Una persona o animal que entre en contacto con el nuevo crecimiento microbiano en proliferación se infecta a partir de una zona que no se sabía anteriormente que estaba contaminada. En algunos casos, una persona y/o animal puede entrar en contacto con la spora microbiana, desarrollándose la germinación e infección tras el contacto. Alternativamente, tal germinación de esporas no detectada puede dar como resultado deterioro de alimentos iniciando de ese modo brotes de enfermedad transmitida por alimentos. Debido a su relativa resistencia a agentes de esterilización químicos y físicos, las esporas de estas bacterias se usan como indicadores de la eficacia de esterilización para tratamientos que implican humedad y calor seco, irradiación UV y peróxido de hidrógeno. Ito *et al.*, "Sterilization of packaging materials using aseptic systems" *Food Technol.* 38:60-62 (1984).

Es importante una comprensión de las propiedades de superficie de esporas bacterianas y sus interacciones con sustratos animados e inanimados para la selección de materiales de envasado y para la evaluación de los procedimientos de esterilización de superficies usados en el envasado de alimentos, agentes farmacéuticos y suministros médicos. Por ejemplo, está bien aceptado el papel de interacciones hidrófobas en la adhesión de bacterias (es decir, la célula vegetativa) a las superficies de materiales inertes. Sin embargo, relativamente pocos estudios han examinado concienzudamente la hidrofobicidad de superficie de esporas bacterianas o la adhesión de esporas a sustratos inanimados. La hidrofobicidad de esporas bacterianas puede determinarse aplicando metodologías usadas para medir la hidrofobicidad de células vegetativas. Las técnicas establecidas para medir la hidrofobicidad de superficie incluyen, pero no se limitan a: i) adherencia a hidrocarburos (Beck *et al.*, "Effect of growth on surface charge and hydrophobicity of *Staphylococcus aureus*" *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* (París) 139:655-664 (1988)); ii) cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (Doile *et al.*, "Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores" *Curro Microbiol.* 10:329-332 (1984)); iii) agregación de sales (Takubo *et al.*, "Isolation and characterization of outermost layer deficient mutant spores of *Bacillus megaterium*" *Microbiol. Immunol.* 9:973-979 (1988)); iv) mediciones del ángulo de contacto (Minagi *et al.*, "Cell-surface hydrophobicity of *Candida* species as determined by the contact-angle and hydrocarbon-adherence methods" *J. Gen. Microbiol.* 132:1111-1115 (1986)); y v) adherencia bacteriana a hexadecano (BATH) (Wienek *et al.*, "Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores" *Appl Environ Microbiol* 56:2600-2605 (1990)).

Estudios demuestran que la hidrofobicidad de las esporas varía entre especies y cepas. Sin embargo, para cada organismo, se cree que la hidrofobicidad de esporas es mayor que la hidrofobicidad de células vegetativas. Además, un tratamiento térmico moderado aumenta la hidrofobicidad de la mayoría de las esporas de *Bacillus*. Una hipótesis sugiere que los aumentos en la hidrofobicidad de esporas tras tratamiento térmico pueden resultar de la alteración del recubrimiento externo o proteínas del exosporio.

Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que el aumento de la hidrofobicidad de esporas bacterianas se debe a la relativa abundancia de proteínas en los recubrimientos externos y el exosporio en comparación con peptidoglucano en células vegetativas. Doile *et al.*, "Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores" *Curro Microbiol.* 10:329-332 (1984); Matz *et al.*, "Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*" *J. Bacteriol.* 101:196-201 (1970); y Takumi *et al.*, "Isolation and partial characterization of exosporium from spores of a highly sporogenic mutant of *Clostridium botulinum* type A" *Microbiol. Immunol.* 28:443-454 (1979). Se ha notificado recientemente una asociación entre la hidrofobicidad de esporas y la presencia de un exosporio para varias especies de *Bacillus*. Kjelleberg, S. "Adhesion to inanimate surfaces" En: *Microbial adhesion and aggregation*, págs. 51-70. K. C. Marshall (ed.), Springer-Verlag KG, Berlín (1984). Se observó una disminución de la hidrofobicidad de esporas de *B. cereus* T cuando se eliminaron las superficies de las esporas mediante tratamientos químicos. Kutima *et al.*, "Involvement of the spore surface in germination of *Bacillus cereus* T spores" *Appl. Environ. Microbiol.* 53:47-52 (1987). También se han observado disminuciones en las hidrofobicidades de esporas en mutantes negativos para el recubrimiento externo "deficientes" de *B. megaterium* (QMB1551: ATCC 12872). Takubo *et al.*, "Isolation and characterization of outermost layer deficient mutant 15 spores of *Bacillus megaterium*" *Microbiol. Immunol.* 9:973-979 (1988); y Koshikawa *et al.*, "Surface hydrophobicity of spores of *Bacillus* spp". *J. Gen. Microbiol.* 135:2717-2722 (1989). Estas observaciones sugieren que los recubrimientos externos del exosporio desempeñan un papel en la hidrofobicidad de esporas.

Se describen composiciones y métodos para mejorar la higiene de superficies, esterilización de equipo y/o materiales de envasado usados en las industrias médica, farmacéutica y/o alimentaria. En una realización, se describen composiciones y métodos para mejorar la higiene cutánea.

A. Proteínas de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Se cree que las bacterias del género *Clostridium* producen enfermedades tales como incluyendo, pero sin limitarse a, gangrena gaseosa, infecciones de heridas, botulismo, tétanos, colitis pseudomembranosa, septicemia o diarrea nosocomial. Este género sobrevive bien en condiciones adversas formando endosporas deshidratadas que son

altamente resistentes al calor, los productos químicos y la radiación. Estas esporas pueden encontrarse en el suelo, transportarse por el viento, recuperarse de los tractos digestivo y genitourinario de mamíferos, y tienen la capacidad de permanecer latentes durante periodos de tiempo muy prolongados hasta que las condiciones para el crecimiento soportan la activación y germinación de esporas.

Las esporas de *C. difficile* esporas son prevalentes dentro de entornos sanitarios y hospitalarios. Las esporas de *C. difficile* sobreviven sobre superficies animadas y/o inanimadas durante un periodo prolongado, son resistentes a muchos desinfectantes y antibióticos y se transmiten fácilmente de paciente a paciente. La comprensión de la unión de esporas de *C. difficile* a superficies, así como la esporulación y germinación, ayudarán en la prevención, el control y el tratamiento de la enfermedad asociada a *C. difficile*. Por ejemplo, *C. difficile* carece de varios genes que están implicados en el sistema de transmisión de fosfato que desencadena el proceso de esporulación en especies de *Bacillus*; éste y otros aspectos del sistema de esporulación en *Clostridium spp* se han revisado recientemente. Paredes *et al.*, "A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology" *Nat. Rev. Microbiol.* 3:969-978 (2005). Además, *C. difficile* también carece de un operón *ger* tricistrónico que está presente habitualmente en la mayoría de las especies de *Bacillus* y *Clostridium*. Moir *et al.*, "Spore germination" *Cell Mol Life Sci.* 59:403-409 (2002); y Broussolle *et al.*, "Molecular and physiological characterisation of spore germination in *Clostridium botulinum* y *C. sporogenes*" *Anaerobe* 8:89-100 (2002). Estas observaciones sugieren que los receptores de germinación de *C. difficile* son sustancialmente diferentes de, y no deben identificarse basándose en la similitud de secuencia a, otros *Clostridium spp.* y *Bacillus spp.*

La resistencia de las esporas microbianas al calor, disolventes, enzimas, detergentes, radiación ultravioleta e ionizante, hidróxido de sodio, etanol, ácido per fórmico, fenol, frío y la mayoría de los esporicidas, así como su capacidad para crecer agresivamente cuando las condiciones son óptimas, las convierten en una amenaza grave para la salud animal y especialmente humana. Tipper *et al.*, "Structure of the bacterial endospore" En: *Spores V*, Ed. H. Halvorson, R. Hanson y L. Campbell. Amer. Soc. for Microbiol., Bethesda, Maryland, 3-12 (1972); y Russell, A., "Bacterial spores and chemical sporicidal agents" *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 99-119 (1990). La adquisición nosocomial de infección por *Clostridium difficile* en hospitales y enfermerías presenta un grave problema epidemiológico porque se encuentran esporas sobre paredes, suelos, utensilios, sábanas y sobre las manos de los cuidadores en instalaciones sanitarias. Las esporas parecen infectar fácilmente a individuos incluyendo, pero sin limitarse a, los que tienen: i) una flora intestinal alterada por terapia con antibióticos; ii) un sistema inmunitario inmunocomprometido o iii) requieren enemas múltiples en relación con pruebas de diagnóstico o tratamiento. Zaleznik, D. "*Clostridium difficile*: an important nosocomial pathogen for the 1990s" *Clin. Microbiol. Newsletter* 13, 145-152 (1991).

Los exosporios de dos especies de esporas de *Clostridium* (es decir, por ejemplo, *Clostridium sporogenes* ATCC 3584 y *C. difficile* ATCC 9689 y ATCC 43594) pueden desempeñar un papel en la unión, germinación y/o colonización. Panessa-Warren *et al.*, "Exosporial membrane plasticity of *Clostridium sporogens* and *Clostridium difficile*" *Issue & Cell* 29:449-461 (1997). Estaba asociado un cambio ultraestructural con la germinación y la excrecencia de apéndices de esporas de *C. bifementans* pero no se determinó ninguna función específica. Samsonoff *et al.*, "Ultrastructural changes associated with germination and outgrowth of an appendage-bearing clostridial spore" *J Bacteriol.*, 101, 1038-1045 (1970). El examen de esporas de *C. sporogenes* mediante microscopía electrónica de transmisión de secciones delgadas reveló una capa externa exosporial, con proyecciones similares a cabellos, pero no se ofreció ninguna discusión referente a la distribución, función o aspecto en relación con la colonización de *Clostridium*. Hoeniger *et al.*, "Ultrastructural aspects of spore germination and outgrowth in *Clostridium sporogenes*" *Can. J Microbiol.*, 15, 1061-1065 (1969). Se sabe que la reconstrucción de secciones delgadas para microscopía electrónica de transmisión tiene problemas significativos cuando se observa e interpreta la morfología exosporial de numerosas esporas de una vez, y los problemas asociados con la obtención de cortes de secciones delgadas de tales uniones de esporas pequeñas, delicadas y de tinción escasa a un sustrato nutritivo.

Las esporas de *C. sporogenes* pueden presentar fases morfológicas específicas una vez que se interrumpe el periodo latente, y el exosporio parece desempeñar un papel activo en la germinación, excrecencia, proliferación vegetativa y colonización satisfactorios de un sitio de unión a superficie sustrato. Panessa-Warren *et al.*, "Electron microscopy of *C. sporogenes* endospore attachment and germination" *Scanning* 16, 227-240 (1994). Se cree que un exosporio de *Clostridium* es una capa "membranosa" externa de una espора, se ha descrito como participante pasivo en la germinación. Sin embargo, una vez que se interrumpe el periodo latente, las esporas de *C. sporogenes* ATCC 3584 parecen producir estructuras morfológicas exosporiales muy específicas visibles mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), lo que parece facilitar la unión de una espора a un sustrato u otras esporas (es decir, por ejemplo, coagregación de esporas). Posteriormente se reemplazan las proyecciones exosporiales por un pedúnculo individual que se extiende desde la parte distal (es decir, por ejemplo, la región de la cola) de la espора, lo que parece anclar la espора durante las fases finales de desarrollo y excrecencia de células vegetativas.

Durante las fases iniciales de la unión de *C. sporogenes*, proyecciones filiformes delicadas de la membrana exosporial se extienden hacia fuera uniéndose algunas de las proyecciones más cortas a una superficie. Véase la figura I, flechas blancas. Habitualmente se originan proyecciones filamentosas largas de la membrana exosporial a partir de la parte superior o los laterales de la espора, y se extienden hasta cualquier superficie o hasta las esporas vecinas más cercanas, uniéndose las esporas entre sí (coagregación). Las proyecciones de membranas exosporiales aparecen por toda la superficie externa de una espора activada de *C. sporogenes* desarrollándose

finalmente en una única estructura de unión gruesa que se extiende hasta una superficie, que parece anclar la espora.

A diferencia de *C. sporogenes*, *C. difficile* tiene un número reducido de esporas unidas y requiere un tiempo de incubación más largo para permitir que tenga lugar la unión. Las esporas de *C. difficile* latentes son pequeñas (aproximadamente 2,0 µm de longitud x 1,1 µm de anchura), elípticas y predominantemente lisas. Véase la figura 2, recuadro. Una vez que ha comenzado la activación, las esporas presentaban prominencias pequeñas que cubrían el exosporio. Véase la figura 3. En la fase temprana de unión, *C. difficile* 43594 desarrolló protuberancias exosporiales y bultos que cubrían toda la superficie de la espora alargada. Estas esporas desarrollaron más proyecciones exosporiales alargadas en la región de la cola, que se reemplazaron posteriormente durante el ciclo de germinación por una estructura de unión engrosada. Figura 3, flechas negras. A diferencia de *C. sporogenes*, *C. difficile* presenta menos extensiones exosporiales de membrana pero produce una extensión exosporial de membrana engrosada que se desarrolló en el extremo de la cola de la espora.

La capacidad de esporas de *C. sporogenes* y *C. difficile* para permanecer unidas a una superficie de agar durante la agitación (es decir, por ejemplo, una centrifugación de 300 rpm) en agua o tampón, sugiere fuertemente que estas esporas tienen un medio de adhesión y/o unión formidable a superficies. En condiciones ideales, se ha observado que la unión de *C. sporogenes* a una superficie de agar tiene lugar en el plazo de 27 min tras la inoculación. En condiciones anaerobias sobre agar reducido previamente, se ha observado que la unión máxima de esporas de *C. sporogenes* tiene lugar en el plazo de 88 a 105 min. La unión de esporas de *C. difficile* tardó considerablemente más, por ejemplo, 105 min para *C. difficile* 9689 y 180 min para *C. difficile* ATCC 43594.

Una vez unidas, las esporas pueden permanecer firmemente ancladas a una superficie sólida. *C. difficile* 43594 parece ser única porque las esporas se unen muy lentamente. Sin embargo, *C. difficile* puede tener una respuesta adaptativa que acelera la unión tras la exposición a una superficie animada. Por ejemplo, se ha notificado un aumento de la infección nosocomial por *C. difficile* en pacientes que tienen motilidad intestinal aumentada y en los que se han sometido a enemas múltiples. Bartlett, J. "Introduction" En: *Clostridium Difficile: Its Role in Intestinal Disease*, Ed. R. Rolfe y S. Finegold. Academic Press, Nueva York, págs. 113 (1988); Silva, J. Jr., "Prevention of *Clostridium difficile*-associated intestinal disease" En: *Clostridium difficile: Its Role in Intestinal Disease*, Ed. R. Rolfe y S. Finegold. 30 Academic Press, Nueva York, págs. 368-378 (1988); y McFarland *et al.*, "Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *New Engl. J Med.*, 320:204-210 (1989). Pueden encontrarse rutinariamente esporas de *C. difficile* en el tracto digestivo de individuos sanos, no sintomáticos. En consecuencia, un mecanismo de desencadenamiento que inicia la unión al intestino y comienza el proceso infeccioso puede ser una combinación de pérdida de la flora normal (es decir, por ejemplo, provocada por antibióticos, enfermedad o enemas repetidos) y/o hipermovilidad del colon.

Las excrescencias de unión de exosporio de esporas de *Clostridium* tienen un diámetro de aproximadamente 7 nm y pueden variar en longitud entre 0,1 y 2,9 nm. Estas excrescencias comprenden fibrillas que tienen habitualmente menos de 200 nm de longitud y pueden ser extremadamente delicadas. Hancock, I, "Microbial cell surface architecture" En: *Microbial Cell Surface Analysis*, Ed. N. Mozes, P. Handley, H. Busscher y P. Rouxhet, VCH Publishers, Nueva York, págs. 23-59 (1991). Habitualmente las excrescencias de exosporios de *C. sporogenes* miden de 85 a 1015 nm de anchura, sin embargo, algunas excrescencias, especialmente las que también comprenden uniones de coagregación, pueden ser tan largas como 2000 nm de longitud. Los salientes similares a bultos de exosporio de *C. sporogenes* pueden oscilar entre 68 y 75 nm de diámetro, y las proyecciones hinchadas observadas en las últimas fases de germinación pueden ser tan grandes como de 180 a 240 nm de diámetro.

Claramente, el exosporio de esporas, que se ha pensado siempre que es "un participante pasivo en la germinación", parece desempeñar un papel activo en la unión y colonización de esporas de *C. sporogenes* y *C. difficile*. En una realización, una proteína de *C. difficile* se deriva de una capa de superficie de exosporio, en la que la capa de exosporio comprende la proteína más exterior de una espora de *C. difficile*. En una realización, la presente invención contempla una composición que comprende al menos una proteína de superficie más exterior de la espora de *Clostridium difficile*. En una realización, la proteína de superficie comprende una proteína de superficie de esporas. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que estas proteínas de superficie de esporas presentan una superficie de contacto entre la espora bacteriana y un sitio de unión a superficie sustrato. También se cree que estas proteínas pueden usarse para definir interacciones de unión molecular incluyendo, pero sin limitarse a: i) entre la espora y superficies animadas; y ii) entre la espora y superficies inanimadas. En la tabla I se presentan caracterizaciones de tamaño de proteínas de exosporio de *Clostridium difficile*.

Tabla I. Caracterizaciones de tamaño de proteínas de exosporio de *Clostridium difficile* representativas

Proteína (nombre alternativo)	Tamaño (kDa)	N.º de gen BAS	GI
CD 1581	20	1581	126699184
CD 1067	47	1067	126698654
CD 3620	14	3620	126701246

ES 2 544 435 T3

CD 1613	35	1613	126699217
CD 1711	12	1711	126699318
Proteína de superficie de esporas supuesta	22	598	126698176
Proteína de superficie de esporas supuesta	22	2401	126700016
Superóxido dismutasa	27	1631	126699235
Prolina racemasa supuesta	24	3237	126700857
Chaperonina de 60 kDa	58	0194	126697767
Proteína chaperona	67	2461	126700078
Chaperonina de 10 kDa	10	0193	126697766
Piruvato-flavodoxina oxidorreductasa	130	2682	126700296
CD 0881	36	0881	126698458
CD 1511	35	1511	126699115
Proteína de superficie celular	76	2793	126700409
3-hidroxibutil-CoA deshidrogenasa	31	1058	126698642
Enzima lítica de corteza de esporas supuesta	47	0551	126698130
Transportador ABC de sulfonatos alifáticos supuesto, lipoproteína de unión a sustrato	36	1484	126699088
Fructosa-bisfosfato aldolasa supuesta	33	0403	126697972
Dipicolinato sintasa, subunidad B	21	2967	126700588
Indolpiruvato oxidorreductasa supuesta, subunidad B	21	2380	126699995
Subunidad alfa de flavoproteína de transferencia de electrones	36	1056	126698640
Hidrolasa de pared celular relacionada con fagos supuesta	28	1898	126699508
Proteína de superficie celular	66	2791	126700407
Formiato-tetrahidrofolato ligasa	60	0718	126698298
Transportador ABC de oligopéptido, proteína de unión a sustrato	58	2672	126700286
Deshidratasa/isomerasa del metabolismo de gamma-aminobutirato	56	2341	126699959
Glutamato deshidrogenasa específica de NAD	46	0179	126697752
Aminoacil-histidina dipeptidasa supuesta	53	0708	126698287
Proteína de subunidad de prolina reductasa	68	3244	126700863
Subunidad beta de componente de complejo de glicina/sarcosina/betaina reductasa	55	2349	126699967
Subunidad de glicina deshidrogenasa	2	54	1658
Acetil CoA acetiltransferasa	41	1059	126698643
Aspartato aminotransferasa	45	1339	126698938
Proteína bifuncional supuesta: peroxidorreoxiniquitinasa	82	1433	126699037
Glicer aldehídos-3-fosfato deshidrogenasa	36	3174	126700794
Butiril-CoA deshidrogenasa	41	1054	126698638
Transportador ABC de d-ribosa, proteína de unión a sustrato	35	0300	126697872
Ruberitrina supuesta	20	1474	126699078
Succinato-semialdehído deshidrogenasa	51	2342	126699960
Oxidorreductasa, subunidad de unión a tiamina diP	39	0116	126697688

5 En una realización, pueden identificarse proteínas de *Clostridium difficile* estudiando con sonda preparaciones de proteínas de esporas totales con anticuerpos dirigidos contra esporas de *C. difficile* purificadas, intactas, para crear un complejo proteína-anticuerpo hibridado. En una realización, una proteína de superficie de esporas de *C. difficile* incluye, pero no se limita a, CD1067, CD3620, CD 1581, CD 598 o CD 2401. En una realización, están asociadas enzimas de *C. difficile* con preparaciones de proteínas de superficie de esporas de *C. difficile*.

10 En una realización, puede aislarse una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1581) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado que comprende un peso molecular que incluye, pero no se limita a, 18, 140, 150 o 160 kDa. Véanse las figuras 4-6. En una realización, la proteína hipotética (~20 kDa) comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (números de registro YP_001088081, GI: 126699184):

```

1      MENKKCYSED WYERGESTAK WFQNDREEYE REAYDEDRE RGSNCGCSDS
51     GENRPRNCER FRREAEIRER EAREAFCESS EKKKEALAYE CEARKLWEEA
101    EKYWDEYSKY NYKGI EYLAE AARLFDEGME CEARRNGNNG GNNNNCCHKC
151    HKCNCNCCRK

```

15 codificada por un ácido nucleico hipotético de *Clostridium*, SEQ ID NO: 2:

1 atggaaaata aaaaatgta ttcagaagat tggatgaaa gaggagaatc tacagctaaa
 61 tggttccaaa atgatagaga agaataatgaa agagaagcat atgatgaaga tagagaaaga
 121 agaggttcaa actgtggatg ttcagattca ggagaaaata gacctagaaa ctgtgaaaga
 181 tttagaagag aagctgagat aagagaaaga gaagcaagag aagcattctg tgaatctca
 241 gagaaaaaga aagaggcatt agcatatgaa tgtgaagcta gaaaattatg ggaagaagca
 301 gaaaaaact gggatgaata tcaaaatac aactataaag gaatcgaata ttagcagaa
 361 gctgctagat tatttgatga aggtatggaa tgtgaagcta gaagaaatgg aaataatgga
 421 ggaaacaata ataattgttg ccaataatgc cataaatgta attgtaactg ctgtagaaaa
 481 taa

5 En una realización, puede aislarse una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1067) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado que comprende un peso molecular que incluye, pero no se limita a, 140, 150 y 160 kDa. Véanse las figuras 5 y 6. En una realización, la proteína hipotética (~ 47 kDa) comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (números de registro YP_001087551; GI: 126698654):

1 MQDYKKNKRR MMNQPMSTMN EEEVYTDEIN SEDMRGFKKS HHHNGCNTDN
 51 KCECHDDCNP CNPCNPCKPN PCNPCKPNPC DDNCGCHDNC KCDCEPCEMD
 101 SDEFENKCG PECCNPISPR NFSVSNAVVF AIEANRIFDT MQFQTFTDAT
 151 GPNGEPLTFE TEVVEVFGSV PSAGQASVTI EKICLSNDGI VIDTGMTTLE
 201 DFDLPLGDIVGRNCETTFEFAVCGERNSECCRQKGSVAYKQRGLTVA
 251 VRNLVLELRG RCGCTEFVAL APPAVRAGGG CKRRVDYVEF TFNTLSAPIC
 301 LPADGRAVTL RQEYQTNLTV DCIGKSILKL ECNECCEPFY ELIIPNDIDL
 351 VLCLQETVST LISEQIVVLA SPNPIQPRLV DTFKVCDFS QCGPNHGS GK
 401 PSCHR

10

codificada por un ácido nucleico hipotético de *Clostridium*, SEQ ID NO: 4:

1 atgcaagatt ataaaaaaaa taaaagaaga atgatgaatc agccaatgac tacaatgaat
 61 gaagaagaag tgtatacaga tgaataaat tcagaagaca tgagaggttt taaaaaatca
 121 caccatcata atggatgtaa tactgataat aagtgtgagt gccatgatga ttgcaatcca
 181 tgcaacctat gtaatccatg taaacctaac ccatgcaatc catgcaaacc taatccatgt
 241 gatgacaatt gtggatgcca tgacaattgt aatgtgatt gtgaacctg tgaaatggat
 301 tcagatgaat gtttgaaaa caaatgtgga ccagaatgct gtaatcctat atcccaaga
 361 aacttctctg tatcaaatgc agtgccattt gcaatagagg ctaatagaat atttgatac
 421 atgcaattcc aacatttac agatgcaaca ggaccaaatg gagagccatt aactttgaa
 481 acagaagtag tagaagtatt tggttcagtt ccaagtgcag gtcaagcaag tgtaactata
 541 gaaaaaatat gcttaagtaa tgatggaatc gttatagaca caggaatgac aactttgaa
 601 gatttcgatt tagaccatt aggagatata gtaggaagaa actgtgaaac aactttgaa
 661 ttgcagttt gtggagaaag aaactctgag tgctgtagac aaggaaaagg caaatcagta
 721 gcttataaac aaagaggatt aactgtagca gttcgttaatt tagtactaga gctaagaggt
 781 agatgtggat gtacagagtt cgttcatta gtttccag cagttagagc aggaggtgga
 841 tgtaagagaa gattgatta ttagaattt actttaaca cactttcagc accaatatgc
 901 ttgccagctg acggaagagc tgtacttta agacaagaat atcaactaa cttactgtg
 961 gattgtatag gaaaatctat attaaaatta gaatgcaacg aatgtgtga acctttctat
 1021 gaattaatta taccaaatga tatagattta gtactttgct tacaagaaac agttagcaca
 1081 ttaataagtg aacaatagt agtttagca tcaccaaact caatccaacc aagactgtt
 1141 gatacttct ctaaagtatg tgattttcg caatgtggac ctaatcatgg aagtggaaag
 1201 ccaagttgcc acagatag

15

En una realización, puede aislarse una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 3620) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado que comprende un peso molecular que incluye, pero no se limita a, 140 kDa. Véanse las figuras 5 y 6. En una realización, la proteína hipotética (~ 14 kDa) comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (números de registro YP 001090143; GI: 126701246):

20

1 MYDDYKYNKC NKCYNDYEEM THVHEYSSESV KLAEECEDRH NHRAAGVTGE
 51 AIPINGGTNH VHKINDNVDF LDHFHKICVT TGPAIRIPGT DKHHILICGE
 101 TTVNDGHCHKFLFTTQIEAPLV

codificada por un ácido nucleico hipotético de *Clostridium*, SEQ ID NO: 6:

ES 2 544 435 T3

```

1      ttatactaaa ggtgcttcta ttgagtagt aaaaaggaat ttatgacaat gaccatcatt
61     aacagtagtt tctccacata ttaagtgaat gtgtttatca gttccagga ttctaattgc
121    tggccctgtt gtaacacata tcttatgaaa atggtaagg aaatctacat tatcatttat
181    tttatgaaca tgattgtac ctccattat tggtagct tcaccagtaa ccctgctgc
241    acggtggtta tgtctatct cacattctc tgctaacta acactttctg aatattcatg
301    aacatgtgct atttctcat aatcattata gcactgttg cacttattgt atttataatc
361    atcatacac
  
```

5 En una realización, puede aislarse una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1613) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado. En una realización, la proteína hipotética comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (número de registro YP 001088114):

```

1      mennkredf rftqeyedy pntneryyen yqvadryyny pnkykepik qccecksmre
61     alellrydal rpfvnuqfa fisdffivga nlvgidlsap pkdnlsldg tferfsacnc
121    dlidiagrvs ypipvptle glintigtip gvaelialid avipptidlg aildailai
181    idfilaastp lanvdlasl nlkavafdit padyedfias lgyyldkkhy kecnncdcd
241    dcccnkgild nlymsninnq vtvvagslvl tgvevlgkkn dvivlgnsnd sriyfcvds
301    idyia
  
```

10 codificada por un ácido nucleico hipotético de *Clostridium*, SEQ ID NO: 8:

```

1      ttatgcaata taactatag aatctacaca tacaagat attcttgaat cattagaatt
61     tccaagtact ataacatcat tttcttacc tagaacttca acaccagga gaaccaaact
121    accagtact acagtaact gattattat attgacata taaagattat ctaggataacc
181    ttattacaa cagcaatcat cacaatcgca gttacaatta cattctttgt aatgttttt
241    atcaagatag taacctaaag atgctatgaa atctcataa tctgcaggtg taatatcaaa
301    tgcaacagct ttaagattac acaatgatgc taaatctacg ttgctaag gagtagatgc
361    agcaagtata aatcaatta tagcagcaag tattgcatct aatatagccc caaggtctat
421    cgtaggagga ataactgcat caataagtc aattaattca gctactctg gtagtctcc
481    tatagtatta attaatccct caagagtaa agggactgga ataggataag atactctacc
541    agctatatct attaaatcac agttacaagc agaaaatct tcaaaagtac catcaagtc
601    agataaata tctttggag gagctgaaag atctatact accaaattag caactactat
661    aaagaaatc gagataaaag caaattgatt aaagttaca aaaggtctta gagcatcata
721    tcttagaagt tcaaggcct ctctatact tttttacaa caacattgtt ttatttagg
781    ttctttat ttattggat aattatagta tctatcagct actgataat tttcatagta
841    tcttcattt gtattggat aatctctc atattctgt gtaaatctaa agtctctct
901    acattatta tttccac
  
```

15 En una realización, puede aislarse una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1711) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado. En una realización, la proteína hipotética comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9:

```

1      mlivttekve gkkiskvlg l vrgstirakh vgkdigasfk nlvggeltgy
51     nemltearqi aigrmvedae akganaviaf rlssasvmqg aaemlaygta
101    vvleddnsil ek:
  
```

20 codificada por un ácido nucleico hipotético de *Clostridium*, SEQ ID NO: 10:

```

1      atgttaatag taactacaga aaaagtagaa ggtaaaaaga tatcaaaggt ttaggatta gtgagaggaa
71     gtacaataag agcaaaacat gttggaaaag atataggagc aagttttaa aatctgttg gaggagaact
141    tactggat atgaaatgc tactgaagc aagacaaatt gccatagga gaatggtga agatgcagaa
211    gctaaagtg caaacgact aatagcatt agactgtct cagctcagt tatgcaagg ggcagcagaa
281    tgctgctta tggaacagca gttgtttag aagatgataa tagtattctt gaaaaataa
  
```

25 En una realización, puede aislarse una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 0881) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado. En una realización, la proteína hipotética comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11:

ES 2 544 435 T3

1 mgtkivlsiv livvvvaisl tcirvikqsk vgiimrlgkf qkvaetgvhflipfldkmay
 61 vidlireivid fppqpvitkd nvtmqidtvv yykvtdpvry vfeianpiaa ientattlr
 121 niigeldlde tltsrdiin v kmrtildeat dkwgikvnr v elknimppqd iqvamekqmr
 181 aererreail qaegnksaai lqaegekqsa iltaeakkea mvrvaegeke sailvaegea
 241 eairqtaiak aqgeaemikr tqmataeglk lvfsamkead idnnilalks mealeknaeg
 301 kstklvlpse avnflgtfkg ikevmsddnk evidikevln dneslkk

codificada por un ácido nucleico hipotético de *Clostridium*, SEQ ID NO: 12

1 atgggtacta aaattgttt aagtattgta ttaatagtag tagtcgtagc aataagttta
 61 actgtataa gagttataa acaatctaaa gtaggtataa taatgagact tgtaagttt
 121 caaaaagtgg ctgaacaggg tgtacattc ttaataccat ttttagataa aatggcatat
 181 gtaattgacc itagagaaat tgtaatagat ttccacctc aaccagttat aactaaagat
 241 aatgtaacta tgcagattga tacagttgta tattataaag ttacagacc agttagata
 301 gtgttgaga tagctaacc aatagctgct atgaaaatt taacagctac aactaaga
 361 aatataattg gtgaactga tttagatgaa acattaacat caagagatat aataaatgta
 421 aaaatgagaa ctattctga tgaagcaaca gataaatggg gtataaaagt aatagagta
 481 gagtataaaa atataatgcc tctcaggat attcaagttg caatggaaaa acaaatgaga
 541 gcagaagag aaagaagaga ggcaatact caagcagaag gtaataagtc agctgcaata
 601 ctcaagctg aaggtgaaaa acaatctgct atattaacag cagaagcaa aaaagaagct
 661 atgttacgtg tagcagaagg tgaanaagaa tctgctatat tagtggcaga aggtgaagct
 721 gaagctataa gacagacagc tattgctaag gcacaagtg aagctgaaat gataaaaaga
 781 actcaaatgg caacagcaga aggttataaa ttagttttt cagcaatgaa agaggctgat
 841 atagacaata atattctagc attaaatct atggaagctc tgaaaaaat ggctgaaggt
 901 aagtaacaa aactgtttt acctcagaa gcagtaatt tcttaggaac attcaaagga
 961 ataaaggaag ttatgagtga tgataacaaa gaagtactg atataaaaaga agttttaat
 1001 gataatgaat cattaacaaa ataa

5

En una realización, puede aislarse una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1511) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado. En una realización, la proteína hipotética comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13:

10

1 midnqkyvil slelhffsr imkehalfle agftnkynnl ameadhykkq fedllsytsv
 61 asngiirpdi lyseelvtl tsvaeqktee ftgieinkni ttrelnlqsg vnpqvgdvlv
 121 nyvaqlnsda irlldglinf kervldgvls ctiftsnyp111ehiihean lysesyvvdle
 181 nkidieskna keielfWdhi mmehalfinrg lldpsegeli ntsndfaikf neliectnem
 241 tdsniknite etlnetvefk dfkeagasgi eqckiksiil pladhvire anhyiriles
 301 yknm

codificada por un ácido nucleico hipotético de *Clostridium*, SEQ ID NO: 14:

1 ttacatgttt ttataactct ccaatattct aatataatga ttgcctctc taaaacatg
 61 gtctgctaaa agtgtaata ttatagattt tatcttacac tgttctatc ctgatgctcc
 121 tgctcttta aaactttaa actcaacagt tcatttaga gttctctg taatgtctt
 181 gatattagaa tcagtcattt cgttgtttt ttcaattaat tcattaaatt ttatagcaaa
 241 atcatttgaa gtatttata gttcacctc tgagggtct agtaatctc tcataaacag
 301 agcatgtcc atcataat ggtcccagaa taattctatt tcttagcgt ttttgactc
 361 aatattctt ttatttcaa ggtcaactac ataagaacga tataaattg ctcatgtat
 421 tatatgtca agaagtagag ggtagttga tgtaaatata gtacatgata gtacaccatc
 481 taagactct tctttaaata taataagccc atcaagtaat ctattgcat cagagttaag
 541 ttgagctaca tagttcacta aacttgacc aactgtggg ttacaccac ttgtagatt
 601 taattctct gtagtgatg tttgtttat ttctatccct gtaactctt ctgtttttg
 661 tctgcaact gatgtgagag tagttacaag tctctgaa tataatata caggtctaata
 721 tataaccata ctagcactaa cagtgtatga taataatct tcaaattgct ttttagtg
 781 gtcagctcc atagcaagat tataatttt attgtgaat cctgcttcta aaaaagagc
 841 atgctcttc ataattctg aaaaaataa atgtaattct agtgataaaa taacatatt
 901 tgattatct atcat

15

B. Proteínas de tipo colágeno de *Clostridium difficile*

Se comparó la proteína BclA de exosporio de *B. anthracis* con el genoma de *C. difficile*, en el que se identificaron

tres zonas genómicas de *C. difficile* como homólogas a BclA de *B. anthracis* (es decir, por ejemplo, zonas genómicas de superficie de esporas).

5 En una realización, una proteína homóloga de superficie de esporas de *Clostridium* comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (número de registro CAJ67154):

```
mmiilylnd dtfiskkyd knfsnldycl igskcsnsfv keklitffkv ripdilkdks
ilkaelfihi dsnknhifke kvdieikris eyynlrtyw ndrsvmenir gylpigisdt
snyiclnitg tikawamky pnyglalsn ypyqilefts srgcnkpyil vtfedriidn
10 cypkcecpri ritgpmgprg atgstgpmgv tptgstgat gsigptgptg ntgatgsigp
tgvtpgtgst gatgsigptg vtgptgntgv tgsigptgat gptgntgvtg sigptgvtgp
tgntgeigt gatgptgvtg sigptgatp tgeigtgat gatgsigptg atgptgatgv
tgeigtgei gptgatgptg vtgsigptga tptgatgei gptgatgptg vtgsigptga
tgptgatgei gptgatgptg vtgeigtga tptgntgvt geigtgatg ptgntgvtge
15 igptgatgpt gvtgeigtg ntgatgsigp tgvtpgtgat gsigptgat atgvtgptgp
tgatgnssqp vanflvnaps pqtlnngdai tgwqtiigns ssitvdtngt ftvqengvyy
isvsvalqpg sssinqysfa ilfpilggkd laglttepgg ggvlsgyfag flfggtfti
nfssttvgi rngqsagtaa tlifriadt vmt
```

10 codificada por un ácido nucleico homólogo de superficie de esporas de *Clostridium*, SEQ ID NO: 16:

```
atgagaaata ttacttta ttaaatgat gatacttta tatctaaaa atatccagat
aaaaacttta gtaattaga ttattgctta ataggaagta aatgttcaaa tagttttgta
aaagaaaagt tgattacttt tttaaagtg agaataccag atatattaaa agacaaaagt
atattaaaag cagagtatt tattcatatt gattcaaata agaatcatat tttaaagaa
aaagtagata tgaataata aagaataagt gaattataa attacgaac tataacatgg
aatgatagag tgtctatgga aatatcagg ggatattac caattgggat aagtataca
tccaactata ttgtttaaa tattacggga actataaaa catgggcaat gaataaat
cctaattatg ggtagcttt atctttaa taccctatc agattctga attacatct
agtagaggtt gtaacaaacc gtatatactt gtaacattg aagatagaat tatagataat
tgttatccta aatgtgagtg tctccaat agaattacag gtccaatggg accaagagga
gagacagga gtacaggacc aatgggagta acaggccaa ccggaagta aggagcgaca
ggaagcatag gaccaacagg ccaaccgga aatacaggag caacaggaag tatagggcca
acgggagtaa caggccaa cggagtaga gagcgacag gaagtatagg accaacagga
gtaacaggtc cgacaggaaa tacgggagtg acaggagta taggaccaac gggagcaaca
ggcccgacag gaaatcggg agtgacagga agtataggac caacaggagt aacaggccca
acaggaaata caggagaaat aggaccaac ggagcaacag gtccaacagg agtgacagga
agtataggac caacaggagc aacaggacca acaggagaaa taggaccaac gggagcaaca
ggagcgacag gaagtatagg accaacagga gcaacaggtc caacaggagc gacaggagt
acaggagaaa tagggccaac aggagaaata ggaccaacgg gagcaacagg cccaacagga
gtgacaggaa gtataggacc aacgggagca acaggccaa caggagcgac aggagaaata
ggaccaacag gagcaacagg cccaacagga gtgacaggaa gtataggacc aacgggagca
acaggccaa caggagcgac aggagaaata ggaccaacgg gagcaacagg cccaacagga
gtaacaggag aataggacc aacgggagca acaggccaa caggaaatc aggagtaaca
ggagaaatag gaccaacggg agcaacgggt ccgacaggaa atacaggagt gacaggagaa
ataggacca cgggagcaac aggaccaaca ggagtacag gagaatagg gccaacagga
aatacaggag cgacaggaag tatagggcca acgggagtaa caggtccaac aggagcgaca
ggaagtatag gaccaacggg agcaacagga gcgacaggag taacaggacc aacaggtcca
acaggagca caggcaatc ctctagcca gttgctaact tctctgtaa tgcacatct
ccacaacac taaataatgg agatgctata acaggttggc aaacaataat aggaaatag
tcaagtataa cagtagatac aatggtacg ttacagta aagaaatgg tgtgtatt
atatcagtt cagtagcatt acaaccaggt tcatcaagta taaatcaata ttcttctgct
atcctatcc caatttagg aggaaaagat ttggcagggc ttactactga gccaggagcg
ggaggagtac ttctggata ttctgctggt ttttattg gtgggactac tttacaata
aataatctt catcacaac agtaggata cgaatgggc aatcagcagg aactcggct
acttgacga tattagaat agctgatac gttatgact aa
```

15 En una realización, una proteína homóloga de superficie de esporas de *Clostridium* comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (número de registro CAJ70248):

ES 2 544 435 T3

mllmsmky fgpfdndyn ngydkyddcn ngrddynscd chhccppscv gptgpmgprg
rtgptgptgp tpgvgatgp tptgptgpt gntgntgatg lrgptgatga tptgatgai
gfgvtgptgp tpatgatgad gvtgptgptg atgadgitgp tpatgatgfg vtgptgptga
tgvvgatg ligptgatgt ppatgptgai gatgigitgp tpatgatgad gatgvtgptg
ptgatgadgv tptgatgat gigitgptgp tpatgigitg atligptga tptgatgpt
gatgptgvv tpatgatgat gadgatgvtg ptgatgatga nglvgptgat gaagtpgat
ptgatgptgv gitgatgat atgptgadga tptgatgnt gadgvgatg atgntgadga
tptgatgat gadgatgptg atgatgvaga tpatgptgat gadgatgptg atgatgadga
tptgatgat gvtgatgptg ptgatgatga tgasaiipfa sgip lsltti agglvgtpgf
vgfssapg1 sivgvidlt naagtltnfa fsmprdgiti sisayfstta als1vgstit
itadyqsta pnnstfavg atvlaplpltilsvsiss givtlniaa taqtpdrqyai

codificada por un ácido nucleico homólogo de superficie de esporas de *Clostridium*, SEQ ID NO: 18:

ttatatggca tactgtctgt ctggagttg tctgttgc gctatatta atcctgttac
aattcacta gaaattgaac caactgataa tatacctgta agtggaggag ctagtgaac
tctcctcct ggtacagctg taaataggt atttgggca gtagattggt aaagtgtgc
tgaattga attgtgaac caacaagta aagtctgct gttgactga agtatgctga
aatagatgt atgtccat ctctggcat tgaanaatgca aagtagtca atgtcctgc
tgcgttga aggtctatta ctccaccaac tatacctaact cctggagccg aactacaaa
tcaacaaat ccaggtgtac ctactaatcc tccagctata gttgtaagtg atagtggat
acctgatgca aaaggtatta ttgactagc acctgttgc cctgttgc ctgtgctc
tgtgggct gttggcctg ttgctctgt aactcctgt gccctgtg ctctgttg
acctgttgc ccatctgcc ctgttgc tttgctcct gttggacctg ttgctcctc
tctcctgt gctcctgtg gacctgtg tctgttgc cctgacctg ctgttgc
tgttctcct gttggacctg ttgctcctc tctcctgt gccctgtg ctctgttg
acctgttgc ccatctgct ctgtattcc tttgctcct gttggacctg ctactcctc
tctcctgta ttctgttg ctctgttg acctgttgc ccatctgct ctgtggacc
tctcctcct gttgccctg ttgctcctg tttctact cctgtggg ctgttgc
tgtggacct gttgctccag gtttctgc tctcctgtg gctcctgtg ggctactaa
tccattgct cctgtgccc ctgttgc tttggacct gttactctg ttgctcctg
tctcctgt gctcctgtg ctctgtg tctgttact ctactcctg ttggcctgt
tctcctgt ggacctgtg ctccaggtg tctgttgc cctgtggac ctataatcc
tgtggcct gttatccta ttctgtg tctgttga cctgtggg ctgtattcc
tattctgt gctcctgtg ctctgttg gcctgttact ccatctgct ctgtgccc
tgtgggct gttggcctg ttactcctg tctcctat gccctgtg ctctgttg
tctgttga cctgtattc ctactcctg tctcctat gccctgtg gacctgtg
tccaggtgt cctgctc ctgtggacc tattaact gttgctc ttactctac
tctgttgc cctgtggg ctgtggacc tttactcca aatcctgtg ccctgttg
tctgttga cctgtattc catctgctc tttgctccc gttggacctg ttgacctg
tactcctc gctcctgtg ctctgctc tctgttgg cctgtggac ctgttactc
aaacctata gctcctgct ctctgttg gcctgttgc cctgttgc ctgtggacc
tattaact gttgctc tttcctgt atttctgt ggaccagtc gaccggtg
tctgttgg cctgttccc ctactcctg acctgttga cctgtggac ctgtggg
ggttctacct ctggacca ttggcctgt tggacctaca catgatggtg gacagcaatg
atggcaatca cagctattt aatcctcacc accattgta caatcctat attatcata
gccattgtg taatcattat catcaaatg tcaaaatat ttattctac ctattataa
aagcac

5

En una realización, una proteína homóloga de superficie de esporas de *Clostridium* comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (número de registro CAJ70128):

msdisgpsly qdvgptgptg atgptgptgp rgatgatgan gitgptgntg atgangitgp
 tgnmgatgpn gttgstgptg ntgatgangi tgptgntgat gangitgptg nkgatgangi
 tgstgptgnt gatgangitg ptgntgatga tgptglgat gatgangitg ptgntgatga
 ngvtgatgpt gntgatgptg sigatgatgt tgatgpigat gatgadgevg ptgavgatgp
 dglvgptgpt gptgatgang lvgptgptga tganlvgtpt gatgatgvag aigptgavga
 tgptgadgav gptgatgatg angatgptga vgatgangva gpigptgptg engvagatga
 tgatgangat gptgavgatg angvagaigp tgptgangat gatgatgatg angatgptga
 tgatgvlaan naq flvssss lvnntlvfn ssfingnit fptsstinla vggiynvsfg
 iratlslagf msittfnvg tqnnfiakav nltssdsvs slsflvdara aavtlfstfg
 sgttgtsaag yvsvyriq

codificada por un ácido nucleico homólogo de superficie de esporas de *Clostridium*, SEQ ID NO: 20:

ctattgtatt ctataaactg atacatatcc agctgcagaa gtacctgtcg tgccctgaacc
 aaatgtaaaa cttaaagtaa cagctgctgc tctagcatca actaaaaagc ttaaacttac
 acttacatct gatgaagtaa gtgtatttac tgcttttgca ataaagtta tttgagttac
 tccattaaag ttagtagtaa ttgacataaa tctgcaagt gaaagtgtgg cacgtatacc
 gaaagataca ttgtatatcc ctccaactgc aagattata gtactacttg ttggaaaagt
 tatattagt ccaattataa atgatgaatt aatgtcact aatgtattat tcaactaaact
 tgaagaggac actgtaaatt gtgcattgtt tgctgctaac actcctgttg ctctgtcgc
 tccggttgga cctgttgctc catttgctcc tgggtcctct gtcgccctg ttgctcctgt
 cgtcccaatt gtcctgggtg ggctgttgg tctatcgtc cctgctactc catttgctcc
 cgttctctct actgctcctg ttgggctgtg tctccattt gccctgttg ctctgtcgc
 tctgttctc cctgctactc cattttctc cgttggacct gttggacctg ttggacctgc
 tactccattc gtcctcctg ctctactgc tcccgttggg cctgttgctc catttgcccc
 tgttctcct gtcgctcctg ttggacctac tctccatct gtcctcctg ggctgttgc
 tctactgct cccgttggac ctattgccc agctactct gttgctcctg tgcctctgt
 tggacctacc aaaccatttg ctccggtgc tccggtggg cctgttgggc ctaccaaac
 attgctccg gttgctccgg ttggcctgtg tggcctgtt ggacctacca aaccatctgg
 acctgttct cctactgctc ctgttggacc tacctctcca tctgctcctg ttgctcctgt
 tctctctatt gggcctgttg ccccagttgt tctgttctc ccagtcgctc ctatactcc
 tgttggacct gttgctcctg tatttctgt tggcctgta gcacctgta ctccattgc
 tccggttct cctgtattc ctgttggctc tgtattcca ttgctccgg ttgctcctgt
 tgcctcctgt agtccggtg gacctgtgc tctgttctc cctgtattcc ctgttggacc
 tgtattcca ttgctccag tgcctcctgt attcctgtt gtcctgtag aacctgtat
 tcatttctc cgggttgc ctgttctc tgttggctc gtattccat ttgctccgg
 tgcctcctg tcccctgctg gacctgtat tccattcgt ccagtcgctc ctgtattcc
 tgttggctc gtagaacctg ttgttcatt tggccagtc gtcctccat ttctgttgg
 acccgttat ccattgctc cagttgctc tgtattctc gttggtcctg ttattccat
 tgcctcctg gtcctcctg cactctagg cccctcgtt cctgttggac cagtagcacc
 5 tttggccct gttggacctc catcttgata taaacttga cctgaaat cactcat

C. Proteínas de esporas de *Clostridium difficile*

1. Proteínas de esporas de *Clostridium* supuestas

En una realización, puede aislarse una proteína de esporas supuesta de *Clostridium* (CD 2401) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado que comprende un peso molecular que incluye, pero no se limita a, 140, 150 ó 160 kDa. Véanse las figuras 5 y 6. En una realización, la proteína hipotética (~22 kDa) comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (números de registro YP_001088913; GI: 126700016):

1 MWIYQKTIQH PVNIKTC DPR MAKFLITQFG GPNGELAASL RYLSQRYTMP
 51 TGNMRALLTD IGTEELAHVE LIC TMVYQLT SDASPEELKA AGLGSNYAQN
 101 GYGIYPTDSN GVPFDVRPIA VMSNPVTDLH EDMAAEQKAL ATYYQLINLT
 151 DDVDVIDVLK FLGQREIHY QRFGEALMDA YELEESQKMF

codificada por un ácido nucleico de proteína de esporas supuesta de *Clostridium*, SEQ ID NO: 22:

1 atgtggatat atcagaaaac tatacaacac ccagtaata taaaacttg tgaccctaga

ES 2 544 435 T3

```

61   atggctaaat ttcttataac tcaatttggg gggccaaatg gggaaactgc tgcattctta
121  agatatttaa gccaaagata tacaatgcct actggaataa tgcgtgcact ttaacagat
181  attggtacag aagaactage tcacgttgag cttatatgta ctatggttta tcagttaact
241  tctgatgcaa gcccagaaga gtaaaaagct gcaggtcttg gtcaaaacta tgctcaaaa
301  ggatatggaa ttatccaac agattcaaat ggtgttccat ttgatgtaag acctatagca
361  gttatgtaa atcccgaac cgatttaccat gaggatatgg cagctgaaca aaaagcactt
421  gcaacttatt atcaacttat aaacctaaca gatgacgttg atgttataga tgtattaaaa
481  ttcttgggtc aaagagaaat aattcactat caaagatttg gtgaagcttt aatggatgct
541  tacgagttag aagaatctca aaaaatgttc taa

```

5 En una realización, puede aislarse una proteína de superficie de esporas supuesta de *Clostridium* (CD 589) como un complejo anticuerpo-proteína hibridado que comprende un peso molecular que incluye, pero no se limita a, 140, 150 ó 160 kDa. Véanse las figuras 5 y 6. En una realización, una proteína hipotética (~ 22 kDa) comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (números de registro YP 001087073; GI: 126698176):

```

1     MWIYQKTLEH PVNIRQADPR MAKYIMTQLG GPNGELAAAT RYLQQRYSMP
51    TGKSRALLTD IGTEEMAHVE IISVLYQLI GNCTPEELKA AGLGSNYANF
101   GHGLQPVDSN GVNFTTSYIN VFGDSVTDLH EDMAAEQKAL ATYYQLINLT
151   DDPDLKDILR FLGEREVVHY QRFGEALMDV YEFTECKHQF

```

10 codificada por un ácido nucleico de proteína de esporas supuesta de *Clostridium*, SEQ ID NO: 24:

```

1 atgtggattt atcaaaaaac actggaacat ccagttaaca taagacaagc agaccctaga
61 atggcaaat atatcatgac tcagttggga ggacctaatg gtgagttggc agctgcaact
121 agatatcttc acaaaagata tactatgcca actggaaaat ctggtgcact ttaactgat
181 ataggtacag aggaaatggc tcatgttgag ataatttctt cagtgttata tcaattaata
241 ggcaattgta ctccagaaga gcttaaggct gctggacttg gttagtaata tgctaattt
301 ggacatggtc ttcagccagt agatttcaat ggagtaaaact ttactacaag ttatattaat
361 gtctttggcg attcggtaac tgatttaccat gaggatatgg ctgctgaaca aaaagcattg
421 gctacgtact atcaattaat aaatttaact gatgaccttg atttgaaga tatattgaga
481 ttttgggtg agagggaagt agttcactat caaagatttg gtgaagcatt aatggatggt
541 tatgagtta cagagtgcaa gcatcagttt taa

```

2. Piruvato-flavodoxina oxidorreductasas

15 En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína piruvato-flavodoxina oxidorreductasa (CD 2682) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (números de registro YP_001089193; GI: 126700296):

```

1     MAKFMKTLDG NTAAAHVAYA FTDVAAIYPI TPSSTMAEVV DEWASQGRKN
51    IFGQTVNVVE MQSEAGASGT FHGSLQGGAL TSTFTASQGL LLMIPNMYKV
101   AGELLPGVFH VSARALASQA LSIFGDHQDV MAARQTGCVL LASGSVQEVA
151   DIAPVAHLAA IEGRLPFIHF FDCJFRTSHEI QKVELLENED YASLLNFEAV
201   QAFRDNALSP NHPVARGTAQ NPDIYFQTRE ASNKYYQNV GIVEKYMEKM
251   SNLTGRKHSL FDYYGAEDAK YVLIAMGSVT ETIETIDYL NAKGEKYGLV
301   KVHLYRPFMS KHFLDAMPST VERICVLDRT KEPGSTGEPL YLDVRDVFYG
351   KENAPMIIGG RYGLGSKDTT PSDIKTVFDN LVSEQPKNGF TVGIVDDVTN
401   TSLTPSEPIK IASKGTIRCK FWGLGSDGTV GANKQAIKII GDHTEKYAQA
451   YFDYDSKKSQ GITMSHLRFG DTPIRATYLI DEADYIACHK QSYVYQYDLL
501   KGLKKGGTFV LNTIWDQAGL EEHLPAHMKQ YIAKNDIKFY TVNAVKLGQE
551   IGLGNRINMI MQSAFFKLA EIIPEEDAVKY LKDSIVKAYG KKGEKIVNMN
601   YAAVDAGINA LVKVEVPASW ENAVDADKGE VKEPEFIKNI LRPMTAQEGN
651   ZNLPVSTFNGI EDGTFPCGTA AYEKRGIAVD VPEWIIDNCI QCNQCSFICP
701   HACIRPVLVT EEELANAPEG FEAKKALGKG LEGLKYRIQV SPLDCTGCGN
751   CADICPAKEK ALVMKPIDTQ LDTELDNWF AVNPDEVAPK VDVMPANTVK
801   GSQFRQPLME FSGACAGCGE TAYIKVVTQL YGDRMMIANA TGCSIIWGAS

```

20

ES 2 544 435 T3

851 APSIPYTCNH EGKGPSWANS LFEDNAEYGF GMYTAVKQIR NKIVDAMTEL
 901 VSMDICEDAK AVFTEWLDSR NDGEASKVAS AKVVELLEKP ACDCTDEKAK
 951 ELVKAIKDRK DYLVKRSQWI LGGDGWAYDI GYGGLDHLVLA SGEDVNVLVF
 1001 DTEVYSNTGG QASKATPAAAMAKFAASGKK SRKKDLGMMAMTYGNVYVAQ
 1051 VAMGADKNQF IKAVLEAEKH DGPSLIAYAPCINHGLKEG MGRTVANEAQ
 1101 AVACGYWHL Y RFNPEVKAEG KNPFTLDSKE PTASFKDFIL AQVRYSAIAK
 1151 QFPEEADGLF AKAEADAKER YEGYKCLA E

codificada por un ácido nucleico de piruvato-flavodoxina oxidorreductasa de *Clostridium*, SEQ ID NO: 26:

1 ttttcagct aatttttgt atccttcata tctttcttta gcatacagctt cagctttagc
 61 aaataatcca tcagcttctt ctgggaattg tttagctata gcagaatata ttactgtgac
 121 aagtatgaaa tctttgaagc ttgcagttgg tcttttgaa tctaaagtga atgggtttt
 181 acctcagct tttactctg gattgaatct gtataaatgc cagtatccgc aagcaacagc
 241 ttgtgcttcg ttagctacag ttctcccat accttctttt aatccatggt ttatacatgg
 301 agcataagct attataaag atggcccatc atgttttca gcttctaaaa cggtttgat
 361 aaattggttt ttatcagcac ccatagcaac ttgagctaca tatacgtttc catatgtcat
 421 agccatcatt cctaaatctt tctttctaga tttttacct gaagcagcaa acttagccat
 481 agcagcagct ggagtagctt tagaagcttg acctctgta ttgaaatata ctctgtatc
 541 aaatacaagt acgtttacat ctccaccaga tgcaagaaca tggctaatc cacgtaacc
 601 gatatacat gcccaaccgt ctccacctag tatccattga gatctcttaa ctagataatc
 661 tttctatct ttatagctt ttactaattc tttagctttt tcatctgtac aatcacaagc
 721 tggttttct aataatcca caaccttagc acttgctact ttagaagett ctccatcatt
 781 tctagaatct aacctctcg taaatactgc tttagcatct tcacagatat ccatagaaac
 841 taactctgc atagcatcta ctatttatt tcttattgc ttaacagctg tgtacatacc
 901 aaatccatat tcagcattat cctcgaataa agagttggcc caagatggac ctttacctc
 961 atggttaca gataaggaa ttgatgggtgc agaagctccc catatagaag aacatccagt
 1021 agcattagct atcatcattc tatctcata taattgtga actactttaa tgtacgcagt
 1081 ttctccacat ccagcacatg ctctgaaaa ctccattaat ggttgtctaa atgacttcc
 1141 ttaacagta tttgcaggca taacatcaac tttggagct acttcatcag gattfactgc
 1201 aaatgccccaa ttatctaact ctgtatcaag ttgagtatct atggcttca taactaaagc
 1261 ttttcttta gctggacata tgcagcaca gttccacat cctgtacagt caagtggact
 1321 aacttgaatt ctatattta atccttctaa tctttacct aatgctttt tagcttcaa
 1381 tcctctgga gcattagcta attctcttc agtaactaat actggtctta tacatgcatg
 1441 aggacatata aaagaacatt ggttacattg aatacagta tctattatcc attcaggaac
 1501 atcaacagct ataccaggt ttcataagc tgcagtacca caagggaatg ttccatctc
 1561 tataccattg aatgtacta ctggttaagt gtttcttct tgtgcagtca ttggtctag
 1621 tatattttt ataaattctg gttctttaa ttctcttta tctgcatca cagcatttc
 1681 ccaagaagct ggaacttcaa cttaactaa agcattatt cctgcatca cagcagcata
 1741 gttcatatta actattttt caccttttt accataagct ttaactatag aatctttta
 1801 gtattaaca gcactctct ctggtattat tttagctaat ttaaagaatg cagattgcat
 1861 ttatcatgttt attctgttc caagacctat tcttgtctt agtttaacag cgttaactgt
 1921 atagaatttt atatcattt tagctatata ttgttcata tgagctggta aatgttctc
 1981 aagtcttctg ttgtccata tagtgttaag tacaatgta ccacctttt taagacctt
 2041 taataaatca tattgataa catatgattg tttatgacag gcaatataat cagcttcatc
 2101 tattaataa gtagctcta ttggagtac accaaatctt aagttagaca tagttatacc
 2161 accagatttt ttagagcat aatcaaagta agcttagca tattttcag tatggtcacc
 2221 gattattttg atagctgtt tattagctcc aacagtaccg tcagaacctat atcccagaa
 2281 ctacatctt atagttctt tagaagctat tttattggc tcagatggag taaagaagt
 2341 attagtaca tcatcaacta tacctactgt aaatccattt ttaggttgt ctgaaactaa
 2401 gttatcaaaa acagttttt tatctgaagg agtagtatct ttgaaacctat atccgtatct
 2461 tccacctatt atcataggag cattttctt tccatagaat acatcacgta catctaagta
 2521 taatggttca ccagttgaac ctggctctt agttctatca agtacacata ttcttcaac
 2581 agtagatggc atagcatcta agaaatgtt cattgagaat ggtctatata aatgaactt
 2641 aactaaacca tattttctc ccttagcatt taagtaatct atagttctt ctattgttc
 2701 tgttactgaa cccatagcta ttaatacata tttagcatct tctgtcccat agtaatacaa
 2761 taaactatgt ttctacctg ttaaactact catttttcc atgtatttt caactatacc
 2821 tactatatt tttagctatt tattagaagc ttcttagtt ttgaaatata tatctgggt

2881 ttgagcagta ccacgagcaa ctggatgatt tggagataaa gcattatctc taaatgcttg
 2941 aactgcttca aagttaata aactgcata atcttcattt tctagtaatt caacttttg
 3001 gatttcatgt gaagtctga atccatcaaa gaaatgtata aatggtaac taccttctat
 3061 tgcagctaaa tgtgcaacag gtgtatatac agctacttct tgaactgaac cagaagctaa
 3121 taatacacat ccagttgtc tagcagccat aacgtcttgg tcatcccaa atattgataa
 3181 cgcttgagat gctaaagcac gacacttac atggaatact cctggtaata actctcctgc
 3241 aactttatac atgttaggta tcattaataa taaacctga gatgctgtaa aagtagaagt
 3301 taaagctcct ccttgtaaag aacctgggaa tgttctctgat gcacctgctt ctgactgcat
 3361 ttcaacaaca ttaactgttt gtccaaatat atttttctt ccttgtagtg cccactcatc
 3421 aactacttca gccatagttg aagatggtgt gattggatag atagctgcta catctgtaaa
 3481 cgcataggca acatgagctg cagctgtatt tccatcaagt gttttcataa acttagccat

3. Deshidratadas/isomerasas del metabolismo de γ -aminobutirato

- 5 En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína deshidratasa/isomerasa del metabolismo de γ -aminobutirato (CD 2341) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (números de registro YP_001088856; GI: 126699959):

1 MALMTGAQYI ESLRKLNTKV YMFGEVKNW VDHPMIRPSI NCVAATYDLA
 51 HDPEYADLMT VTSNITGEKI NRFGLHLQSV DDLIKKVKMQ RLCGQKTASC
 101 FQRCVGMDF NAVYSTTFEC DKAHGTYHD NFVKYLYTIQ ENDLVVDGAM
 151 TDPKGRSLS PSAQDPDMF LHIVERREDG IIVRGAKAHQ TGSINSHEHL
 201 IMPTISMTEA DKDYAVSFAV PSDAEGVFMI YGRQSCDTRK LEEGADVDLG
 251 NKEFGGQAL VVFDNVFVFN DRIFLCGEWD FSGMLVERFA GYHRQSYGGC
 301 KVGVDVHIG AAALAADYNG ANKASHIKDK LIEMTHLNS LYCCGIACSS
 351 EGHKTEAGNY QIDLLANVC QQNVTRFPYE IURLAEDIAG GLMVTMPSEK
 401 DFKSDLKVG TSGMTIGVCN KYFKASSVAS TEERMRLRF LENICLGSSA
 451 VGYRTESMHG AGSPQAQRIM ISRQGNINQK KELAKKIAGI KKEEALNL

- 10 codificada por un ácido nucleico de deshidratasa/isomerasa del metabolismo de gamma aminobutirato de *Clostridium*, SEQ ID NO: 28:

1 ttataaattt aaagcttctt cttttttat tcccgaatt ttcttagcta attctttctt
 61 ttgatttatg ttctctgtc ttgaaatcat tattcttga gcttgggtg aacctgcccc
 121 atgcattgac tcagttctat aaccaacagc agatgaacca aggcataat ttctaagaa
 181 tcttaatat ctactctt ctctgttga agccactgaa gaagctttaa aatactgtt
 241 acatactctg ccaatagta ttcacttgt tccaactta aggtctgatt taaagcttt
 301 ttctgaaggc atagtaacca taagccctcc agctatatct tctgcaagtc ttactattc
 361 ataaggaaat ctagtacat ttgtttaca cacatttga agaagtaaat ctatttgata
 421 gttccagct tctgtttgt gaccttctga tgaacatgct ataccacagc aatataagct
 481 ttcattaagg tgagtcatt ctattgttt atctttata tgtgaagctt tgttctctc
 541 attataatca gctgctaaag ctgctgctcc tattattaca tcacctactc ctactttaca
 601 tccaccataa cttgtctat ggtatctgc aaatctctct actaacatc cagagaaatc
 661 ccattctcca cataagaaa ttctatcatt tggaaacaa acattatcaa atactactaa
 721 agcttctga cctccaaact cctatttcc taaatcaaca tctgcacctt cttctaatt
 781 tctagtgtca caagattgtc ttccataaat cataaacact cctcageat ctgaaggaac
 841 tgcaaatgat acagegtagt ctttatctgc tteagtcata cttatagtag gcattataag
 901 gtgctcatgt gaatttattg aaccagttg atgtgcttt gctcctctta caattatccc
 961 atcttctctt ctttctacta tatgaaggaa catatctggg tcagggtgag cactaggtga
 1021 tagacttcta tctcccttag ggtcagctat agctccatca actactaaat cgtttcttg
 1081 tatataagtt aagtatttta caaaatatac atgataatta gttccatggg ctttatcaca
 1141 ctcaaagtgt gttgaataca ctgcattaaa cgcattcaca ccaacacatc ttggaaca
 1201 agaagctgtt tttgaccac atagtctttg catttttact tttttatac aatcatcaac
 1261 actttgatga agatgaccaa atctattat ttttcacct gtgatattg aagtaactgt
 1321 cattaaatct gcatattctg ggtcatgagc taagtcataa gttgctgcta cacaattat
 1381 agatggtcta atcataggat ggtcaacca attcttaacc tcttccaca acatataaac
 1441 cttagtattt aattttctca aactttcaat atattgagct cctgtcatta atgccaat

- 15 4. Butiril-CoA deshidrogenasas

En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína butiril-CoA deshidrogenasa (CD 1054) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 (números de registro YP_01087535; GI:

126698638):

1 MDLNSKKEYQM LKELYVSFAE NEVKPLATEL DEEERFPYET VEKMAKAGMM
 51 GIPYPKEYGG EGGDTVGYIM AVEELSRVCG TTGVILSAHT SLGSWPIYQY
 101 GNEEQKQKFL RPLASGEKLG AFGLTEPNAG TDASGQQTTA VLDGDEYILN
 151 GSKIFITNAI AGDIYVVMAM TDKSKGNKGI SAFIVEKQTP GFSFGVKEKK
 201 MGIRGSATSE LIFEDCRIPK ENLLGKEGQG FKIAMSTLDG GRIGIAAQAL
 251 GLAQQALDET VKYVKERVQF GRPLSKFQNT QFQLADMEVK VQAARHLVYQ
 301 AAINKDLGKP YGVEAAMAKL FAAETAMEVT TKAVQLHGGY GYTRDYPVER
 351 MMRDAKITEI YEGTSEVQRM VISGKLLK

5 codificada por un ácido nucleico de butiril-CoA deshidrogenasa de *Clostridium*, SEQ ID NO: 30:

1 atggatttaa attctaaaa atacagatg ctaaagagc tatatgtaag ctctgctgaa
 61 aatgaagtta aaccttagc aacagaact gatgaagaag aaagattcc ttatgaaaca
 121 gtggaaaaaa tggcaaaagc aggaatgatg ggtataccat atccaaaaga atatggtgga
 181 gaaggtggag aactgttag atataaatg gcagttgaag aattgtctag agtttgggt
 241 actacaggag ttattatc agctcataca tctctggct catggcctat atatcaat
 301 ggtaatgaag acaaaaaaca aaaattcta agaccactag caagtggaga aaaattagga
 361 gcatttggct ttactgagcc taatgctggt acagatgcgt ctggccaaca acaactgct
 421 gttttagacg gggatgaata catactaat ggctcaaaaa tattataac aaacgcaata
 481 gctggtgaca tatatgtagt aatggcaatg actgataaat ctaaggggaa caaaggaata
 541 tcagcattta tagttgaaa aggaactcct gggtttagct ttggagttaa agaaaagaaa
 601 atgggtataa gaggtcagc tacgagtga ttaatttg aggattgcag aatacctaaa
 661 gaaaatttac ttgaaaaga agtcaagga ttaagatag caatgtctac tctgatggt
 721 ggtagaattg gtatagctgc acaagcttta ggttagcac aaggtgctct tgatgaaact
 781 gtaaatatg taaaagaaag agtacaattt ggtagacct tatcaaaatt ccaaaataca
 841 caattccaat tagctgat ggaagttaag gtacaagcgg ctagacacct tgtatataca
 901 gcagctataa ataaagactt aggaaaacct tatggagtag aagcagcaat ggcaaaata
 961 tttgagctg aaacagctat ggaagttact acaaaagctg tacaacttca tggaggatat
 1021 ggatacactc gtactatcc agtagaaga atgatgagag atgctaagat aactgaaata
 1081 tatgaaggaa ctagtgaagt tcaagaatg gttattcag gaaaactatt aaaatg

5. Aminoácido aminotransferasas

10 En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína aminoácido aminotransferasa (CD 3664) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 (números de registro YP 001090189; GI: 126701292):

1 MAVKYAKRMQ GLQGSEIREL LKLTQQPQII SFAGGMPAPE LFPVEEMKKV
 51 SVAVLEENGR SAMQYTTTEG YEPLREKIAA RMNDKNKTNV NKDDILVTSG
 101 SQQGLDFAGK VFIDEQDVIL CESPSYIGAI NAFKSYQPKF IDVPTDSDGM
 151 IMEELEKILE TTDRIKMIYV IPDFQNPTGR TWPLERRKKF MEIVNKFEIP
 201 VIEDNPYGD LRFEGETLPSL KSM DTKGLVI FLGTFSKIFC PGYRLGWTC A
 251 SPEILSKFNF AKQGADLQAS TISQMEVSKF MDMYDLDAHV DKIKAVYVKR
 301 RDVMLKTMEE EFPEGLVFTH PEGGLFTWVE LPSNLNAKEL MPKCLDKNVA
 15 351 YVAGGGFFPN GGRENTFRLN YSNMPEEKII EGIKNIAAVL KEAMGVEA

codificada por un ácido nucleico de aminoácido aminotransferasa de *Clostridium*, SEQ ID NO: 32:

1 ttaagcttct acacccatag ctctctttaa tacagctgct atattttta taccttctat

61 ttttttct tctggcatat ttgaatagtt aagtctgaaa gtattttctc taccaccatt
 121 agggaagaat cctcctccag caacataagc aacattctta tctaaacatt ttggcattaa
 181 ttctttagca tttaaattac ttggaagctc tacccatgta aataatccac ctctggatg
 241 agtaaatact aatccttctg ggaactctc ttccatagtc ttaagcatta catctctacg
 301 tttaacataa actgctttta tttgtcaac atgtgcatct aggtcataca tatccataaa
 361 ttgcttact tccattgag atatagtga tgcttgaag tctgcacct gttttgcaa
 421 gtaaaccta gataaaatt ctggagaagc acaagtccat cctaactgt atcctgggca
 481 gaatattta gagaaagtc ctaagaatat tactaatcct tttgatcca ttgatttaa
 541 agatggtaaa gtctctcctt caaatctta atctccatg ggattatctt ctattactgg
 601 tattcaaat ttattacta ttccatgaa tttttacgt cttcaagtg gccaaagtct
 661 tctgttga ttttgaagt caggtattac gtaaatcatt tttattctat cagttgttc
 721 tagtatctt tctaatctt ccattatcat tccatcagaa tctgttggaa catctatgaa
 781 tttaggtga taagattaa atgcgttat agctcctatg taagatggac tttcacataa
 841 aattacatca cctcatca tgaatactt tctgcaaaa tctagacct gttgagaacc
 901 acttgaact aatatacat cttgtttac attagtttg ttttatcat tcaattctagc
 961 tctatttt tctttaatg gttcatatcc ttctgttga gtatattgca tagctgatct
 1021 tccatttct tcaagcactg caactgatac tttttcatt tctcaactg gaataaact
 1081 tggagccggc attccaccag caaaagatat tatttgggt tgttgagtaa gttttaaag
 1141 ctcacgtatt tctgatcctt gtaaccttg cattctttt gcatattaa ctgccat

6. Succínico-semialdehído deshidrogenasas

- 5 En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína succínico-semialdehído deshidrogenasa (CD 2342) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 (números de registro YP_001088857; GI: 126699960):

1 MEKAVENFED LSKEYINGYI ERARKAQREF ECYTQEQVDK IVKIVGKVYVY
 51 YNAEYLAKLA VEETGMGVYE DKVAKNKS KA KVIYNNLKD KSVGIIIDR
 101 ETGITKVAKP VGVVAAITPC TNPIVTPMSN AMFALKGRNA IITPHHKAI
 151 GCSTKTVEMI NEELEKIGAP ENLIQILDQQ SRENTNRLIS SADVVIATGG
 201 MGMVKAAYSS GKPALGVGAG NVQCIIDRDV DIKEAVPKII AGRIFDNGII
 251 CSGEQSVIVA EEMFDKIMDE FKNNKGFIVR DKVQKEAFRN AMFVNKSMNK
 301 DAVGQSVHTI AKIAGVEIPE DTKIIVIEAD GPGEEDIKAK EKMCPVISA Y
 351 KYKSFEEGVA IAKANLNVEG KGHSVSIHSN TVKNIEYAGE NIEVSRFVIN
 401 QCCATSAGGS FFNGLAPTNT LGCOSWGNNS ISENLDYKHL INISRIAYYM
 451 PENEVPTDEE LWG

10

codificada por un ácido nucleico de succínico-semialdehído deshidrogenasa de *Clostridium*, SEQ ID NO: 34:

1 ttatcccaa agttctcat ctgtagggac ttattttct ggcataaat aagcaattct
 61 agaaatatta attagatgct tataatcaag attttcagag atgctgttat ttcccaaga
 121 accacaacct agagtattag taggtgcaag accattaaag aaactctc cagcactagt
 181 agcacaacat tgattaataa caaatcttga tacttctata tttctctg catattctat
 241 atttttaact gtattgaa gtatagatac actatgtcct tttctteta catttaaat
 301 tgettttga atagctacac ctcttcaa actttatac ttgtatgca atataactgg
 31 acacatttt tctttgca taatctctc ttctctggt ccatcagctt ctattactat
 421 tattttgta tctctggta tctcaacacc tgcaatttt gcaattgat gaactgattg
 481 acctactgca tctttatca tagatttatt tacaacata gcattctga aagcttctt
 541 ttgtacttta tcttaacta taaaacctt gtattttta aattcatcca ttattttatc
 601 aaacatttct tctgtaacta tfactgactg ttcacctgaa caaatgatac cattatcaaa
 661 aattcttct gctatgatt taggtactgc ttcttaatg tctacatctc tatctatgat
 721 acattgaaca tttctgccc ctacaccaag tgctggttt ccaattgagt acgcagctt
 781 taccattccc attcctccag tggcaattac tacatctgct gatgaaatta aattcttgt
 841 attttctct gattgttgg caagtattg tattaatatt tctggagctc ctatttttc
 901 taattctca ttaatctct ctacagttt tgtactacat ccaattgctt tatgatgagg
 961 tgtgataata attgcattc ttcccttaag tgcaaacatt gcattgctca taggtgtaac
 1021 gattggatt gtacaaggag ttattgccgc tactactcca actggtttag ctaccttgt
 1081 tattccagtt tctctatcta tatcaattat accaactgat ttttatctt taaattgt
 1141 atatataact tttgcttgc tttttttt agtacctta tctcatata ctccattcc

ES 2 544 435 T3

```

1201 agtctcttct acagcaagtt tagctaaata ttcagcatta taatacacta cttttccaac
1261 tatttttact attttatcta cttgttcttg agtataacat tcaaactctc tttgagcttt
1321 tcttgetctc tcaatataac cattaatgta ttccttactt aaatcttcaa agttttccac
1381 tgctttttcc at

```

7. Rubreritinas

- 5 En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína rubreritina (CD 1524) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 (números de registro YP_001088025; GI: 126699128):

```

1 MKKFVCTVCG YIHEGDAAPA QCPVCKVGAD KFEEMKGENV WADEHRIGVA
51 QGVDAEIIIEG LRANFTGECT EVGMYLAMSR QADREGYPEV AEAYKRIAFE
101 EAEHAAKFAELLGEVVVADTKENLRVRVDAEYGATDGKLLAKRAKELGL
151 DAIHDTVHEM CKDEARHGKA FLGLLNRHFG K

```

- 10 codificada por un ácido nucleico de rubreritina de *Clostridium*, SEQ ID NO: 36:

```

1 atgaaaaaat tttttgtac agtatgtgga tatatacatg aaggagatgc tgcaccagca
61 caatgtccag tatgtaagt tggagctgat aaatttgaag aatgaaagg cgaatgggt
121 tgggctgatg aacatagaat aggagtagct caaggtagtag atgcagaaat aatcgaagga
181 ttaagagcta accttactgg tgagtgtaca gaagtaggaa tgtatttagc aatgagtaga
241 caagctgata gagaaggta tccagaagta gctgaagcgt ataagagaat agcttttgaa
301 gaggctgaac atgctgctaa atttcagaa cttctggag aagttgtagt tgcagataca
361 aaagaaaact taagagttag agttgatgct gagtatggtg caactgatgg aaaattaa
421 ttagctaaga gagctaaaga attaggatta gatgctatac atgatacagt acatgaaatg
481 tgtaaagacg aagctagaca tggtaaagca tcttaggat tattaacag acattttgga
541 aaataa

```

8. Subunidades alfa de flavoproteína

- 15 En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína de subunidad alfa de flavoproteína (CD 1056) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 (números de registro YP_001087535; GI: 126698640):

```

1 MGNVLVVIEQ RENVIQTVSL ELLGKATEIA KDYDTKVSAL LLGSKVEGLI
51 DTLAHYGAD E VIVVDDEALA VYTTEPYTKA AYEAIKAADP IVVLFGATSI
101 GRDLAPRVSARIHTGLTADCTGLAVAEDTKLLMTRPAFGGNIMATIVCK
151 DFRPQMSTVR PGVMKKNPEP ETKEAVINRF KVEFNDADKL VQVVQVIKEA
201 KKQVKIEDAK ILVSAGRGMG GKENLDILYE LAEIIIGGEVS GSRATIDAGW
251 LDKARQVGQT GKTVRPDLVI ACGISGAIQH IAGMEDAEFI VAINKNPEAP
20 301 IFKYADVIV GDVHKVLP ELSQLSVAKEK GEVLAN

```

- codificada por un ácido nucleico de subunidad alfa de flavoproteína de *Clostridium*, SEQ ID NO: 38:

```

1 atgggtaacg ttttagtagt aatagaacaa agagaaaatg taattcaaac tgtttctta
61 gaattactag gaaaggctac agaaatagca aaagattatg atacaaaagt tctgcatta
121 cttttagga gtaaggtaga aggttaata gatacattag cacactatgg tgcagatgag
181 gtaatagtag tagatgatga agctttagca gtgtatacaa ctgaaccata taaaaagca
241 gcttatgaag caataaaagc agctgacct atagttgtat taittggtgc aacttcaata
301 ggtagagatt tagctctag agtttctgct agaatacata caggtcttac tgctgactgt
361 acaggctctg cagtagctga agatacaaaa ttattataa tgacaagacc tgcatttgg
421 ggaaataaa tggcaacaat agtttgtaaa gatttcagac ctcaaatgc tacagttaga
481 ccaggggta tgaagaaaaa tgaacctgat gaaactaaag aagctgtaat taaccgtttc
541 aaggtagaat ttaatgatgc tgataaata gttcaagttg tacaagtaat aaaagaagct
601 aaaaaacaag taaataga agatgctaag atattatgtt ctgctggacg tggaaatggg
661 ggaaaagaaa acttagacat actttatgaa ttagctgaaa ttataggtgg agaagttct
721 ggttctcgtg cactataga tgcaggttg ttagataaa caagacaagt tggtaaaact
781 ggtaaaactg taagaccaga ctttatata gcatgtgta tatctggagc aatacaact
841 atagctgta tggaaatgc tgagttata gttgctataa ataaaatcc agaagctcca
901 atattaaat atgctgatg tggtagatt ggagatgttc ataaagtgtc tccagaactt
961 atcagtcagt taagtgtgc aaaagaaaaa ggtgaagttt tagctaacta a

```

9. 2-Cetoisovalerato ferredoxina reductasas

En una realización, una proteína de esporas de *Clostridium* comprende una proteína 2-cetoisovalerato ferredoxina reductasa (CD 116) descrita por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 (números de registro YP_001086585; GI: 126697688):

```

1    MAKILMKGNE AFGKAAIEAG CKYFFGYFIT PQSELPEYLS RELPKIGGAF
51   VQAESEVSAI NMVYGGAGAG ARVMTSSSSP GVALKQEGIT YAVGAEVPCV
101  VLNVMRGGPG LGSIQPSQAD YFMSTRGGGN GDYRTPVFAP ATVQEAVDMI
151  MEAFDVADYY RSPVMVVADG MIGQMMEPVE FRAPEKKREL PPKDWATVGT
201  KGKRKPNVIN SLYLEPEVLE DHCWHLQEKF DAMEKNEVQY EMYKTEDAIF
251  VFAAYGTTSR VVKSALDILR EEGIKAGLIR PKVLWPFPF EAFNQIPNARN
301  ILTVEMSMGQ MVEDVKMAVE GKLPVYFHGR PGGMTPTPAE IVEKAKKIIA
351  GELVAGGAR

```

codificada por un ácido nucleico de subunidad alfa de flavoproteína de *Clostridium*, SEQ ID NO: 40:

10

```

1    atggctaaga tacttatgaa agtaacgaa gcattggaa aagcagctat agaagctggt
61   tgcaaatatt tcttcggta cccaataact ccacaaagtg aattaccaga atattatca
121  agagagttac ctaaataagg tggagcgttc gttcaagctg aatcagaagt ttctgcgata
181  aacatggttt atggtggagc aggtgcagga gcaagagta tgacttctc atcttcacca
241  ggagttgctt taaagcaaga aggtataaca tatgcagtag gagcagaagt tccttgtgtt
301  gtacttaatg taatgagagg tggccagga cttggaagta tacaacctc acaagctgac
361  tactttatgt ctacaagagg tggaggaaat ggagactaca gaactccagt atcgcacca
421  gctacagttc aagaagctgt tgatatgata atggaagctt ttgacgttgc agattattac
481  agatcaccag ttatgtagt tgcagatggt atgatagtc aatgatgga gccagttgaa
541  ttagagctc ctgagaagaa aagagaattg cctcctaaag attgggcaac tgttggaact
601  aaaggaaaaa gaaaacctaa tgtaataaac tctciatact tagagccaga agtactagaa
661  gaccattgtt ggcattaca agaaaaattt gatgcaatgg aaaagaatga agtacaatac
721  gaaatgtaca aacagaaga tgctgaattt gtatttcgac cttatggaac tacttcaaga
781  gtatgtaaaa gcgcaattga tatattaaga gaagaaggaa taaaagcagg tcttataaga
841  cctaaagtat tatggccatt cccattcgaa gcattcaacc aattcctaa tgctagaaac
901  atattgactg tgaatagat tatgggacaa atggtggaag atgttaaat ggcagtagaa
961  ggtaaattac cagtttact ccatggaaga ccaggaggaa tgactccaac accagcagaa
1021 atagttgaaa aagctaaaaa aattattgcc ggagaattgg tgcaggagg tgctagataa

```

II. Inhibición mediante anticuerpos de la unión de esporas microbianas

15 También se describen métodos de inhibición de la unión de esporas microbianas y/o unión a superficies animadas y/o inanimadas usando anticuerpos. En una realización, los anticuerpos inhiben la unión de esporas de *Clostridium*. Estos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales y policlonales. Además, pueden producirse anticuerpos quiméricos, por ejemplo, mediante corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón con genes de anticuerpos humanos. También se contemplan anticuerpos de cadena sencilla así como fragmentos de anticuerpo generados mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo o mediante reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos Fab.

A. Métodos de generación de anticuerpos

25 Pueden proporcionarse anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos (es decir, por ejemplo, policlonales, monoclonales y/o Fab). En una realización, se proporcionan anticuerpos monoclonales que inhiben específicamente la unión de proteínas de superficie de esporas microbianas a diversas superficies (es decir, por ejemplo, superficies animadas y/o superficies inanimadas). Un anticuerpo contra una proteína descrita puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal, siempre que reconozca la proteína. Pueden producirse anticuerpos usando una proteína como antígeno según un procedimiento de preparación de anticuerpos o antisuero convencional. Puede usarse cualquier método adecuado para generar los anticuerpos usados en los métodos y composiciones descritos incluyendo pero sin limitarse a los dados a conocer en el presente documento. Por ejemplo, para la preparación de un anticuerpo monoclonal, se administra una proteína, como tal, o junto con un portador o diluyente apropiado a un animal (por ejemplo, un mamífero) en condiciones que permiten la producción de anticuerpos (es decir, por ejemplo, inmunización). Normalmente, la proteína se administra una vez cada de 2 semanas a 6 semanas, en total, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces. Los animales adecuados para su uso en tales métodos incluyen, pero no se limitan a, primates, conejos, perros, cobayas, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. y pueden inmunizarse mediante inyección con una proteína de longitud completa o cualquier porción, fragmento u oligopéptido que conserve propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie huésped, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Para potenciar la capacidad de producción de anticuerpos,

40

puede administrarse adyuvante completo o incompleto de Freund. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes potencialmente útiles.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero no se limitan a técnicas de hibridoma. Koehler *et al.* Nature 256:495-497(1975); Kosbor *et al.*, Immunol Today 4:72 (1983); Cote *et al.*, Proc NatZAcad Sci 80:2026.-2030 (1983); Cole *et al.*, En: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, Nueva York, N.Y., págs. 77-96 (1985).

Para preparar células que producen anticuerpos monoclonales, se selecciona un animal individual (por ejemplo, un ratón) cuyo título de anticuerpos se ha confirmado, y de 2 días a 5 días tras la inmunización final, se recoge su bazo o ganglio linfático y se fusionan células que producen anticuerpos contenidas en el mismo con células de mieloma para preparar el hibridoma productor de anticuerpos monoclonales deseado. La medición del título de anticuerpo en antisuero puede llevarse a cabo, por ejemplo, haciendo reaccionar la proteína marcada, tal como se describe a continuación en el presente documento y antisuero y luego midiendo la actividad del agente de marcaje unido al anticuerpo. La fusión celular puede llevarse a cabo según métodos conocidos, por ejemplo, el método descrito por Koehler y Milstein (Nature 256:495 [1975]). Como promotor de la fusión, por ejemplo, se usa polietilenglicol (PEG) o virus de Sendai (VHJ), preferiblemente PEG.

Los ejemplos de células de mieloma incluyen NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1 y similares. La proporción del número de células productoras de anticuerpos (es decir, por ejemplo, células de bazo) y el número de células de mieloma que van a usarse es preferiblemente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1. Se añade preferiblemente PEG (preferiblemente PEG 1000-PEG 6000) en una concentración de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 80%. Puede llevarse a cabo fusión celular eficazmente incubando una mezcla de ambas células a de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente de aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C durante de aproximadamente 1 minuto a 10 minutos.

Pueden usarse diversos métodos para examinar un hibridoma que produce el anticuerpo (por ejemplo, frente a un antígeno tumoral o autoanticuerpo). Por ejemplo, cuando se añade un sobrenadante del hibridoma a una fase sólida (por ejemplo, microplaca) a la que se adsorbe el anticuerpo directamente o junto con un portador y luego se añade un anticuerpo anti-inmunoglobulina (si se usan células de ratón en la fusión celular, se usa anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón) o proteína A marcada con una sustancia radiactiva o una enzima para detectar el anticuerpo monoclonal contra la proteína unida a la fase sólida. Alternativamente, se añade un sobrenadante del hibridoma a una fase sólida a la que se adsorbe un anticuerpo anti-inmunoglobulina o proteína A y luego se añade la proteína marcada con una sustancia radiactiva o una enzima para detectar el anticuerpo monoclonal contra la proteína unida a la fase sólida.

La selección del anticuerpo monoclonal puede llevarse a cabo según cualquier método conocido o su modificación. Normalmente, se emplea un medio para células animales al que se añade HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Puede emplearse cualquier medio de selección y crecimiento siempre que el hibridoma pueda crecer. Por ejemplo, pueden usarse medio RPMI 1640 que contiene del 1% al 20%, preferiblemente del 10% al 20% de suero fetal bovino, medio GIT que contiene del 1% al 10% de suero fetal bovino, un medio libre de suero para el cultivo de un hibridoma (SFM-I01, Nissui Seiyaku) y similares. Normalmente, el cultivo se lleva a cabo a de 20°C a 40°C, preferiblemente a 37°C durante de aproximadamente 5 días a 3 semanas, preferiblemente de 1 semana a 2 semanas en aproximadamente el 5% de gas CO₂. El título de anticuerpos del sobrenadante de un cultivo de hibridoma puede medirse según la manera descrita anteriormente con respecto al título de anticuerpos de la anti-proteína en el suero.

La separación y purificación de un anticuerpo monoclonal puede llevarse a cabo según la misma manera que las de anticuerpos policlonales convencionales tales como separación y purificación de inmunoglobulinas, por ejemplo, precipitación con sales, precipitación alcohólica, precipitación de punto isoeléctrico, electroforesis, adsorción y desorción con intercambiadores iónicos (por ejemplo, DEAE), ultracentrifugación, filtración en gel o un método de purificación específico en el que sólo se recoge un anticuerpo con un adsorbente activo tal como una fase sólida de unión a antígeno, proteína A o proteína G y disociando la unión para obtener el anticuerpo.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales mediante cualquier método conocido o modificaciones de estos métodos incluyendo la obtención de anticuerpos a partir de pacientes. Por ejemplo, se prepara un complejo de un inmunógeno (un antígeno contra la proteína) y una proteína portadora y se inmuniza un animal mediante el complejo según la misma manera que la descrita con respecto a la preparación de anticuerpos monoclonales anterior. Se recupera un material que contiene el anticuerpo a partir del animal inmunizado y se separa el anticuerpo y se purifica.

Como complejo del inmunógeno y la proteína portadora que va a usarse para la inmunización de un animal, puede emplearse cualquier proteína portadora y cualquier proporción de mezclado del portador y un hapteno siempre que

se produzca eficazmente un anticuerpo contra el hapteno, que esté reticulado sobre el portador y se use para inmunización. Por ejemplo, pueden acoplarse albúmina sérica bovina, cicloglobulina bovina, hemocianina de lapa californiana, etc. a un hapteno en una razón en peso de aproximadamente 0,1 partes a aproximadamente 20 partes, preferiblemente, de aproximadamente 1 parte a aproximadamente 5 partes por 1 parte del hapteno.

Además, pueden usarse diversos agentes de condensación para acoplar un hapteno y un portador. Por ejemplo, glutaraldehído, carbodiimida, éster activado por maleimida, reactivos de éster activados que contienen grupo tiol o grupo ditiopiridilo, y similares encuentran uso con los métodos descritos. El producto de condensación como tal o junto con un portador o diluyente adecuado se administra a un sitio de un animal que permite la producción del anticuerpo. Para potenciar la capacidad de producción de anticuerpos, puede administrarse adyuvante completo o incompleto de Freund. Normalmente, la proteína se administra una vez cada de 2 semanas a 6 semanas, en total, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 10 veces.

El anticuerpo policlonal se recupera de la sangre, ascitis y similares, de un animal inmunizado mediante el método anterior. El título de anticuerpos en el antisuero puede medirse según la misma manera que la descrita anteriormente con respecto al sobrenadante del cultivo de hibridoma. Pueden llevarse a cabo la separación y purificación del anticuerpo según el mismo método de separación y purificación de inmunoglobulina que el descrito con respecto al anticuerpo monoclonal anterior.

La proteína usada en el presente documento como inmunógeno no está limitada a ningún tipo de inmunógeno particular. Por ejemplo, puede usarse una proteína expresada que resulta de una infección vírica (incluyendo adicionalmente un gen que tiene una secuencia de nucleótidos parcialmente alterada) como inmunógeno. Además, pueden usarse fragmentos de la proteína. Pueden obtenerse fragmentos mediante cualquier método incluyendo, pero sin limitarse a expresar un fragmento del gen, procesamiento enzimático de la proteína, síntesis química, y similares.

Para la producción de anticuerpos en el contexto de los métodos descritos, puede usarse cualquier porción antigénica de una secuencia de aminoácidos de proteína de esporas microbianas contemplada en el presente documento (es decir, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 ó 9) o bien sola o bien fusionada con aminoácidos de otra proteína (es decir, por ejemplo, glutatión para producir un anticuerpo contra una molécula quimérica). Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab.

Se prefieren especialmente anticuerpos neutralizantes, es decir, los que inhiben la formación de dímeros, para fines de diagnóstico y terapéuticos.

No es necesario que los polipéptidos que van a usarse para la inducción de anticuerpos conserven la actividad biológica; sin embargo, el fragmento de proteína, u oligopéptido debe ser antigénico. Los péptidos usados para inducir anticuerpos específicos pueden tener una secuencia de aminoácidos que comprende al menos cinco aminoácidos, preferiblemente al menos 10 aminoácidos. Preferiblemente, deben imitar una porción de la secuencia de aminoácidos de la proteína natural y pueden contener toda la secuencia de aminoácidos de una molécula pequeña, que se produce de manera natural. Pueden fusionarse tramos cortos de una secuencia de aminoácidos con los de otra proteína incluyendo, pero sin limitarse a, hemocianina de lapa californiana y anticuerpo producido contra una molécula quimérica.

También pueden usarse anticuerpos para detectar polipéptidos en muestras que incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales, extractos celulares, extractos tisulares o barridos de superficie usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Pueden unirse moléculas indicadoras a los polipéptidos y anticuerpos para facilitar la detección de la unión polipéptido-anticuerpo.

B. Métodos para la inhibición mediante anticuerpos de la unión de proteínas de superficie de esporas microbianas

En una realización, se contempla un método de examen que comprende un anticuerpo monoclonal y/o policlonal que tiene afinidad por una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*.

Se ha notificado que ratones inmunizados con una mezcla 1:1 de esporas de *B. cereus T* y esporas de *Clostridium sporogenes* PA3679 dieron como resultado la generación de 397 hibridomas que se examinaron para determinar sus reactividades con 10^7 esporas de *B. cereus* y para determinar sus reactividades con 10^7 esporas de *C. sporogenes*. Aparentemente, nueve hibridomas produjeron anticuerpos específicos para esporas de *B. cereus T* mientras que quince hibridomas produjeron anticuerpos específicos para esporas de *C. sporogenes*. Siete hibridomas produjeron anticuerpos que reaccionaron de manera cruzada con esporas de *B. cereus T* y *C. sporogenes*. Quinlan *et al.*, "Monoclonal antibodies for use in detection of *Bacillus* and *Clostridium* spores" Appl Environ Microbiol. 63:482-487 (1997). Se subclonaron dos de los hibridomas que producen anticuerpos específicos para esporas de *C. sporogenes* y se designaron los anticuerpos IgM resultantes C33 y C225.

Se examinaron los anticuerpos cualitativamente (visualmente) para determinar sus reactividades con una variedad de esporas de *Bacillus*, *Clostridium* y *Desulfotomaculum* usando un formato de transferencia puntual. El anticuerpo C33 reaccionó fuertemente con esporas de *C. sporogenes* y débilmente con esporas de *C. perfringens*. El anticuerpo C225 reaccionó débilmente con esporas de *B. megaterium* y fuertemente con esporas de *B. stearothermophilus*, *C. perfringens* y *C. sporogenes*. La localización inmunocitoquímica del antígeno en *C. sporogenes* indicó que está presente en el exosporio y la región de corteza externa de la espora.

Aunque está disponible menos información sobre antígenos de esporas de *C. sporogenes*, se ha demostrado que los antígenos de esporas específicos son distintos de antígenos vegetativos. Norris J., "Bacterial spore antigens: a review" J. Gen. Microbiol. 28:393-408 (1962); y Princewell, T., "Spore antigens of *Clostridium sporogenes*" J. Med. Microbiol. 12: 29-41 (1979). Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que anticuerpos policlonales generados frente a antígenos de esporas de *Clostridium* son comunes a más de un antígeno específico de *Clostridium*. Foegeding *et al.*, "Polyclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect bacterial spores" J. Rapid Métodos Automat. Microbiol. 2:135-150 (1993).

También se describe un método mediante el cual se usa un anticuerpo monoclonal y/o policlonal que tiene afinidad por una proteína de superficie de esporas de *Clostridium* (es decir, por ejemplo, CD1581) para alterar la unión de una espora de *Clostridium* a una superficie. En una realización, la superficie puede seleccionarse del grupo que incluye, pero no se limita a, plástico, cerámica, acero inoxidable, acero de hierro, vinilo, azulejos, laminado de madera, piel (es decir, por ejemplo, piel de cerdo), tejidos corporales internos, prendas de vestir o trajes de protección ambiental.

C. Inhibición mediante anticuerpos de la unión de esporas microbianas

Se usó un método de frotación con cilindro para evaluar la capacidad de esporas de *C. difficile* para unirse a un sustituto de piel humana (es decir, por ejemplo, piel de cerdo). Véase el ejemplo X. Se lavó en primer lugar la piel de cerdo usando un jabón no antimicrobiano durante 30 segundos seguido por enjuague con agua durante 30 s. Tras lavar la piel de cerdo, se añadieron hasta 50 µl de esporas a una zona de 20 mm de diámetro sobre la superficie de la piel. Se permitió que las esporas se secaran durante hasta una hora y entonces se retiraron según el método de frotación con cilindro. Este experimento determinó la capacidad de esporas de *C. difficile* para unirse al sustituto de piel. Los datos preliminares han mostrado que hasta el 80% de las esporas pueden retirarse de la superficie de la piel de cerdo. En experimentos posteriores, se hicieron reaccionar en primer lugar las esporas con anticuerpos frente a superficie de esporas de *C. difficile* antes de aplicarse a la superficie de la piel. Se determinó de nuevo la capacidad para retirar las esporas de la piel usando el método de frotación con cilindro. Los datos preliminares han mostrado la capacidad para retirar más del 80% de las esporas de la piel de cerdo, lo que sugiere que el anticuerpo está impidiendo que las esporas se unan a la piel.

III. Inhibición mediante proteínas de superficie de esporas microbianas de la unión de esporas microbianas

También se describe un método que comprende inhibir la unión de esporas microbianas usando un agente de control de infecciones, en el que el agente comprende al menos una porción de una proteína de esporas microbianas. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que el agente de control de infecciones compite por los sitios de unión de la superficie con los que la espora microbiana tiene afinidad similar. Se cree además que la unión competitiva resultante o bien desplaza las esporas microbianas previamente unidas del sitio de unión a la superficie y/o bien se impide estéricamente la unión debido a la presencia de la al menos una porción de la proteína de superficie de esporas microbianas.

En una realización, la proteína de superficie de esporas puede derivarse de organismos microbianos seleccionados del grupo que comprende bacterias, virus, hongos, algas o mohos. En una realización, el método comprende además impedir la unión de una espora microbiana a una superficie con la proteína de superficie de esporas. En una realización, las proteínas de superficie de esporas se formulan con compuestos distintos de proteínas de superficie de esporas seleccionados del grupo que comprende moléculas pequeñas, proteínas o ácidos nucleicos. En una realización, las proteínas de superficie de esporas se formulan con agentes activos de superficie que pueden incluir, pero no se limitan a, tensioactivos, jabones, detergentes, agentes espumantes, agentes humectantes y agentes de aerosolización. En una realización, los compuestos se seleccionan de la clase de compuestos conocidos como disolventes.

A. Proteínas de superficie de esporas de longitud completa

En una realización, al menos una porción de una proteína de superficie de esporas microbianas comprende una proteína de superficie de esporas microbianas de longitud completa. En una realización, la proteína de superficie de esporas microbianas de longitud completa comprende una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de longitud completa de *Clostridium* comprende una proteína de superficie de esporas de longitud completa de *C. difficile*. En una realización, las proteínas de superficie de esporas de longitud completa de *C. difficile* pueden seleccionarse del grupo que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9.

5 En una realización, la proteína de superficie de esporas microbianas de longitud completa comprende una proteína de superficie de esporas de *Bacillus*. En una realización, la proteína de superficie de esporas de longitud completa de *Bacillus* comprende una proteína de superficie de esporas de longitud completa de *B. anthracis*. En una realización, las proteínas de superficie de esporas de longitud completa de *B. anthracis* pueden seleccionarse del grupo que comprende SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49.

B. Proteínas de superficie de esporas truncadas

10 En una realización, la al menos una porción de una proteína de superficie de esporas microbianas comprende una proteína de superficie de esporas microbianas truncada. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que tal proteína de superficie de esporas microbianas truncada puede construirse mediante plataformas de expresión de proteínas recombinantes (a continuación) en las que una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de superficie de esporas microbianas se integra dentro de un vector y se coloca en combinación operable con un promotor compatible. Alternativamente, tales proteínas de superficie microbiana truncadas pueden crearse digiriendo proteínas de superficie de esporas microbianas de longitud completa usando una cualquiera, o más, de enzimas peptidasas notificadas anteriormente. Tales enzimas peptidasas pueden comprender enzimas incluyendo pero sin limitarse a endopeptidasas, exopeptidasas, amidopeptidasas y/o carboxipeptidasas.

20 En una realización, la proteína de superficie de esporas microbianas truncada se deriva de una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*. En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *Clostridium* comprende una proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile* puede derivarse de una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1581) enumerada en la tabla III:

Tabla III. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MENKKCYSED	SEQ ID NO: 67
WYERGESTAK.	SEQ ID NO: 68
WFQNDREEYE	SEQ ID NO: 69
REAYDEDRER	SEQ ID NO: 70
RGSNCGCSDS	SEQ ID NO: 71
GENRPRNCER	SEQ ID NO: 72
FRREAEIRER	SEQ ID NO: 73
EAREAFCESS	SEQ ID NO: 74
EKKKEALAYE	SEQ ID NO: 75
CEARKLWEEA	SEQ ID NO: 76
EKYWDEYSKY	SEQ ID NO: 77
NYKGIEYLAE	SEQ ID NO: 78
AARLFDEGME	SEQ ID NO: 79
CEARRNGNNG	SEQ ID NO: 80
GNNNNCCHKC	SEQ ID NO: 81
HKCNCNCCRK	SEQ ID NO: 82

30 En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile* puede derivarse de una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1067) tal como se enumera en la tabla IV:

Tabla IV. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MQDYKKNKRR	SEQ ID NO: 83
MMNQPMSTMN	SEQ ID NO: 84
EEEVYTDEIN	SEQ ID NO: 85
SEDMRGFKKS	SEQ ID NO: 86
HHHNGCNTDN	SEQ ID NO: 87
KCECHDDCNP	SEQ ID NO: 88
CNPCNPCKPN	SEQ ID NO: 89
PCNPCKPNPC	SEQ ID NO: 90
DDNCGCHDNC	SEQ ID NO: 91
KCDCEPCEMD	SEQ ID NO: 92
SDECFFENKCG	SEQ ID NO: 93
PECCNPISPR	SEQ ID NO: 94

NFSVSNVAVPF	SEQ ID NO: 95
AIEANRIFDT	SEQ ID NO: 96
MQFQTFTDAT	SEQ ID NO: 97
GPNGEPLTFE	SEQ ID NO: 98
TEVVEVFGSV	SEQ ID NO: 99
PSAGQASVTI	SEQ ID NO: 100
EKICLSNDGI	SEQ ID NO: 101
VIDTGMTTLE	SEQ ID NO: 102
DFDLDPGLDI	SEQ ID NO: 103
VGRNCETTFE	SEQ ID NO: 104
FAVCGERNSE	SEQ ID NO: 105
CCRQKGKGSV	SEQ ID NO: 106
AYKQRGLTVA	SEQ ID NO: 107
VRNLVLELRG	SEQ ID NO: 108
RCGCTEFVAL	SEQ ID NO: 109
AFPAVRAGGG	SEQ ID NO: 110
CKRRVDYVEF	SEQ ID NO: 111
TFNTLSAPIC	SEQ ID NO: 112
LPADGRAVTL	SEQ ID NO: 113
RQEYQTNLTV	SEQ ID NO: 114
DCIGKSILKL	SEQ ID NO: 115
ECNECCEPFY	SEQ ID NO: 116
ELIIPNDIDL	SEQ ID NO: 117
VLCLQETVST	SEQ ID NO: 118
LISEQIVVLA	SEQ ID NO: 119
SPNPIQPRLV	SEQ ID NO: 120
DTFSKVCDFS	SEQ ID NO: 121
QCGPNHGS GK	SEQ ID NO: 122
PSCHR	SEQ ID NO: 123

En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile* puede derivarse de una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 3620) tal como se enumera en la tabla V:

5 Tabla V. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MYDDYKYNKC	SEQ ID NO: 124
NKCYNDYEEM	SEQ ID NO: 125
THVHEYSSEV	SEQ ID NO: 126
KLAEECEDRH	SEQ ID NO: 127
NHRAAGVTGE	SEQ ID NO: 128
AIPINGGTNH	SEQ ID NO: 129
VHKINDNVDF	SEQ ID NO: 130
LDHFKICVT	SEQ ID NO: 131
TGPAIRIPGT	SEQ ID NO: 132
DKHIHLICGE	SEQ ID NO: 133
TTVNDGHCHK	SEQ ID NO: 134
FLFTTQIEAPLV	SEQ ID NO: 135

En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile* puede derivarse de una proteína hipotética de *Clostridium* (CD 1613) tal como se enumera en la tabla VI:

10 Tabla VI. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MENKCREDF	SEQ ID NO: 136
RFTQEYEEDY	SEQ ID NO: 137
PNTNERYYEN	SEQ ID NO: 138
YQVADRYNY	SEQ ID NO: 139
PNKYKEPKIK	SEQ ID NO: 140
QCCCKSMRE	SEQ ID NO: 141
ALELLRYDAL	SEQ ID NO: 142
RPFVNFNQFA	SEQ ID NO: 143

FISDFFIVGA	SEQ ID NO: 144
NLVGIDLSAP	SEQ ID NO: 145
PKDNLSGLDG	SEQ ID NO: 146
TFERFSACNC	SEQ ID NO: 147
DLIDIAGRVS	SEQ ID NO: 148
YPIPVPLTLE	SEQ ID NO: 149
GLINTIGTIP	SEQ ID NO: 150
GVAELIALID	SEQ ID NO: 151
AVIPPTIDLG	SEQ ID NO: 152
AILDAILAAI	SEQ ID NO: 153
IDFILAASTP	SEQ ID NO: 154
LANVDLASLC	SEQ ID NO: 155
NLKAVAFDIT	SEQ ID NO: 156
PADYEDFIAS	SEQ ID NO: 157
LGYLDKHKHY	SEQ ID NO: 158
KECNCNCDCD	SEQ ID NO: 159
DCCCNKGILD	SEQ ID NO: 160
NLYMSNINNQ	SEQ ID NO: 161
VTWAGSLVL	SEQ ID NO: 162
TGVEVLGKKN	SEQ ID NO: 163
DVIVLGNNSD	SEQ ID NO: 164
SRIYFVCVDS	SEQ ID NO: 165
IDYIA	SEQ ID NO: 166

En una realización, una proteína de superficie de esporas truncada de *Clostridium* puede derivarse de una proteína hipotética (CD 1711) tal como se enumera en la tabla VII:

5 Tabla VII. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MLIVTTEKVE	SEQ ID NO: 167
GKKISKVLGL	SEQ ID NO: 168
VRGSTIRAKH	SEQ ID NO: 169
VGKDIGASFK	SEQ ID NO: 170
NLVGGELTGY	SEQ ID NO: 171
NEMLTEARQI	SEQ ID NO: 172
AIGRMVEDAE	SEQ ID NO: 173
AKGANAVIAF	SEQ ID NO: 174
RLSSASVMQG	SEQ ID NO: 175
AAEMLAYGTA	SEQ ID NO: 176
WLEDDNSILEK	SEQ ID NO: 177

En una realización, una proteína de superficie de esporas truncada de *Clostridium* puede derivarse de una proteína hipotética (CD 0881) tal como se enumera en la tabla VIII:

10 Tabla VIII. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MGTKIVLSIV	SEQ ID NO: 178
LIWWAISL	SEQ ID NO: 179
TCIRVIKQSK	SEQ ID NO: 180
VGIIIRLGKF	SEQ ID NO: 181
QKVAETGVHF	SEQ ID NO: 182
LIPFLDKMAY	SEQ ID NO: 183
VIDLREIVID	SEQ ID NO: 184
FPPQPVITKD	SEQ ID NO: 185
NVTMQIDTW	SEQ ID NO: 186
YYKVTDPVRY	SEQ ID NO: 187
VFEIANPIAA	SEQ ID NO: 188
IENLTATTLR	SEQ ID NO: 189
NIIGELDLDE	SEQ ID NO: 190
TLTSRDIINV	SEQ ID NO: 191
KMRTILDEAT	SEQ ID NO: 192

DKWGIK/VRV	SEQ ID NO: 193
ELKMMPPQD	SEQ ID NO: 194
IQVAMEKQMR	SEQ ID NO: 195
AERERREAIL	SEQ ID NO: 196
QAEGNKSAAI	SEQ ID NO: 197
LQAEGEKQSA	SEQ ID NO: 198
ILTAEAKKEA	SEQ ID NO: 199
MVRVAEAGEKE	SEQ ID NO: 200
SAILVAEGEA	SEQ ID NO: 201
EAIRQTAIK	SEQ ID NO: 202
AQGEAEMIKR	SEQ ID NO: 203
TQMATAEGLK	SEQ ID NO: 204
LVFSAMKEAD	SEQ ID NO: 205
IDNMLALKS	SEQ ID NO: 206
MEALEKMAEG	SEQ ID NO: 207
KSTKLVLPSE	SEQ ID NO: 208
AVNFLGTFKG	SEQ ID NO: 209
IKEVMSDDNK	SEQ ID NO: 210
EVLDIKEVLN	SEQ ID NO: 211
DNESLKK	SEQ ID NO: 212

En una realización, una proteína de superficie de esporas truncada de *Clostridium* puede derivarse de una proteína hipotética (eDI511) tal como se enumera en la tabla IX:

5 Tabla IX. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MIDNQKYVIL	SEQ ID NO: 213
SLELHLFFSR	SEQ ID NO: 214
IMKEHALFLE	SEQ ID NO: 215
AGFTNKNYNL	SEQ ID NO: 216
AMEADHYKKQ	SEQ ID NO: 217
FEDLLSYTVS	SEQ ID NO: 218
ASNGIIRPDI	SEQ ID NO: 219
LYSEELVTTL	SEQ ID NO: 220
TSVAEQKTEE	SEQ ID NO: 221
FTGIEINKNI	SEQ ID NO: 222
TTRELNLQSG	SEQ ID NO: 223
VNPQVGQDLV	SEQ ID NO: 224
NYVAQLNSDA	SEQ ID NO: 225
IRLLDGLINF	SEQ ID NO: 226
KERVLDGVLS	SEQ ID NO: 227
CTIFTSNYPL	SEQ ID NO: 228
LLEHIIHEAN	SEQ ID NO: 229
LYRSYVVDLE	SEQ ID NO: 230
NKIDIESKNA	SEQ ID NO: 231
KEIELFWDHI	SEQ ID NO: 232
MMEHALFMRG	SEQ ID NO: 233
LLDPSEGELI	SEQ ID NO: 234
NTSNDFAIKF	SEQ ID NO: 235
NELIEKTNEM	SEQ ID NO: 236
TDSNIKNITE	SEQ ID NO: 237
ETLNETVEFK	SEQ ID NO: 238
DFKEAGASGI	SEQ ID NO: 239
EQCKIKSIL	SEQ ID NO: 240
PLLADHVLRE	SEQ ID NO: 241
ANHYYRILES	SEQ ID NO: 242
YKNM	SEQ ID NO: 243

En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile* puede derivarse de una proteína de tipo colágeno tal como se enumera en la tabla X.

10

Tabla X. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

ES 2 544 435 T3

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MRNIIYLND	SEQ ID NO: 244
DTFISKKYPD	SEQ ID NO: 245
KNFSNLDYCL	SEQ ID NO: 246
IGSKCSNSFV	SEQ ID NO: 247
KEKLIIFFKV	SEQ ID NO: 248
RIPDILKDKS	SEQ ID NO: 249
ILKAELFIHI	SEQ ID NO: 250
DSNKNHIFKE	SEQ ID NO: 251
KVDIEIKRIS	SEQ ID NO: 252
EYYNLRITW	SEQ ID NO: 253
NDRVSMENIR	SEQ ID NO: 254
GYLPIGISDT	SEQ ID NO: 255
SNYICLNITG	SEQ ID NO: 256
nKAWAMNKY	SEQ ID NO: 257
PNYGLALSLN	SEQ ID NO: 258
YPYQILEFTS	SEQ ID NO: 259
SRGCNKPYIL	SEQ ID NO: 260
VTFEDRIIDN	SEQ ID NO: 261
CYPKCECPPI	SEQ ID NO: 262
RITGPMGPRG	SEQ ID NO: 263
ATGSTGPMGV	SEQ ID NO: 264
TGPTGSTGAT	SEQ ID NO: 265
GSIGPTGPTG	SEQ ID NO: 266
NTGATGSIGP	SEQ ID NO: 267
TGVTGPTGST	SEQ ID NO: 268
GATGSIGPTG	SEQ ID NO: 269
VTGPTGNTGV	SEQ ID NO: 270
TGSIGPTGAT	SEQ ID NO: 271
GPTGNTGVTG	SEQ ID NO: 272
SIGPTGVTGP	SEQ ID NO: 273
TGNTGEIGPT	SEQ ID NO: 274
GATGPTGVTG	SEQ ID NO: 275
SIGPTGATGP	SEQ ID NO: 276
TGEIGPTGAT	SEQ ID NO: 277
ATGPTGATGV	SEQ ID NO: 278
TGEIGPTGEI	SEQ ID NO: 279
GVTGATGPTG	SEQ ID NO: 280
VTGEIGPTGA	SEQ ID NO: 281
TGPTGNTGVT	SEQ ID NO: 282
GEIGPTGATG	SEQ ID NO: 283
PTGNTGVTGE	SEQ ID NO: 284
IGPTGATGPT	SEQ ID NO: 285
GVTGEIGPTG	SEQ ID NO: 286
NTGATGSIGP	SEQ ID NO: 287
TGVTGPTGAT	SEQ ID NO: 288
GSIGPTGATG	SEQ ID NO: 289
ATGVTGPTGP	SEQ ID NO: 290
TGATGNSSQP	SEQ ID NO: 291
VANFLVNAPS	SEQ ID NO: 292
PQTLNNGDAI	SEQ ID NO: 293
TGWQTIIGNS	SEQ ID NO: 294
SSITVDTNGT	SEQ ID NO: 295
FTVQENGVYY	SEQ ID NO: 296
ISVSVALQPG	SEQ ID NO: 297
SSSINQYSFA	SEQ ID NO: 298
ILFPILGGKD	SEQ ID NO: 299
LAGLTTEPGG	SEQ ID NO: 300
GGVLSGYFAG	SEQ ID NO: 301
FLFGGTTFTI	SEQ ID NO: 302
NNFSSTTVGI	SEQ ID NO: 303
RNGQSAGTAA	SEQ ID NO: 304

TLTIFRIADTVMT	SEQ ID NO: 305
---------------	----------------

En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile* puede derivarse de una proteína de tipo colágeno tal como se enumera en la tabla XI.

5 Tabla XI. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MLLIMSRNKY	SEQ ID NO: 306
FGPFDDNDYN	SEQ ID NO: 307
NGYDKYDDCN	SEQ ID NO: 308
NGRDDYNSCD	SEQ ID NO: 309
CHHCCPPSCV	SEQ ID NO: 310
GPTGPMGPRG	SEQ ID NO: 311
RTGPTGPTGP	SEQ ID NO: 312
TGPGVGATGP	SEQ ID NO: 313
TGPTGPTGPT	SEQ ID NO: 314
GNTGNTGATG	SEQ ID NO: 315
LRGPTGATGA	SEQ ID NO: 316
TGPTGATGAI	SEQ ID NO: 317
GFGVTGPTGP	SEQ ID NO: 318
TGATGATGAD	SEQ ID NO: 319
GVTGPTGPTG	SEQ ID NO: 320
ATGADGITGP	SEQ ID NO: 321
TGATGATGFG	SEQ ID NO: 322
VTGPTGPTGA	SEQ ID NO: 323
TGVGVTGATG	SEQ ID NO: 324
LIGPTGATGT	SEQ ID NO: 325
PGATGPTGAI	SEQ ID NO: 326
GATGIGITGP	SEQ ID NO: 327
TGATGATGAD	SEQ ID NO: 328
GATGVTGPTG	SEQ ID NO: 329
PTGATGADGV	SEQ ID NO: 330
TGPTGATGAT	SEQ ID NO: 331
GIGITGPTGP	SEQ ID NO: 332
TGATGIGITG	SEQ ID NO: 333
ATGLIGPTGA	SEQ ID NO: 334
TGTPGATGPT	SEQ ID NO: 335
GATGPTGVGV	SEQ ID NO: 336
TGATGATGAT	SEQ ID NO: 337
GADGATGVTV	SEQ ID NO: 338
PTGATGATGA	SEQ ID NO: 339
NGLVGPTGAT	SEQ ID NO: 340
GAAGTPGATG	SEQ ID NO: 341
PTGATGPTGV	SEQ ID NO: 342
GITGATGATG	SEQ ID NO: 343
ATGPTGADGA	SEQ ID NO: 344
TGPTGATGNT	SEQ ID NO: 345
GADGVAGPTG	SEQ ID NO: 346
ATGNTGADGA	SEQ ID NO: 347
TGPTGATGAT	SEQ ID NO: 348
GVTGATGPTG	SEQ ID NO: 349
PTGATGATGA	SEQ ID NO: 350
TGASAIIPFA	SEQ ID NO: 351
SGIPLSLTTI	SEQ ID NO: 352
AGGLVGTPGF	SEQ ID NO: 353
VFGSSAPGL	SEQ ID NO: 354
SNGGVIDLT	SEQ ID NO: 355
NAAGTLTNFA	SEQ ID NO: 356
FSMPRDGTIT	SEQ ID NO: 357
SISAYFSTTA	SEQ ID NO: 358
ALSLVGSTIT	SEQ ID NO: 359
ITATLYQSTA	SEQ ID NO: 360

ES 2 544 435 T3

PNNSFTAIVPG	SEQ ID NO: 361
ATVTLAPPLT	SEQ ID NO: 362
GILSVGSISS	SEQ ID NO: 363
GIVTGLNIAA	SEQ ID NO: 364
TAQTPDRQYAI	SEQ ID NO: 365

En una realización, la proteína de superficie de esporas truncada de *C. difficile* puede derivarse de una proteína de tipo colágeno tal como se enumera en la tabla XII.

5 Tabla XII. Fragmentos de péptidos truncados de proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*

Fragmento de péptido	Número de identificación de secuencia
MSDISGPSLY	SEQ ID NO: 366
QDVGPTGPTG	SEQ ID NO: 367
ATGPTGPTGP	SEQ ID NO: 368
RGATGATGAN	SEQ ID NO: 369
GITGPTGNTG	SEQ ID NO: 370
ATGANGITGP	SEQ ID NO: 371
TGNMGATGPN	SEQ ID NO: 372
GTTGSTGPTG	SEQ ID NO: 373
NTGATGANGI	SEQ ID NO: 374
TGPTGNTGAT	SEQ ID NO: 375
GANGITGPTG	SEQ ID NO: 376
NKGATGANGI	SEQ ID NO: 377
TGSTGPTGNT	SEQ ID NO: 378
GATGANGITG	SEQ ID NO: 379
PTGNTGATGA	SEQ ID NO: 380
TGPTGLTGAT	SEQ ID NO: 381
GATGANGITG	SEQ ID NO: 382
PTGNTGATGA	SEQ ID NO: 383
NGVTGATGPT	SEQ ID NO: 384
GNTGATGPTG	SEQ ID NO: 385
SIGATGATGT	SEQ ID NO: 386
TGATGPIGAT	SEQ ID NO: 387
GATGADGEVG	SEQ ID NO: 388
PTGAVGATGP	SEQ ID NO: 389
DGLVGPTGPT	SEQ ID NO: 390
GPTGATGANG	SEQ ID NO: 391
LVGPTGPTGA	SEQ ID NO: 392
TGANGLVGPT	SEQ ID NO: 393
GATGATGVAG	SEQ ID NO: 394
AIGPTGAVGA	SEQ ID NO: 395
TGPTGADGAV	SEQ ID NO: 396
GPTGATGATG	SEQ ID NO: 397
ANGATGPTGA	SEQ ID NO: 398
VGATGANGVA	SEQ ID NO: 399
GPIGPTGPTG	SEQ ID NO: 400
ENGVAGATGA	SEQ ID NO: 401
TGATGANGAT	SEQ ID NO: 402
GPTGAVGATG	SEQ ID NO: 403
ANGVAGAIGP	SEQ ID NO: 404
TGPTGANGAT	SEQ ID NO: 405
GATGATGATG	SEQ ID NO: 406
ANGATGPTGA	SEQ ID NO: 407
TGATGVLAAN	SEQ ID NO: 408
NAQFTVSSSS	SEQ ID NO: 409
LVNNTLVTFN	SEQ ID NO: 410
SSFINGTNIT	SEQ ID NO: 411
FPTSSTINLA	SEQ ID NO: 412
VGGIYNVSFG	SEQ ID NO: 413
1RATLSLAGF	SEQ ID NO: 414
MSITTFNGV	SEQ ID NO: 415
TQNNFIAKAV	SEQ ID NO: 416

NLTSSDVS	SEQ ID NO: 417
SLSFLVDARA	SEQ ID NO: 418
AAVTLSTFTG	SEQ ID NO: 419
SGTTGSAAG	SEQ ID NO: 420
YVSRYRIQ	SEQ ID NO: 421

C. Miméticos de proteínas de superficie de esporas

5 También se describen composiciones y métodos para preparar y usar composiciones para el control de infecciones que comprenden miméticos de proteínas de superficie de esporas microbianas. En una realización, el mimético de proteína comprende una secuencia de aminoácidos. En una realización, la secuencia de aminoácidos comprende una estructura terciaria circular. En una realización, el mimético de proteína comprende una molécula orgánica pequeña.

10 Se contemplan moléculas orgánicas pequeñas que imitan la conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento al sitio activo de unión a los péptidos. Por ejemplo, se contemplan miméticos de proteínas de superficie de esporas microbianas y/o fragmentos de péptidos. Es posible una variedad de diseños para tales miméticos. Por ejemplo, se contemplan específicamente proteínas cíclicas y/o lineales y/o fragmentos de péptidos, en los que la conformación necesaria para la unión se estabiliza mediante compuestos no peptídicos. La patente estadounidense n.º 5.192.746 concedida a Lobl, *et al.*, la patente estadounidense n.º 5.169.862 concedida a Burke, Jr., *et al.*, la patente estadounidense n.º 5.539.085 concedida a Bischoff, *et al.*, la patente estadounidense n.º 5.576.423 concedida a Aversa, *et al.*, la patente estadounidense n.º 5.051.448 concedida a Shashoua y la patente estadounidense n.º 5.559.103 concedida a Gaeta, *et al.*, describen múltiples métodos para crear tales compuestos.

20 También se conoce en la técnica la síntesis de compuestos no peptídicos que imitan secuencias peptídicas. Por ejemplo, algunos antagonistas no peptídicos imitan la secuencia Arg-Gly-Asp. Eldred, *et al.*, (J. Med. Chem. 37:3882 (1994)). Asimismo, Ku, *et al.*, (J. Med. Chem. 38:9 (1995)) proporcionan aclaración adicional de la síntesis de una serie de tales compuestos. Tales compuestos no peptídicos que imitan proteínas de superficie de esporas microbianas y/o fragmentos de péptidos se contemplan específicamente.

25 También se describen compuestos de imitación sintéticos que son compuestos multiméricos que repiten secuencias peptídicas relevantes. Tal como se conoce en la técnica, pueden sintetizarse péptidos uniendo un grupo amino a un grupo carboxilo que se ha activado mediante reacción con un agente de acoplamiento, tal como dicitclohexilcarbodiimida (DCC). El ataque de un grupo amino libre sobre el carboxilo activado conduce a la formación de un enlace peptídico y a la liberación de dicitclohexilurea. Puede ser necesario proteger grupos posiblemente reactivos distintos de los grupos amino y carboxilo que se pretende hacer reaccionar. Por ejemplo, el grupo α -amino del componente que contiene el grupo carboxilo activado puede bloquearse con un grupo *tert*-butiloxicarbonilo. Este grupo protector puede eliminarse posteriormente exponiendo el péptido a ácido diluido, que deja los enlaces peptídicos intactos.

35 Con este método, pueden sintetizarse fácilmente péptidos mediante un método en fase sólida añadiendo aminoácidos gradualmente a una cadena peptídica en crecimiento que está unida a una matriz insoluble, tal como perlas de poliestireno. El aminoácido carboxilo-terminal (con un grupo protector de amino) de la secuencia peptídica deseada se ancla en primer lugar a las perlas de poliestireno. Entonces se elimina el grupo protector del aminoácido. Se añade el siguiente aminoácido (con el grupo protector) con el agente de acoplamiento. A esto le sigue un ciclo de lavado. Se repite el ciclo según sea necesario.

45 En una realización, los miméticos son péptidos que tienen homología de secuencia con las proteínas de superficie de esporas microbianas y/o fragmentos de péptidos descritos anteriormente. Una metodología común para evaluar la homología de secuencia, y de manera más importante similitudes estadísticamente significativas, es usar un análisis de Monte Carlo usando un algoritmo escrito por Lipman y Pearson para obtener un valor Z. Según este análisis, un valor Z mayor de 6 indica significación probable, y un valor Z mayor de 10 se considera que es estadísticamente significativo. W.R. Pearson y D.J. Lipman, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 85:2444-2448 (1988); D.J. Lipman y W.R. Pearson, Science, 227:1435-1441 (1985). En la divulgación, polipéptidos sintéticos útiles en la solución de problemas de descontaminación microbiana e infección microbiana son los péptidos con similitud y homología de secuencia estadísticamente significativa (valor Z del algoritmo de Lipman y Pearson en el análisis de Monte Carlo que excede de 6).

IV. Examen de composiciones para el control de infecciones

55 Las realizaciones comprenden métodos que comprenden examinar composiciones para el control de infecciones que inhiben, antagonizan, interfieren, desplazan y/o alteran la unión de una espora microbiana a una superficie animada y/o inanimada. En una realización, la presente invención contempla métodos que comprenden examinar composiciones para el control de infecciones que inhiben, antagonizan, interfieren, desplazan y/o alteran la unión de una proteína de superficie de esporas microbianas a una superficie animada y/o inanimada. En una realización, la

superficie animada puede seleccionarse del grupo que comprende piel, tejidos corporales humanos y/o células humanas. En una realización, la superficie inanimada puede comprender superficies duras incluyendo, pero sin limitarse a, cerámica, azulejos, granito y/o acero inoxidable. En una realización, la espora microbiana comprende una espora de *Clostridium*. En una realización, la espora de *Clostridium* comprende una espora de *C. difficile*. En una realización, las composiciones para el control de infecciones examinadas pueden unirse a una proteína de superficie de esporas microbianas. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que las composiciones para el control de infecciones se unen a una superficie bloqueando de ese modo la unión de una proteína de superficie de esporas microbianas. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que tales composiciones para el control de infecciones pueden incluir, pero sin limitarse a, compuestos naturales aislados de fuentes virales, bacterianas, fúngicas, vegetales y animales, así como compuestos sintéticos. Se cree además que ni la fuente ni la estructura química ni el mecanismo de acción de la composición para el control de infecciones es esencial para esta invención.

A. Ensayos para detectar la unión de esporas microbianas a una superficie

1. Ensayos de crecimiento convencionales

En una realización, se describen métodos para detectar esporas microbianas y/o proteínas de esporas microbianas que comprenden: a) proporcionar; i) una superficie sustrato que se sospecha que tiene contaminación por al menos una espora microbiana; ii) un dispositivo de recogida de esporas que comprende una pluralidad de composiciones para el control de infecciones que pueden unirse a la al menos una espora microbiana; y iii) una placa de crecimiento de esporas que puede soportar el crecimiento de la al menos una espora microbiana; b) poner en contacto el dispositivo de recogida de esporas con la superficie sustrato en la que la al menos una espora microbiana se une al dispositivo; c) poner en contacto el dispositivo de recogida de microbios con la placa de crecimiento de esporas; y d) detectar al menos una espora microbiana sobre la placa de crecimiento de esporas. En una realización, la composición para el control de infecciones comprende un fragmento de péptido de proteína de esporas microbianas. En una realización, el fragmento de péptido de proteína de esporas microbianas se selecciona del grupo que comprende un fragmento de péptido de proteína de esporas de *Clostridium*. En una realización, la espora microbiana es una espora de *Clostridium difficile*.

Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que puede realizarse un ensayo de crecimiento usando cualquier espora microbiana. A modo de ilustración, a continuación se usan esporas de *C. sporogenes* en un método para detectar el crecimiento de esporas tras su recogida a partir de una superficie contaminada, pero debe entenderse que puede sustituirse cualquier espora microbiana en la que la recogida y detección de cada espora microbiana respectiva se realizará satisfactoriamente (es decir, por ejemplo, anticuerpos frente a *Clostridium difficile*).

a. Ensayos de frotación con cilindro

Una técnica descrita es adecuada para la recuperación de microorganismos residentes y transitorios de piel humana o animal. Por ejemplo, la técnica puede usarse *in situ* dentro de protocolos clínicos o *in vitro* para estudios que usan piel aislada o equivalentes de piel. ASTM International, "Standard Test Method for Recovery of Microorganisms From Skin using the Cup Scrub Technique" E1874 - 09 (2009). En resumen, se recuperan microorganismos residentes o microorganismos transitorios (es decir, por ejemplo, microorganismos aplicados previamente a un sitio de prueba) del sitio presionando un cilindro rígido contra la piel con presión suficiente como para formar un sello e infundiendo el líquido de recuperación dentro del cilindro. La superficie de la piel se "frota" entonces mecánicamente con una varilla de vidrio, espátula de caucho o algún otro dispositivo adecuado durante un periodo de tiempo prescrito. Se pipetea el fluido del cilindro al interior de un tubo de ensayo, u otro receptáculo adecuado, para su análisis adicional.

Puede incorporarse un procedimiento de frotación con cilindro en cualquier método descrito en el presente documento para evaluar materiales de prueba que contienen composiciones para el control de infecciones que están destinadas a reducir significativamente el número de esporas microbianas sobre una superficie de prueba (es decir, por ejemplo, piel intacta). También puede usarse para proporcionar una indicación de la actividad antimicrobiana residual.

b. Ensayos de cultivo celular

Se incuban de manera anaerobia alícuotas de suspensión de endosporas de *C. difficile* a 35°C sobre BCDC, TCCFA y TSA reducidos previamente (es decir, por ejemplo, con el oxígeno eliminado). Se inoculan de manera idéntica placas de control y experimentales con una suspensión de esporas, y se permite que un conjunto de placas de control se incube y crezca sin alteraciones durante la duración de cada experimento.

Se realizan experimentos de unión colocando un círculo (es decir, por ejemplo, una zona diana) sobre el fondo de una placa de Petri llena de agar, e inoculando la placa con 5 o 10 µl de suspensiones de esporas de *C. difficile* directamente dentro de una zona diana, incubando estas esporas en la campana anaerobia (Forma Scientific, Marietta, Ohio) sobre placas reducidas previamente durante 27 min, 99 min, 150 min y 360 min. Tras la incubación

cronometrada, se retiran las placas, y se añaden 4 ml de agua destilada estéril a cada placa de cultivo. Entonces se agitan las placas a 300 rpm durante 10 min, tras lo cual se retira por pipeteo aséptico la disolución de agitación de la superficie de agar, y vuelven a incubarse las placas de manera anaerobia durante 24, 48 y 72 h. Para determinar si las placas se habían contaminado, se realizan extensiones para microscopio óptico sobre portaobjetos de vidrio a partir de colonias al azar y se fotografiaron en un fotomicroscopio, y se inocularon las placas y se incubaron en condiciones aerobias para identificar cualquier contaminante aerobio.

Para determinar si las esporas aún no están unidas al agar, y establecer si podrían desprenderse y eliminarse por lavado fácilmente de la superficie de agar, también se somete a prueba la disolución de agitación en agua (retirada tras agitar la placa) para detectar la presencia de esporas. Alícuotas del agua (i) se examinan mediante microscopía de fases; y (ii) se usan para cultivar en línea placas de agar; y (iii) se inyectan en caldo BacTec NR6A (caldo de cultivo de sangre anaerobio, BD Microbiology Systems Cockeysville, MD) y se leen las placas y el caldo a las 24 y 48 h para determinar la presencia de crecimiento bacteriano.

2. Ensayos de anticuerpos anti-superficie de esporas

En una realización, se describe un método para detectar esporas microbianas que comprende: a) proporcionar; i) una superficie sustrato que se sospecha que tiene contaminación por al menos una espora microbiana; y ii) un anticuerpo anti-superficie de espора que puede unirse a la al menos una espора microbiana; b) poner en contacto el anticuerpo anti-superficie de espора con la superficie sustrato o superficie de espора en condiciones tales que el anticuerpo se une a la al menos una espора microbiana, creándose un complejo anticuerpo/espора; y c) detectar el complejo anticuerpo/espора. En una realización, el anticuerpo comprende un anticuerpo policlonal (es decir, por ejemplo, F1997). En una realización, el anticuerpo anti-superficie de espора comprende un marcador. En una realización, el marcador comprende un marcador fluorescente. En una realización, la espора microbiana es una espора de *Clostridium difficile*.

Se describen métodos para detectar esporas microbianas que comprenden: a) proporcionar; i) una superficie sustrato que se sospecha que tiene contaminación por al menos una espора microbiana; ii) un anticuerpo anti-superficie de espора que puede unirse a la al menos una espора microbiana; y iii) una placa de ensayo de crecimiento; b) combinar el anticuerpo anti-superficie de espора con el anticuerpo, creándose un complejo anticuerpo/espора; c) poner en contacto el complejo anticuerpo/espора con la superficie sustrato; d) retirar una muestra del complejo anticuerpo/espора (es decir, por ejemplo, mediante el método de frotación con cilindro) de la superficie; e) cultivar en línea la muestra sobre la placa de ensayo de crecimiento. En una realización, el anticuerpo comprende un anticuerpo policlonal (es decir, por ejemplo, F1997). En una realización, la superficie sustrato comprende una superficie de piel de cerdo. En una realización, el marcador comprende un marcador fluorescente. En una realización, la espора microbiana es una espора de *Clostridium difficile*.

a. Desarrollo de anticuerpos

Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que un anticuerpo anti-superficie de espора puede dirigirse hacia cualquier epítipo sobre una superficie de espора (es decir, ya sea una proteína u otra estructura antigénica). A modo de ilustración, se usan esporas de *C. sporogenes* a continuación en un método para generar anticuerpos monoclonales y policlonales anti-superficie de espора, pero debe entenderse que puede sustituirse cualquier espора microbiana en la que se generarán satisfactoriamente anticuerpos contra cada espора microbiana respectiva (es decir, por ejemplo, anticuerpos frente a *Clostridium difficile*).

Se obtuvieron antisuero policlonal y anticuerpos monoclonales de ratón contra esporas de *C. sporogenes* mediante varias inyecciones de 10^8 esporas inactivadas (incubadas en formaldehído al 4% (v/v) durante 4 h a 37°C). Se produjeron anticuerpos monoclonales según los procedimientos de Kohler y Milstein (Kohler y Milstein, 1975). En resumen, se les administró dosis de refuerzo a los ratones en los días 21 y 42 y se les extrajo sangre en el día 50 para obtener anticuerpos policlonales, o se les administró dosis de refuerzo en el día 50 y se sacrificaron para la fusión en el día 53 para obtener anticuerpos monoclonales. Se preparan reservas de esporas haciendo crecer células de *C. sporogenes* en medio de carne cocida a 35°C, y células de *Clostridium perfringens* en medio de tioglicolato fluido a 37°C en condiciones anaerobias.

El antígeno preparado mediante la inactivación con formalina anterior de reservas de esporas de *C. sporogenes* PA3679 estaba libre de material de células vegetativas tal como se observó mediante microscopio de contraste de fases. Phillips *et al.*, "Assessment of immunofluorescence measurements of individual bacteria in direct and indirect assays for *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* spores" J Appl. Bacteriol. 53:223-231 (1982). Se usó un total de 1×10^7 esporas de *C. sporogenes* como antígeno.

Se realiza la producción de anticuerpos monoclonales según uno de muchos procedimientos. Kohler *et al.*, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" Nature 296:495-497 (1975) (incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad). Se examinan los hibridomas para determinar la reactividad con esporas de *C. sporogenes*. Los hibridomas que se encuentra que son reactivos también se examinaron para determinar la reactividad con las células vegetativas.

Se realiza el isotipado de anticuerpos monoclonales usando un formato de inmunoensayo de transferencia puntual. Se aplican esporas a una membrana Immobilon-P® (Millipore Corp., Bedford, Mass.) en un aparato de transferencia puntual. Entonces se incuban las esporas con 100 ml de los sobrenadantes de cultivo tisular apropiados. Se obtiene el isotipo del anticuerpo monoclonal unido a esporas usando antisuero de conejo específico anti-subclase de ratón obtenido de BioRad® (Hercules, Calif.).

Entonces se aplicaron esporas de *Clostridium sporogenes* a una membrana Immobilon-P®, seguido por incubación con los anticuerpos generados anteriormente. De manera similar, se aplican 10^6 de las células vegetativas de *Clostridium* a la membrana, seguido por incubación con los anticuerpos indicados. Se detecta la reactividad con un conjugado de anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón-peroxidasa del rábano (Sigma A4416) o un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón-peroxidasa del rábano (Sigma A8786). El desarrollo del color puede realizarse con el sustrato insoluble 3-amino-9-etil-carbazol (Biomedica Corp.).

Entonces se diluyen los sobrenadantes de cultivo 1:32 y 1:128 con solución salina tamponada con Tris (TBS) (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4). Se mezclan alícuotas de sobrenadantes de cultivo diluidos con un volumen igual del antígeno de espора (4×10^9 esporas/ml) mediante inversión suave durante la noche a 48°C. Sobrenadantes de cultivo diluidos mezclados con agua destilada estéril sirven como control positivo. Se eliminan anticuerpos adsorbidos a esporas mediante centrifugación (aprox. 4.000 3g, 10 min). Se usa el fluido sobrenadante en ensayos de inmunotransferencia tal como se detalló anteriormente.

Se concentran los anticuerpos mediante precipitación con sulfato de amonio de sobrenadantes de cultivo tisular. Halow *et al.*, "Storing and purifying antibodies" En: *Antibodies: A Laboratory Manual*. págs. 283-318. E. Halow y D. Lane (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). La proteína concentrada se biotinila mediante incubación con N-hidroxisuccinimidobiotina (Sigma Chemical Co.) (aprox. 100 mg/mg de anticuerpo en la muestra) a temperatura ambiente durante 4 h. Se añade cloruro de amonio uno molar (20 ml/250 mg de biotina) para detener la reacción y se dializa la proteína biotinilada exhaustivamente frente a solución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl al 0,8%) (PBS), pH 7,0. Para estudios de localización inmunocitoquímica.

Se purifican anticuerpos IgG de los sobrenadantes de cultivo tisular usando una columna de proteína A (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) según las directrices del fabricante. Se purifican anticuerpos IgM del sobrenadante de cultivo usando una columna de anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón (Pierce Chemical Co.). Se diluye el sobrenadante de cultivo 1:1 en PBS y se aplica a la columna de anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón, que se equilibra con PBS. Se realiza el lavado y la elución del anticuerpo de la columna según las directrices del fabricante. Se agrupan las fracciones que contienen proteína y se concentran con un microconcentrador Centricon 10 (Amicon, Danvers, Mass.) y centrifugación a 3.000 g durante 30 min.

3. Ensayos de anticuerpos anti-proteína de superficie de esporas

Se describen métodos para detectar esporas microbianas que comprenden: a) proporcionar; i) una superficie sustrato que se sospecha que tiene contaminación por al menos una espора microbiana, comprendiendo dicha espора al menos una proteína de superficie; y ii) un anticuerpo anti-proteína de superficie que puede unirse a la al menos una proteína de superficie; b) poner en contacto el anticuerpo anti-proteína de superficie con la superficie sustrato en condiciones tales que el anticuerpo se une a la al menos una proteína de superficie, creándose un complejo anticuerpo/proteína; y c) detectar el complejo anticuerpo/proteína. En una realización, la proteína de superficie de esporas incluye, pero no se limita a, CD 1067, CD 1581, CD 3520, CD 0372 o CD 1613. En una realización, el anticuerpo anti-proteína de superficie comprende un marcador. En una realización, el marcador comprende un marcador fluorescente. En una realización, la proteína de superficie es una proteína de superficie de *Clostridium difficile*. En una realización, la proteína de superficie es una proteína de superficie de *Bacillus anthracis*.

Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que un anticuerpo frente a proteína de superficie microbiana puede dirigirse hacia un epítipo específico sobre una proteína de superficie de esporas (es decir, ya sea una secuencia de aminoácidos u otra estructura antigénica). A modo de ilustración, se usa a continuación una proteína de superficie de esporas de *C. difficile* específica en un método para generar anticuerpos monoclonales y policlonales, pero debe entenderse que puede sustituirse cualquier proteína de superficie de esporas microbianas en la que se generarán satisfactoriamente anticuerpos monoclonales y/o policlonales dirigidos contra cada proteína de superficie de esporas microbianas respectiva.

Se obtienen antisuero policlonal y anticuerpos monoclonales de ratón contra proteína hipotética de *C. difficile* (SEQ ID NO: 1) mediante varias inyecciones de proteína hipotética aislada (es decir, por ejemplo, aproximadamente 10^8 proteínas por inyección). Se producen anticuerpos monoclonales según los procedimientos de Kohler y Milstein (Kohler y Milstein, 1975). En resumen, se les administró dosis de refuerzo a los ratones en los días 21 y 42 y se les extrajo sangre en el día 50 para obtener anticuerpos policlonales, o se les administró dosis de refuerzo en el día 50 y se sacrificaron para la fusión en el día 53 para obtener anticuerpos monoclonales. Pueden examinarse hibridomas para determinar la reactividad con esporas de *C. difficile*. Los hibridomas que se encuentra que son reactivos también se examinan para determinar la reactividad con las células vegetativas.

Se realiza el isotipado de anticuerpos monoclonales usando un formato de inmunoensayo de transferencia puntual. Se aplican esporas a una membrana Immobilon-P® (Millipore Corp., Bedford, Mass.) en un aparato de transferencia puntual. Entonces se incuban las esporas con 100 ml de los sobrenadantes de cultivo tisular apropiados. Se obtiene el isotipo del anticuerpo monoclonal unido a esporas usando antisuero de conejo específico anti-subclase de ratón obtenido de BioRad® (Hercules, Calif.).

Se describen métodos para detectar esporas microbianas que comprenden: a) proporcionar; i) una superficie sustrato que se sospecha que tiene contaminación por al menos una spora microbiana, comprendiendo dicha spora al menos una proteína de superficie; y ii) un anticuerpo monoclonal anti-proteína de superficie que puede unirse a la al menos una proteína de superficie; b) poner en contacto el anticuerpo monoclonal anti-proteína de superficie con la superficie sustrato en condiciones tales que el anticuerpo monoclonal se une a la al menos una proteína de superficie, creándose un complejo anticuerpo monoclonal/proteína; y c) detectar el complejo anticuerpo monoclonal/proteína. En una realización, la proteína de superficie de esporas incluye, pero no se limita a, CD 1067, CD 1581, CD 3520, CD 0372 o CD 1613. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-proteína de superficie comprende un marcador. En una realización, el marcador comprende un marcador fluorescente. En una realización, la proteína de superficie es una proteína de superficie de *Clostridium difficile*. En una realización, la proteína de superficie es una proteína de superficie de *Bacillus anthracis*.

B. Ensayos para detectar la unión de proteínas de superficie de esporas microbianas a una superficie

Se proporcionan varios métodos en el presente documento para detectar la unión de proteínas de superficie de esporas con el fin de examinar posibles composiciones para el control de infecciones.

Con el fin de proporcionar métodos y dispositivos para examinar compuestos para desarrollar composiciones para el control de infecciones, el método descrito incorpora generalmente sistemas *in vitro* modelo que imitan un sistema microbiano dado *in vitro* para el que se desean composiciones para el control de infecciones. La gama de sistemas frente a los que pueden examinarse estas composiciones para el control de infecciones es extensa. Por ejemplo, se examinan opcionalmente posibles composiciones para el control de infecciones para determinar efectos en el bloqueo, la ralentización o la inhibición de otra forma de acontecimientos clave asociados con organismos microbianos infecciosos. Por ejemplo, se examinan opcionalmente posibles composiciones de prueba de control de infecciones para determinar su capacidad para bloquear sistemas que son responsables, al menos en parte, de la esporulación o de la unión de esporas a una superficie, incluyendo, por ejemplo, piel, tejidos corporales, granito, acero inoxidable, cerámica, etc. Entonces las composiciones de prueba de control de infecciones que muestran resultados prometedores en estos métodos de ensayo de examen pueden someterse a pruebas adicionales para identificar agentes farmacológicos eficaces para el tratamiento de enfermedad o síntomas de infecciones microbianas.

1. Exámenes de unión

En sus formas más sencillas, los modelos de examen de composiciones para el control de infecciones empleados en los métodos y aparatos descritos examinarán una interacción de una composición para el control de infecciones con un componente de un sistema bioquímico, por ejemplo, interacción receptor-ligando, interacción enzima-sustrato, y similares. En esta forma, el modelo de examen incluirá normalmente dos componentes de interacción del sistema (es decir, por ejemplo, una proteína de esporas bacterianas y una composición para el control de infecciones o una enzima microbiana y una composición para el control de infecciones).

En una realización, el método comprende determinar si una composición de prueba de control de infecciones tiene un efecto sobre las interacciones de unión de proteínas de esporas microbianas con una superficie poniendo en contacto la proteína de esporas microbianas con la composición de prueba de control de infecciones y sometiendo a ensayo para determinar la unión residual de la spora microbiana a la superficie. Entonces se compara la cantidad de unión a superficie residual con una unión a superficie control, por ejemplo, el mismo ensayo de unión realizado en ausencia de la composición para el control de infecciones. Normalmente, tales ensayos de unión implican la medición de un parámetro del sistema de examen. Por "parámetro del sistema de examen" quiere decirse alguna evidencia medible, por ejemplo, la presencia o ausencia de un grupo marcado o un cambio en el peso molecular (por ejemplo, en reacciones de unión, exámenes de transporte), la presencia o ausencia de un producto o sustrato de reacción (en mediciones de renovación de sustrato), o una alteración en la movilidad electroforética (normalmente detectada mediante un cambio en el tiempo de elución de un compuesto marcado).

Aunque descritos anteriormente en cuanto a sistemas de examen de dos componentes, los métodos y aparatos también pueden usarse para examinar efectores de sistemas mucho más complejos, en los que el resultado o el producto final del sistema se conoce y puede someterse a ensayo a algún nivel, por ejemplo, rutas enzimáticas, rutas de señalización de superficie de esporas y similares. Alternativamente, los métodos y aparatos descritos en el presente documento se usan opcionalmente para examinar compuestos que interaccionan con un único componente de un sistema bioquímico, por ejemplo, compuestos que se unen específicamente a un compuesto bioquímico particular, por ejemplo, un receptor, ligando, enzima, ácido nucleico, macromolécula estructural, etc.

En algunas realizaciones, los ensayos pueden implicar la interacción de dos o más componentes. Los ensayos que implican interacciones entre dos componentes pueden considerarse ensayos para potenciadores o inhibidores de la unión entre miembros de "parejas de unión". Las parejas de unión preferidas incluyen, pero no se limitan a, proteínas de esporas microbianas/moléculas orgánicas pequeñas, proteínas de esporas microbianas/ácidos nucleicos, proteínas de esporas microbianas/composiciones para el control de infecciones (es decir, por ejemplo, fragmentos de proteína de superficie de esporas de *Clostridium*). En una realización, cualquier miembro de la pareja de unión puede estar inmovilizado (es decir, por ejemplo, unido a la superficie) mientras que el otro miembro está en una disolución en contacto con la superficie. En otra realización, ambos miembros pueden estar unidos a diferentes superficies que entonces se yuxtaponen para realizar el ensayo.

Por consiguiente, los métodos descritos serán útiles en el examen de composiciones para el control de infecciones que forman una pareja de unión con una molécula receptora, en los que la pareja de unión afecta a una interacción entre la molécula receptora y una superficie. Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor" se refiere generalmente a un miembro de la pareja de unión (es decir, por ejemplo, una proteína de superficie de esporas microbianas). El otro miembro de la pareja de unión se denomina "una composición para el control de infecciones". Por tanto, una pareja de receptor/ligando puede incluir un receptor de proteína típico, habitualmente asociado a la membrana, y su ligando natural, por ejemplo, otra proteína o molécula pequeña. Las parejas de receptor/ligando también pueden incluir parejas de unión de anticuerpo/antígeno, ácidos nucleicos complementarios, proteínas de asociación a ácido nucleico y sus ligandos de ácido nucleico.

Tradicionalmente, los métodos para examinar efectores de una interacción receptor/ligando (es decir, por ejemplo, una interacción de proteína de superficie de esporas microbianas/composición para el control de infecciones) han implicado incubar una pareja de unión de receptor/ligando en presencia de un compuesto de prueba. Entonces se compara el nivel de unión de la pareja de receptor/ligando con controles negativos y/o positivos. Cuando se observa una disminución en la unión normal, se determina que el compuesto de prueba es un inhibidor de la unión de receptor/ligando. Cuando se observa un aumento en esa unión, se determina que el compuesto de prueba es un potenciador o inductor de la interacción. Sin embargo, se contempla que la interacción receptor/ligando se someta a ensayo midiendo la cantidad de unión residual del receptor a una superficie en presencia de la composición para el control de infecciones.

En una realización, los ensayos de examen de alto rendimiento pueden comprender placas de reacción de múltiples pocillos, por ejemplo, microplacas de múltiples pocillos, que permiten el examen simultáneo, en paralelo de grandes números de posibles composiciones para el control de infecciones.

Un conjunto similar, y quizá solapante, de sistemas bioquímicos puede incluir las interacciones entre enzimas microbianas y sus sustratos. El término "enzima" tal como se usa en el presente documento se refiere generalmente a una proteína que actúa como catalizador para inducir un cambio químico en otros compuestos o "sustratos". Normalmente, se examinan efectores de la actividad de una enzima hacia su sustrato poniendo en contacto la enzima con un sustrato en presencia y ausencia del compuesto que va a examinarse y en condiciones óptimas para detectar cambios en la actividad de la enzima. Tras un tiempo fijado para la reacción, se somete a ensayo la mezcla para determinar la presencia de productos de reacción o una disminución en la cantidad de sustrato. Entonces se compara la cantidad de sustrato que se ha catalizado con un control, es decir, enzima en contacto con sustrato en ausencia de compuesto de prueba o presencia de un efector conocido. Como anteriormente, un compuesto que reduce la actividad de enzimas hacia su sustrato se denomina "inhibidor", mientras que un compuesto que acentúa esa actividad se denomina "inductor".

Dependiendo de la realización particular que esté poniéndose en práctica, las composiciones de prueba de control de infecciones se proporcionan en diversos medios diferentes incluyendo, pero sin limitarse a, mediante inyección, libres en disolución, unidas a un portador, unidas a un soporte sólido (es decir, por ejemplo, perlas). Se emplean varios soportes sólidos adecuados para la inmovilización de los compuestos de prueba. Los ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen agarosa, celulosa, dextrano (disponible comercialmente como, por ejemplo, Sephadex, Sepharose), carboximetilcelulosa, poliestireno, polietilenglicol (PEG), papel de filtro, nitrocelulosa, resinas de intercambio iónico, películas de plástico, perlas de vidrio, copolímero de poliaminametil vinil éter-ácido maleico, copolímero de aminoácido, copolímero de etileno-ácido maleico, nailon, seda, etc. Adicionalmente, para los métodos y aparatos descritos en el presente documento, se examinan compuestos de prueba individualmente, o en grupos. El examen en grupos es particularmente útil cuando se espera que las tasas de acierto para compuestos de prueba eficaces sean bajas de manera que no se esperaría más de un resultado positivo para un grupo dado. Alternativamente, tal examen en grupos se usa cuando los efectos de diferentes compuestos de prueba se detectan de manera diferencial en un único sistema.

2. Inmunoensayos

En una realización, se dan a conocer pruebas inmunológicas en las que tiene lugar una reacción entre dos o más agentes inmunológicos relacionados (es decir, por ejemplo, un antígeno y un anticuerpo). Por tanto, por ejemplo, cuando se busca determinar si y cuánto de un antígeno o anticuerpo particular reside en una muestra, debe

intentarse hacer reaccionar la muestra que se sospecha que contiene un antígeno con su pareja de unión inmunológica. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que si tiene lugar una reacción, entonces la visualización de esa reacción demuestra la presencia del antígeno o anticuerpo en el fluido sometido a prueba originalmente.

5 En una realización, puede visualizarse una pareja de unión de anticuerpo/antígeno usando una partícula indicadora o portadora. Un sistema adecuado comprende una técnica de partículas poliméricas en la que se han usado matrices, superficies o partículas de resina sintética como adsorbente sobre el que se ha adsorbido el antígeno (es decir, por ejemplo, un fragmento de proteína de esporas microbianas) o anticuerpo (es decir, por ejemplo, que tiene afinidad por un fragmento de proteína de esporas microbianas) apropiado.

10 Los formatos para inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos competitivos (por ejemplo, ELISA, inhibición de haptenos, etc.) y no competitivos. Se han notificado diversos formatos de inmunoensayo. Véanse las patentes estadounidenses n.^{os} 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168; Asai (1993) *Methods in Cell Biology* Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc. Nueva York, Stites & Terr, eds. (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7^a edición, etc.) y las referencias citadas en los mismos).

3. Ensayos de unión a ácidos nucleicos

20 En otra realización, los materiales y métodos de esta invención se usan para inmovilizar componentes en ensayos de proteínas de unión a ácidos nucleicos. Normalmente tales ensayos detectan la unión de un ácido nucleico por una o más proteínas de unión. Los ensayos se usan generalmente para examinar agentes que mejoran (especificidad o afinidad) o inhiben la unión a ácidos nucleicos por una o más proteínas de unión a ácidos nucleicos particulares. Las proteínas de unión a ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, endonucleasas, polimerasas, receptores de factores de transcripción nucleares, proteínas API (es decir, por ejemplo, *fos andjun*). Los ensayos de unión a ácidos nucleicos se facilitan por la unión a una superficie de o bien el ácido nucleico que contiene el sitio de unión a proteína o bien la propia proteína de unión.

4. Ensayos de unión en disoluciones fisiológicamente compatibles

30 Se apreciará que muchos de los ensayos anteriores requieren condiciones particulares para que los componentes de ensayo objeto (por ejemplo, enzimas) mantengan su actividad deseada. Normalmente tales ensayos se optimizan para mantener condiciones fisiológicamente compatibles para elementos (por ejemplo, pH, composición de iones) críticos para la actividad de los componentes.

35 Es una ventaja significativa que las composiciones para el control de infecciones de esta invención son estables en las concentraciones fisiológicas de la mayoría de las especies iónicas (por ejemplo, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, etc.). Por tanto, los ensayos pueden ejecutarse en condiciones fisiológicamente compatibles convencionales (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), soluciones de Ringer convencionales, y similares).

40 Las composiciones para el control de infecciones de esta invención también pueden usarse para purificar el resto (por ejemplo, polipéptido(s)) con el que forman parejas de unión. Específicamente, las composiciones para el control de infecciones pueden usarse conjuntamente con prácticamente cualquier resina de intercambio aniónico o catiónico. Están disponibles comercialmente resinas de intercambio aniónico y catiónico adecuadas. Las resinas de intercambio catiónico incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse a, carboximetilcelulosa, mientras que las resinas de intercambio aniónico incluyen, pero no se limitan a, DEAE celulosa, medios de intercambio iónico de filtración en gel DEAE SEPHAROSE, heparina, y similares.

50 La interacción de una composición para el control de infecciones con una proteína de superficie de esporas microbianas puede aprovecharse para fines de purificación. Esto se logra de una manera análoga a una resina de intercambio catiónico o de una manera análoga a los sistemas de separación de polihistidina/níquel sustituyendo por mica la resina de intercambio catiónico o la resina de níquel, respectivamente. En una realización, la mica se proporciona como un lecho (o bien de escamas o bien de polvo de mica) a través del cual se hace fluir la muestra. El lecho de mica se aloja en cualquiera de una variedad de recipientes adecuados, incluyendo cartuchos que pueden unirse a jeringas, columnas de cromatografía, y similares. La proteína de superficie de esporas microbianas se une al lecho de mica, mientras que otros componentes de la muestra se eliminan por lavado. Pueden eluirse componentes que no se unen específicamente usando disoluciones salinas a concentraciones suficientes para liberar componentes no deseados al mismo tiempo que se retiene la proteína de superficie de esporas microbianas. Una vez que la composición para el control de infecciones se une a la proteína de superficie de esporas microbianas, la composición para el control de infecciones puede liberarse entonces mediante la aplicación de concentraciones salinas suficientes y/u otras mezclas de disolventes apropiadas según se desee.

5. Sistemas de ensayo de flujo continuo

65 En una realización, los métodos y aparatos de la invención se usan en el examen de composiciones de prueba de control de infecciones usando un sistema de ensayo de flujo continuo. El uso de tales sistemas de ensayo de flujo

continuo no se limita a examinar la unión de proteínas de superficie de esporas a superficies sino que también puede usarse fácilmente en el examen de inhibidores o inductores de la actividad enzimática, o de agonistas o antagonistas de la unión receptor-ligando.

- 5 En resumen, el sistema de ensayo de flujo continuo implica el flujo continuo del sistema bioquímico particular a lo largo de una trayectoria de fluido (es decir, por ejemplo, una micromatriz, una columna de cromatografía o un canal fabricado de tamaño microscópico). Tal como se usa en el presente documento, el término "continuo" se refiere generalmente a una corriente no interrumpida o contigua de la composición particular que está haciéndose fluir de manera continua. Por ejemplo, un flujo continuo puede incluir un flujo de fluido constante que tiene una velocidad fijada, o alternativamente, un flujo de fluido que incluye pausas en la velocidad de flujo del sistema global, de manera que la pausa no interrumpe por lo demás la corriente de flujo.

6. Marcadores detectables

- 15 En una realización, el funcionamiento de un sistema de examen comprende producir una señal o acontecimiento detectable. Tales señales detectables pueden incluir, pero no se limitan a, señales fluorescentes o cromofóricas ópticamente detectables. Para sistemas enzimáticos, tales señales pueden producirse por productos de la acción catalítica de la enzima, por ejemplo, sobre un sustrato fluorogénico o cromogénico. Para sistemas de unión, por ejemplo, interacciones receptor-ligando o unión de superficie de esporas microbianas a superficies, las señales implicarán normalmente la asociación de un ligando marcado con el receptor, o viceversa.

También puede usarse una amplia variedad de otras señales y marcadores detectables en las realizaciones de la invención contemplada en el presente documento. Además de los marcadores fluorogénicos y cromogénicos descritos anteriormente, también pueden medirse convenientemente la desintegración radiactiva, densidad electrónica, cambios en el pH, viscosidad del disolvente, temperatura y concentración salina.

Más generalmente, los marcadores pueden detectarse comúnmente por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores de ácido nucleico útiles incluyen ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, tal como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, dioxigenina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Se conoce una amplia variedad de marcadores adecuados para marcar componentes biológicos y se notifican exhaustivamente en la bibliografía científica y de patentes, y pueden aplicarse generalmente para el marcaje de componentes biológicos. Los marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Los agentes de marcaje incluyen opcionalmente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas u otros polímeros tales como matrices de afinidad, hidratos de carbono o lípidos.

La detección de marcadores puede realizarse mediante una variedad de métodos, incluyendo pero sin limitarse a, seguimiento espectrofotométrico u óptico de marcadores radiactivos o fluorescentes, u otros métodos que siguen una molécula basándose en el tamaño, la carga o la afinidad. Un resto detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables existen en los campos de electroforesis en gel, cromatografía en columna, sustratos sólidos, técnicas espectroscópicas, y similares, y en general, pueden aplicarse marcadores útiles en tales métodos.

45 Por tanto, un marcador puede comprender cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, térmicos o químicos. En algunas realizaciones, los marcadores pueden incluir, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P o ^{33}P), enzimas (por ejemplo, LacZ, CAT, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina y otras, comúnmente usadas como enzimas detectables, o bien como productos marcadores o bien como en un ELISA), intercaladores del ácido nucleico (por ejemplo, bromuro de etidio) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico (por ejemplo poliestireno, polipropileno, látex, etc.) coloreadas.

También se describen marcadores fluorescentes que se caracterizan normalmente por uno o más de lo siguiente: alta sensibilidad, alta estabilidad, bajo fondo, baja sensibilidad ambiental y alta especificidad en el marcaje. Tales restos fluorescentes, que se incorporan en los marcadores de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, 1- y 2-aminonaftaleno, p,p'-diaminoestilbenos, pirenos, sales de fenantridina cuaternarias, 9-aminoacridinas, p,p'-diaminobenzofenonaiminas, antracenos, oxacarbocianina, merocianina, 3-aminoequilenina, perileno, bisbenzoxazol, bis-p-oxazolilbenceno, 1,2-benzofenazina, retinol, sales de bis-3-aminopiridinio, helebrigenina, tetraciclina, esterofenol, bencimidazolilfenilamina, 2-oxo-3-cromeno, indol, xanteno, 7-hidroxycumarina, fenoxazina, salicilato, estrofantidina, porfirinas, triarilmetanos y flavina. Los compuestos fluorescentes individuales que tienen funcionalidades para unirse a un elemento detectable mediante las realizaciones de la invención, o que pueden modificarse para incorporar tales funcionalidades, incluyen pero no se limitan a, cloruro de dansilo; fluoresceínas tales como 3,6-dihidroxi-9-fenilxanthidrol; isotiocianato de rodamina; N-fenil-amino-8-sulfonatoaftaleno; N-fenil-2-amino-6-sulfonatoaftaleno; ácido 4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; ácido pireno-3-sulfónico; 2-toluidinonaftaleno-6-sulfonato; N-fenil-N-metil-2-aminonaftaleno-6-sulfonato; bromuro de etidio; estebrina; auromina-

0,2-(9'-antroil)palmitato; dansilfosfatidiletanolamina; N,N'-dioctadeciloxacarbocianina; N,N'-dihexiloxacarbocianina; merocianina, 4-(3'pirenilo)estearato; d-3-aminodesoxiequilenina; 12-(9'-antroil)estearato; 2-metilantraceno; 9-vinilantraceno; 2,2'(vinilfenileno)bisbenzoxazol; p-bis(2-(4-metil-5-fenil-oxazolil))benceno; 6-dimetilamino-1,2-benzofenazina; retinol; bis(3'-aminopiridinio), 1,1-diyoduro de O-decandiilo; sulfonaftilhidrazona de helibrienina; 5 clorotetraciclina; N-(7-dimetilamino-4-metil-2-oxo-3-cromenil)maleimida; N-(p-(2-bencimidazolil)fenil)maleimida; N-(4-fluorantil)maleimida; bis(ácido homovanílico); resazarina; 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzooxadiazol; merocianina 540; resorufina; rosa de bengala; y 2,4-difenil-3(2H)-furanona.

Muchas etiquetas fluorescentes están disponibles comercialmente, por ejemplo, de SIGMA chemical company (Saint Louis, Mo.), Molecular Probes, R&D systems (Minneapolis, Minn.), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, N.J.), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) y Applied Biosystems (Foster City, Calif.).

15 De manera deseable, los marcadores fluorescentes absorben luz por encima de aproximadamente 300 nm, preferiblemente de aproximadamente 350 nm y más preferiblemente por encima de aproximadamente 400 nm, emitiendo habitualmente a longitudes de onda mayores de aproximadamente 10 nm superiores a la longitud de onda de la luz absorbida. Debe indicarse que las características de absorción y emisión del marcador unido pueden diferir del marcador no unido. Por tanto, cuando se hace referencia a los diversos intervalos de longitud de onda y 20 características de los marcadores, se pretende indicar los marcadores empleados y no un marcador que no está conjugado ni caracterizado en un disolvente arbitrario. Los marcadores fluorescentes pueden detectarse porque al irradiar un marcador fluorescente con luz, pueden obtenerse una pluralidad de emisiones. Por tanto, un único marcador puede proporcionar una pluralidad de acontecimientos medibles. La señal detectable también puede proporcionarse por fuentes quimioluminiscentes y bioluminiscentes.

25 Las fuentes quimioluminiscentes incluyen un compuesto que se excita electrónicamente mediante una reacción química y que entonces puede emitir luz que sirve como señal detectable o dona energía a un aceptor fluorescente. Se ha encontrado que un número diverso de familias de compuestos proporcionan quimioluminiscencia en una variedad de condiciones. Uno de los compuestos es 2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona. El compuesto más popular es 30 luminol, que es un compuesto de 5-amino. Otros miembros incluyen el análogo de 5-amino-6,7,8-trimetoxilo y el de dimetilamino[ca]benceno. Puede hacerse que estos compuestos emitan luminiscencia con peróxido de hidrógeno alcalino o hipoclorito de calcio y una base. Otros de los compuestos son los 2,4,5-trifenilimidazoles, siendo lofina el nombre común para el producto original. Los análogos quimioluminiscentes incluyen sustituyentes de para- 35 dimetilamino y -metoxilo. También puede obtenerse quimioluminiscencia con oxalatos, habitualmente ésteres activos de oxalilo, por ejemplo, p-nitrofenilo y un peróxido, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, en condiciones básicas. Se conocen otros compuestos quimioluminiscentes útiles y están disponibles, incluyendo ésteres de N-alkilacridinio (H₂O₂ básico) y dioxetanos. Alternativamente, pueden usarse luciferinas conjuntamente con luciferasa o lucigeninas para proporcionar bioluminiscencia.

40 Puede acoplarse un marcador directa o indirectamente a una molécula que va a detectarse (un producto, sustrato, enzima, o similar) según muchos métodos. Tal como se indicó anteriormente, se usa una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación del compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las disposiciones de eliminación. Los marcadores no radiactivos se unen a menudo por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por 45 ejemplo, biotina) se une covalentemente a un polímero. El ligando se une entonces a una molécula de anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que o bien puede detectarse inherentemente o bien está unida covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Pueden usarse varios ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, puede usarse conjuntamente con anti-ligandos marcados. Alternativamente, puede usarse 50 cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo. Los marcadores también pueden conjugarse directamente con compuestos que generan señal, por ejemplo, mediante conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterases y glicosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos 55 quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazindionas, por ejemplo, luminol.

Los medios para detectar marcadores dependen del tipo de marcador. Por tanto, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, un medio para la detección puede incluir, pero no se limita a, un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando el marcador es una señal fluorescente, un medio para la 60 detección puede incluir, pero no se limita a, excitar el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectar la fluorescencia resultante, por ejemplo, mediante microscopía, inspección visual, por medio de película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como cámaras digitales, dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y fototubos, y similares. Cuando se usan marcadores fluorescentes y técnicas de detección, a menudo se integran técnicas de microscopía y espectroscopía en el sistema de detección. De manera 65 similar, pueden detectarse marcadores enzimáticos proporcionando sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, se detectan a menudo marcadores colorimétricos

sencillos simplemente observando el color asociado con el marcador. Por ejemplo, el ojo conjugado a menudo aparece de color rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

En una realización, un sistema de examen de flujo continuo genera una señal constante que varía sólo cuando se introduce un compuesto de prueba que afecta al sistema. Específicamente, a medida que los componentes del sistema fluyen a través del sistema, producirán un nivel de señal relativamente constante en una zona de detección. Cuando se introducen periódicamente compuestos de prueba (es decir, por ejemplo, composiciones para el control de infecciones) en el canal y se mezclan con los componentes del sistema, los compuestos de prueba provocan una desviación del nivel de señal constante en la zona de detección. Esta desviación puede correlacionarse entonces con el compuesto de prueba particular examinado.

D. Detección de la unión de proteínas de superficie de esporas microbianas a una proteína epidérmica

Se describe un método para detectar la unión de proteínas de superficie de esporas microbianas a una capa epidérmica. En una realización, la capa epidérmica se deriva de la piel. En una realización, la capa epidérmica se deriva de un órgano interno. En una realización, la capa epidérmica se deriva de una membrana mucosa. En una realización, la capa epidérmica comprende una proteína de la piel. En una realización, la proteína de la piel comprende involucrina. En una realización, la proteína de la piel comprende loricrina. En una realización, la proteína de la piel comprende citoqueratina. Véase la figura 10.

Se recubrieron placas de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas con 5 mg de queratina humana en 100 μ l de PBS/pocillo durante la noche a 4°C. Entonces se lavaron los pocillos tres veces con PBS y luego se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1% en PBS durante 1 h antes de la adición de esporas. Se diluyeron esporas (*C. difficile* preparadas tal como se describió anteriormente) hasta una concentración que tenía una absorbancia de 1,0 a 600 nm en PBS (aproximadamente 5×10^7 esporas/ml) antes de marcarse con FITC. Se añadieron 100 μ l de esporas marcadas por pocillo, y se incubaron las placas a 37°C durante 1 h. Se midió la fluorescencia total (F_{total} por pocillo) tras una incubación de 1 h usando un lector de fluorescencia Fluoroskan II (Labsystems, Beverly, MA), con $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm. Se lavaron los pocillos con PBS tres veces para eliminar esporas no unidas y se midió la fluorescencia restante (F_{prueba}). Se calculó la adherencia tal como sigue: adherencia = $F_{\text{prueba}}/F_{\text{total}}$. Se normalizó la adherencia de células marcadas en ausencia de anticuerpos o composiciones para el control de infecciones al 100%. Se usaron pocillos recubiertos con albúmina sérica bovina como controles negativos. Para ensayos de inhibición, se incubaron en primer lugar esporas marcadas con FITC con anticuerpos anti-espora o composiciones para el control de infecciones durante 1 h a 37°C antes de la adición de la mezcla a los pocillos recubiertos con queratina.

Alternativamente, se bloquearon placas de modelo de piel EpiDerm™ (24 pocillos o 96 pocillos) con albúmina sérica bovina al 1% en PBS durante 1 h antes de la adición de esporas. Se diluyeron esporas (*C. difficile* preparadas tal como se describió anteriormente) hasta una concentración que tenía una absorbancia de 1,0 a 600 nm en PBS (aproximadamente 5×10^7 esporas/ml) antes de marcarse con FITC. Se añadieron 100 μ l de esporas marcadas por pocillo, y se incubaron las placas a 37°C durante 1 h. Se midió la fluorescencia total (F_{total}) por pocillo tras una incubación de 1 h usando un lector de fluorescencia Fluoroskan II (Labsystems, Beverly, MA), con $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm. Se lavaron los pocillos con PBS tres veces para eliminar esporas no unidas y se midió la fluorescencia restante (F_{prueba}). Se calculó la adherencia tal como sigue: adherencia = $F_{\text{prueba}}/F_{\text{total}}$. Se normalizó la adherencia de células marcadas en ausencia de anticuerpos o composiciones para el control de infecciones al 100%. Se usaron pocillos recubiertos con albúmina sérica bovina como controles negativos. Para ensayos de inhibición, se incubaron en primer lugar esporas marcadas con FITC con anticuerpos anti-espora durante 1 h a 37°C antes de la adición de la mezcla a las placas de modelo de piel EpiDerm™.

E. Examen de alto rendimiento de composiciones para el control de infecciones

Se describen métodos que comprenden ensayos de alto rendimiento para examinar composiciones para el control de infecciones. Por ejemplo, se han desarrollado ensayos de unión de alto rendimiento para proteínas y/o ácidos nucleicos; i) métodos de examen de alto rendimiento para proteínas (patente estadounidense n.º 5.559.410); ii) métodos de examen de alto rendimiento para la unión a ácidos nucleicos (es decir, en alineamientos) (patente estadounidense n.º 5.585.639); y iii) métodos de alto rendimiento de examen de la unión ligando/anticuerpo (patentes estadounidenses n.ºs 5.576.220 y 5.541.061) (todas las patentes en el presente documento incorporadas como referencia). Además, están disponibles comercialmente métodos de examen de alto rendimiento (véanse, por ejemplo, Zymark Corp., Hopkinton, Mass.; Air Technical Industries, Mentor, Ohio; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, Calif.; Precision Systems, Inc., Natick, Mass., etc.). Estos sistemas automatizan normalmente todos los procedimientos incluyendo todo el pipeteo de muestras y reactivos, dispensación de líquidos, incubaciones cronometradas y lecturas finales de la microplaca en detector(es) apropiado(s) para el ensayo. Estos sistemas configurables proporcionan un alto rendimiento y un rápido arranque así como un alto grado de flexibilidad y adaptación. Los fabricantes de tales sistemas proporcionan protocolos detallados de los diversos sistemas de alto rendimiento. Por tanto, por ejemplo, Zymark Corp. proporciona boletines técnicos que describen sistemas de examen para detectar la modulación de la transcripción génica, la unión a ligando, y similares.

Convencionalmente, se generan nuevas entidades químicas con propiedades útiles identificando un compuesto químico (denominado "compuesto líder") con alguna propiedad o actividad deseable, creando variantes del compuesto líder y evaluando la propiedad y actividad de esos compuestos variantes. Sin embargo, la tendencia actual es acortar la escala de tiempo para todos los aspectos del descubrimiento de fármacos. Debido a la capacidad para someter a prueba grandes números rápida y eficazmente, los métodos de examen de alto rendimiento (HTS) están reemplazando a métodos de identificación de compuestos líderes convencionales.

En una realización, los métodos de examen de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca que contiene un gran número de posibles compuestos terapéuticos (compuestos candidatos). Tales "bibliotecas químicas combinatorias" se examinan entonces en uno o más ensayos, tal como se describe en el presente documento, para identificar los miembros de la biblioteca (especies químicas o subclases particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos líderes" convencionales o pueden usarse por sí mismos como productos terapéuticos potenciales o reales.

1. Bibliotecas químicas combinatorias

Recientemente, se ha centrado la atención en el uso de bibliotecas químicas combinatorias para ayudar en la generación de nuevos compuestos químicos líderes. Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados o bien mediante síntesis química o bien mediante síntesis biológica combinando un gran número de "elementos estructurales" químicos tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un conjunto de elementos estructurales químicos denominados aminoácidos de cada modo posible para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto de polipéptido). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos a través de tal mezclado combinatorio de elementos estructurales químicos. Por ejemplo, un mezclado sistemático combinatorio, de 100 elementos de construcción químicos intercambiables puede dar como resultado la síntesis teórica de 100 millones de compuestos tetraméricos o 10 mil millones de compuestos pentaméricos.

Las bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos. Patente estadounidense n.º 5.010.175, Furka *et al.*, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493 (1991); y Houghton *et al.*, *Nature* 354:84-88 (1991). La síntesis de péptidos no es de ningún modo el único enfoque ideado y previsto para su uso con los métodos descritos. También pueden usarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad químicas. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (publicación PCT n.º WO 91/19735, 26 de diciembre de 1991), péptidos codificados (publicación PCT WO 93/120242, 14 de octubre de 1993), biooligómeros al azar (publicación PCT WO 92/100091, 9 de enero de 1992), benzodiazepinas (patente estadounidense n.º 5.288.514), diversos tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992), peptidomiméticos no peptídicos con un armazón de beta-D-glucosa (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218 (1992), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661 (1994), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science* 261:1303 (1993) y/o fosfonatos de peptidilo (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59 658 (1994)); bibliotecas de ácido nucleico, bibliotecas de ácido nucleico peptídico (patente estadounidense n.º 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology* 14(3): 309-314 (1996) y documento PCT/US96110287), bibliotecas de hidratos de carbono (Liang *et al.* *Science* 274:1520-1522 (1996) y patente estadounidense n.º 5.593.853) y bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas - benzodiazepinas (Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides (patente estadounidense n.º 5.569.588); tiazolidinonas y metatiazanonas, patente estadounidense n.º 5.549.974; pirrolidinas, patentes estadounidenses n.ºs 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, patente estadounidense n.º 5.506.337; benzodiazepinas, documento 5.288.514; y similares).

Están disponibles comercialmente dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias (véanse, por ejemplo, 357 NIPS, 390 NTS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.).

Se han desarrollado varios sistemas robóticos para químicas en fase de disolución. Estos sistemas incluyen estaciones de trabajo automatizadas como el aparato de síntesis automatizada desarrollado por Takeda Chemical Industries, LTD. Osaka, Japón) y muchos sistemas robóticos que utilizan brazos robóticos (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.) que imitan las operaciones de síntesis manuales realizadas por un químico. Cualquiera de los dispositivos anteriores es adecuado para su uso con los métodos descritos. Además, están disponibles comercialmente numerosas bibliotecas combinatorias por sí mismas. ComGenex, Princeton, N.J.; Asinex, Moscú, Ru; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; ChemStar, Ltd, Moscú, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; o Martek Biosciences, Columbia, Md.

2. Ensayos de alto rendimiento de bibliotecas químicas

Cualquiera de los ensayos para compuestos que inhiben la unión de esporas bacterianas descrito en el presente documento son adecuados para examen de alto rendimiento. Tal como se describió anteriormente, en una

realización preferida, los ensayos examinan agentes que interactúan con una proteína de superficie de esporas microbianas.

5 La implementación de alto rendimiento de los ensayos descritos en el presente documento puede implementarse con, como mucho, modificación de rutina del formato de los ensayos (por ejemplo, para su compatibilidad con los manipuladores robóticos, lectores de placas grandes, y similares). Se describen diversos sistemas de examen de alto rendimiento (por ejemplo, para la unión a proteínas, unión a ácidos nucleicos, etc.). Patentes estadounidenses n.ºs 5.559.410, 5.585.639, 5.576.220 y 5.541.061.

10 Además, están disponibles comercialmente sistemas de examen de alto rendimiento. Zymark Corp., Hopkinton, Mass.; Air Technical Industries, Mentor, Ohio; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, Calif.; o Precision Systems, Inc., Natick, Mass. Estos sistemas automatizan normalmente todos los procedimientos incluyendo todo el pipeteo de muestras y reactivos, dispensación de líquidos, incubaciones cronometradas y lecturas finales de la microplaca en detector(es) apropiado(s) para el ensayo. Estos sistemas configurables proporcionan un alto rendimiento y un rápido arranque así como un alto grado de flexibilidad y adaptación. Los fabricantes de tales sistemas proporcionan protocolos detallados de los diversos sistemas de alto rendimiento. Por tanto, por ejemplo, Zymark Corp. proporciona boletines técnicos que describen sistemas de examen para detectar la modulación de la transcripción génica, la unión a ligando, y similares.

20 V. Evaluación de compuestos de prueba de control de infecciones

En una realización, se describe un método para detectar y/o cuantificar una cantidad, o tasa, de interacción entre una proteína de superficie de esporas microbianas y un compuesto de prueba de control de infecciones. En algunas realizaciones, los métodos de detección incluyen, pero no se limitan a, videomicroscopía; cambios de fluorescencia de DAPI, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o centrifugación.

A. Microscopía

30 En una realización, un compuesto de prueba de control de infecciones se detecta mediante microscopía (es decir, por ejemplo, mediante observación visual directa o usando un dispositivo de grabación de vídeo o fotográfico). Los ensayos que implican visualización microscópica pueden utilizar péptidos de superficie de esporas de *Clostridium* y/u otra proteína de superficie de esporas microbianas que comprenden un marcador (por ejemplo, están marcados fluorescentemente). En una realización, los péptidos y/o las proteínas se colocan adyacentes a un soporte sólido (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), y se exponen a una disolución que contiene un compuesto de prueba de control de infecciones. La unión de los péptidos y/o las proteínas al soporte sólido puede visualizarse directamente usando un microscopio (es decir, por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido).

Un microscopio puede estar equipado opcionalmente con una cámara de fotografía fija o videocámara y puede estar equipado con software de adquisición y análisis de imágenes para cuantificar la abundancia relativa de unión de proteínas y/o péptidos.

45 Puede usarse cualquier marcador que pueda visualizarse en un microscopio conjuntamente con este tipo de detección. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, etc.), marcadores calorimétricos y marcadores radiactivos (con pantalla de centelleo apropiada), y similares. En algunas realizaciones de los ensayos de esta invención, los microtúbulos pueden visualizarse sin ningún marcador (por ejemplo, por medio de microscopía de contraste de interferencia diferencial).

B. Cambios en la fluorescencia de DAPI.

50 En otra realización, la interacción de un compuesto de prueba de control de infecciones con un péptido de superficie de esporas de *Clostridium* y/u otra proteína de superficie de esporas microbianas puede determinarse mediante los cambios en la fluorescencia utilizando un marcador que comprende DAPI. Una disminución en la tasa o la cantidad de fluorescencia de DAPI es indicativa de una interacción entre un compuesto de prueba y una proteína de superficie de esporas microbianas. Se compara un cambio en la fluorescencia con un compuesto de prueba con la observada en una reacción control negativo y/o positivo.

Otros marcadores que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, sulfonato de anilino-naftaleno (ANS) (por ejemplo, n.º de catálogo de Molecular Probes: A-47, A-50, T-53, etc.), bisANS (n.º de catálogo de Molecular Probes: B-153), N-fenil-1-naftileno (NPN) (n.º de catálogo de Molecular Probes: P65), DCV] (n.º de catálogo de Molecular Probes: D3923), rojo de rutenio y violeta de cresol.

C. Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

65 El grado de interacción entre un péptido de superficie de esporas de *Clostridium* y/u otra proteína de superficie de esporas microbianas y un compuesto de prueba de control de infecciones también puede determinarse mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). La transferencia de energía por resonancia de

fluorescencia, un fenómeno que se produce cuando dos fluoróforos con espectros de absorción y emisión solapantes se ubican próximos entre sí (por ejemplo, separados <7 mm). Stryer *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47:819-846 (1978). En una realización, se describe un método de detección de interacciones proteína-proteína usando FRET. Tailor *et al.*, J Cell Biol. 89:362-367 (1981).

En una realización, se combinan proporciones equimolares de péptido de superficie de esporas microbianas y un compuesto de péptido de prueba de control de infecciones marcados de manera diferente (por ejemplo, marcados con fluoresceína y marcados con rodamina, respectivamente). La fluorescencia puede extinguirse tras la interacción del péptido de superficie de esporas microbianas con el compuesto de péptido de prueba, indicando que los fluorocromos unidos respectivos entran en proximidad estrecha suficiente como para que se produzca transferencia de energía. Las tasas y/o la cantidad de fluorescencia generada mediante una reacción con un compuesto de prueba y un control pueden compararse.

VI. Expresión recombinante de proteínas y péptidos de superficie de esporas microbianas

En una realización, se sintetizan péptidos de superficie de esporas de *Clostridium* y/u otras proteínas de superficie de esporas microbianas usando metodología de ADN recombinante. Generalmente esto implica crear una secuencia de ADN que codifica para una proteína, colocar el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en un huésped, aislar la proteína expresada y, si se requiere, renaturalizar la proteína. Puede prepararse ADN que codifica para un péptido y/o una proteína tal como se contempla por esta invención mediante muchos métodos adecuados, incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa mediante métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang *et al.*, Met. Enzymol. 68: 90-99 (1979); el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Met. Enzymol. 68: 109-151 (1979); el método de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22: 1859-1862 (1981); y el método de soporte sólido de la patente estadounidense n.º 4.458.066 (todas las referencias anteriores en el presente documento incorporadas como referencia en su totalidad).

Generalmente, la nomenclatura usada a continuación en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular y química e hibridación de ácidos nucleicos descritos a continuación los entenderán los expertos habituales en la técnica. Se usan técnicas convencionales para métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de polinucleótidos y cultivo y transformación microbianos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Generalmente, se realizan las reacciones enzimáticas y las etapas de purificación según las especificaciones del fabricante suministradas con kits comerciales. Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente según métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales. Sambrook *et al.*, En: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989); y en: Current Protocols in Molecular Biology John Wiley and Sons, Inc., N.Y. (1996).

Se da a conocer una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de polipéptido de superficie de esporas o sus variantes; estas secuencias de ácido nucleico se usan para preparar moléculas recombinantes que expresan una proteína de superficie de esporas. Por ejemplo, la redundancia del código genético permite muchas secuencias de ácido nucleico que codifican para un polipéptido de superficie de esporas. Por tanto, pueden usarse codones que son diferentes de SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 para aumentar la tasa de expresión de una secuencia de nucleótidos de superficie de esporas. Adicionalmente, también pueden usarse codones alternativos en huéspedes de expresión eucariotas para generar variantes de corte y empalme de transcritos de ARN recombinantes que tienen otras propiedades (es decir, por ejemplo, semivida más larga o más corta). Además, codones diferentes también pueden ser deseables para el fin de alterar sitios de enzimas de restricción o, en huéspedes de expresión eucariotas, de alterar los patrones de glicosilación en polipéptidos traducidos.

También se incluyen dentro del alcance de esta invención variantes de secuencias de nucleótidos de proteínas de superficie de esporas microbianas (es decir, por ejemplo, una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*). Estas variantes incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos que tienen deleciones, inserciones o sustituciones de diferentes nucleótidos o análogos de nucleótido siempre que la actividad biológica del producto de traducción de la secuencia de nucleótidos se mantenga. Esta invención no se limita a las secuencias de ácido nucleico de proteínas de superficie de esporas de *Clostridium* (es decir, por ejemplo, SEQ ID NO: 2) sino que incluye específicamente homólogos de ácido nucleico que pueden hibridarse con SEQ ID NO: 2 (es decir, por ejemplo, homólogos de *Bacillus*; SEQ ID NO: 3, 5, y 7), y porciones, variantes y derivados de los mismos, bajo diferentes rigurosidades de hibridación. Por ejemplo, rigurosidades superiores pueden reducir o eliminar la unión no específica entre SEQ ID NO: 2 y otras secuencias de ácido nucleico. Alternativamente, rigurosidades inferiores pueden detectar un mayor número de secuencias de ácido nucleico que tienen homologías diferentes con SEQ ID NO: 2. También se contempla específicamente que fragmentos de SEQ ID NO: 2 (es decir, también denominados una porción) están dentro del alcance de esta invención. En una realización, un fragmento tiene una longitud igual a o mayor de 10 nucleótidos y muestra más del 50% de homología con SEQ ID NO: 2.

Se dan a conocer moléculas antisentido que comprenden la secuencia de ácido nucleico complementaria a al menos una porción de un polinucleótido de SEQ ID NO: 2 o al menos una porción de un polinucleótido que codifica para una proteína de superficie de esporas. También se da a conocer si un gen de fusión que comprende al menos una

porción, variante, derivado y/u homólogo de un ácido nucleico seleccionado del grupo que comprende SEQ ID NO: 2 o un polinucleótido que codifica para una proteína de superficie de esporas ligada a una o más secuencias heterólogas. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que un gen de fusión de este tipo puede detectar la expresión de secuencias de ácido nucleico. Los ejemplos de una secuencia heteróloga incluyen, pero no se limitan a, una secuencia indicadora que codifica para enzimas tales como α -galactosidasa o luciferasa. Los genes de fusión también pueden facilitar la purificación de la proteína expresada. Por ejemplo, una secuencia heteróloga de proteína A permite la purificación de una proteína de fusión sobre una inmunoglobulina inmovilizada. También pueden utilizarse otras trampas de afinidad para purificar una proteína de fusión expresada. Por ejemplo, pueden usarse vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) para expresar una proteína de superficie de esporas como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en tales sistemas se diseñan para que incluyan heparina, trombina o sitios de escisión de proteasa de factor XA de modo que el polipéptido de interés clonado pueda liberarse del resto de GST a voluntad.

A. Expresión recombinante de proteínas de superficie de esporas representativas

Se describe un método para la expresión de proteínas de superficie de esporas microbianas recombinantes. En una realización, el método comprende construir un plásmido que codifica para al menos una porción de una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, el método comprende transfectar un organismo adecuado con el plásmido. En una realización, el organismo adecuado es *E. coli*.

Los datos presentados en el presente documento demuestran la clonación satisfactoria de una *E. coli* transfectada con un plásmido que comprende ácidos nucleicos que codifican para al menos una porción de una proteína de superficie de esporas de *C. difficile*. En una realización, la proteína de superficie de esporas es CD1067. En una realización, la proteína de superficie de esporas es CD3620. El siguiente experimento pretende meramente ser ilustrativo, y no pretende ser limitativo, de la presente realización ya que pueden obtenerse resultados similares con otros constructos de ácido nucleico de proteínas de superficie de esporas usando la técnica básica descrita a continuación.

Se realizó la clonación proteínas de superficie sospechosas de *C. difficile* en la cepa de expresión *E. coli Rosetta-Gami* por medio de un plásmido pET-19b (Novagen, número de producto 69677-3) que tenía una cola de His de diez (10) aminoácidos. Específicamente, se incubó pET-19b+CD1067 (pJEB02) o pET-19b+CD3620 (pJEB03) en un cultivo durante la noche (es decir, por ejemplo, 12 h) que comprendía células de *E. coli Rosetta-Gami*. Véase la figura 11.

Se transfirieron aproximadamente 2 ml del cultivo de células de *E. coli* transfectadas a un medio de cultivo de expresión que comprendía 50 ml de caldo Luria (LB) + monofosfato de adenosina (AMP) 100 μ g/ml y cloranfenicol 34 μ g/ml. Tras hacerse crecer el cultivo hasta aproximadamente DO_{625} de 0,5-0,6, se indujo la expresión del plásmido pET con IPTG 1 mM. Tras la inducción con IPTG, se tomaron muestras de medio de 1 ml a intervalos de aproximadamente una hora. Se centrifugaron las muestras (es decir, por ejemplo, aproximadamente 10.000 x g durante 1 min), y se resuspendió el sedimento resultante en 100 μ l de disolución Novex (45 μ l de tampón de muestra de SDS-PAGE 2x + 45 μ l de H₂O + 10 μ l de ditiotreitol 2 M) y se sometió a ebullición durante aproximadamente 5 minutos. Inicialmente, se ejecutaron aproximadamente 20 μ l de la suspensión de sedimento sometida a ebullición sobre un gel de Tris-Glicina SDS-PAGE al 4-12%, tras lo cual se usaron aproximadamente 10 μ l de la proteína recombinante aislada sospechosa para un análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Se esperaba que el plásmido pJEB02 expresara una proteína que tenía 405 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 44 kDa. La separación mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE confirma esta expectativa mostrando que la expresión de una proteína de aproximadamente 50 kDa aparecía en el plazo de una hora tras la inducción con IPTG y aumentó de intensidad en muestras posteriores (es decir, muestras de 2 - 6 horas). Véase la figura 12. Esta separación preliminar se confirmó usando análisis de inmunotransferencia de tipo Western detectado mediante o bien anticuerpo F1373 anti-*C. difficile* o bien anticuerpo anti-His. Véanse la figura 13A y la figura 13B, respectivamente.

Se esperaba que el plásmido pJEB03 expresara una proteína que tenía 122 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 14 kDa. La separación mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE confirma esta expectativa mostrando que la expresión de una proteína de aproximadamente 20 kDa aparecía en el plazo de una hora tras la inducción con IPTG y aumentó de intensidad en muestras posteriores (es decir, muestras de 2 - 4,5 horas). Véase la figura 14. Esta separación preliminar se confirmó usando análisis de inmunotransferencia de tipo Western detectado mediante o bien anticuerpo F1373 anti-*C. difficile* o bien anticuerpo anti-His. Véanse la figura 15A y la figura 15B, respectivamente.

Muestras de control de inmunotransferencia de tipo Western preinmunitario para tanto el anticuerpo F1373 anti-*C. difficile* como el anticuerpo F1997 anti-*C. difficile* (por ejemplo, preparaciones personalizadas comerciales dirigidas

contra superficies de esporas; Strategic Diagnostics, Inc.) demostraron la ausencia de especificidad de unión en los perfiles de expresión tanto de pJEB02 como de pJEB03. Véase la figura 16A-D. Estos datos muestran que cuando se clonan CD1067 y CD3620 en *E. coli*, una detección de control preinmunitario no es reactiva con o bien una proteína CD1067 recombinante o bien una proteína CD3620 recombinante. En contraposición, un anticuerpo de superficie de esporas de *C. difficile* (es decir, por ejemplo, F1373 o F1997) reacciona específicamente con una proteína CD1067 recombinante y una proteína CD3620 recombinante. Se confirmó la expresión específica de estas proteínas mediante la detección de una cola de His10 unida al constructo de plásmido de expresión que se corresponde con el PM tanto de una proteína CD1067 recombinante como de una proteína CD3620 recombinante.

10 B. Técnicas de síntesis de secuencias de ácido nucleico

También pueden usarse técnicas de química sintética para generar secuencias de ácido nucleico. Pueden sintetizarse oligonucleótidos en un sintetizador de oligonucleótidos de Applied BioSystems según las especificaciones proporcionadas por el fabricante. Sinha *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12:4539 (1984). Tras la síntesis, pueden aparearse oligonucleótidos complementarios calentándolos hasta 90°C en una disolución de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) que contiene NaCl (200 mM) y luego permitiéndoles que se enfríen lentamente hasta temperatura ambiente. Para ensayos de unión y recambio, se purifica ADN de dúplex a partir de geles de poli(acrilamida) nativos (al 15% p/v). Se corta la banda correspondiente al ADN bicatenario y se empapa durante la noche en tampón acetato de sodio 0,30 M (pH 5,0) que contiene EDTA (1 mM). Tras empapar, se extrae el sobrenadante con fenol/cloroformo (1/1 v/v) y se precipita con etanol. Se marcan con radiación los sustratos de ADN en su grupo 5'-OH mediante tratamiento con ³²P-ATP y polinucleótido cinasa de T4. Se eliminan las sales y los nucleótidos no incorporados mediante cromatografía sobre columnas de Sephadex G.

Puede confirmarse una secuencia de nucleótidos sintetizada usando kits disponibles comercialmente que comprenden enzimas incluyendo, pero sin limitarse a, fragmento Klenow de ADN polimerasa I, Sequenase®, Taq ADN polimerasa o polimerasa de T7 termoestable. También puede usarse electroforesis capilar para analizar el tamaño de una secuencia de ácido nucleico y confirmar las secuencias de productos de síntesis de ácido nucleico. Las secuencias sintetizadas también pueden amplificarse mediante: i) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, patente estadounidense n.º 4.683.195; y Mullis *et al.*, patente estadounidense n.º 4.683.202, la reacción en cadena/de amplificación de la ligasa (LCR/LAR); Barany *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:189 (1991); Barany *et al.*, *PCR Methods and Applic.*, 1:5 (1991); y Wu *et al.*, *Genomics* 4:560 (1989).

Puede usarse una secuencia de nucleótidos de proteína de superficie de esporas de una variedad de modos. Por ejemplo, pueden usarse fragmentos de una secuencia de al menos aproximadamente 10 pb, más habitualmente al menos aproximadamente 15 pb y hasta e incluyendo toda la secuencia (es decir, longitud completa) como sondas para la detección y el aislamiento de secuencias de ADN genómico complementarias a partir de *Bacillus*, *Clostridium* así como otras bacterias. Se aíslan secuencias genómicas examinando una biblioteca genómica que contiene ADN bacteriano con toda o una porción de una secuencia de ácido nucleico de proteína de superficie de esporas. Además de examinar bibliotecas genómicas, también puede usarse una secuencia de ácido nucleico de proteína de superficie de esporas para examinar bibliotecas de ADNc preparadas usando ARN bacteriano. Una secuencia de ácido nucleico de proteína de superficie de esporas también es útil en la dirección de la síntesis de una proteína de superficie de esporas. También pueden usarse anticuerpos frente a proteína de superficie de esporas para antagonizar la interacción de proteínas de superficie de esporas con células de mamífero, piel de mamífero, superficies duras, etc. Una proteína de superficie de esporas encuentra uso en la producción de anticuerpos frente a proteínas de superficie de esporas para fines de diagnóstico tales como detectar infecciones con bacterias que expresan una proteína de superficie de esporas. Una secuencia de ácido nucleico de proteína de superficie de esporas también es útil para el examen de antagonistas de unión y la detección de microbios que contienen proteínas de superficie de esporas.

La síntesis química produce habitualmente un oligonucleótido monocatenario. Éste puede convertirse en un ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la hebra individual como molde. La síntesis química de ADN se realiza rutinariamente para secuencias de aproximadamente 100 bases, pero pueden obtenerse secuencias más largas mediante el ligamiento de secuencias más cortas.

Alternativamente, pueden clonarse subsecuencias y escindir las subsecuencias apropiadas usando enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos pueden ligarse entonces para producir la secuencia de ADN deseada.

En una realización, puede clonarse un ácido nucleico de proteína de superficie de esporas microbianas usando métodos de amplificación de ADN tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por tanto, por ejemplo, se amplifica mediante PCR una secuencia o subsecuencia de ácido nucleico, usando un cebador sentido que contiene un sitio de restricción (por ejemplo, NdeI) y un cebador antisentido que contiene otro sitio de restricción (por ejemplo, HindIII). Esto producirá un ácido nucleico que codifica para la proteína deseada que comprende sitios de restricción terminales. Este ácido nucleico puede ligarse entonces fácilmente en un vector que contiene un ácido nucleico que codifica para la segunda molécula y que tiene los sitios de restricción correspondientes apropiados.

Pueden determinarse cebadores de PCR adecuados usando la información de secuencia proporcionada en el presente documento. También pueden añadirse sitios de restricción apropiados al ácido nucleico que codifica para las proteínas de corte o despolimerización de microtúbulos mediante mutagénesis dirigida al sitio. El plásmido que contiene la proteína de corte o despolimerización de microtúbulos se escinde con la endonucleasa de restricción apropiada y entonces se liga en el vector que codifica para la segunda molécula según métodos convencionales.

Pueden expresarse secuencias de ácido nucleico que codifican para péptidos de superficie de esporas de *Clostridium* y/u otras proteínas de superficie de esporas microbianas en una variedad de células huésped, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levaduras y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CRO y HeLa y líneas celulares de mieloma. Un gen de proteína recombinante habitualmente estará operativamente unido a secuencias de control de la expresión apropiadas para cada huésped. Para *E. coli*, los promotores preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotores T7, trp o lambda. Además, un sitio de unión al ribosoma y una señal de terminación de la transcripción forman parte del vector de expresión. Para células eucariotas, las secuencias de control incluirán un promotor y preferiblemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y puede incluir secuencias donadoras yceptoras de corte y empalme.

Los plásmidos de la invención pueden transferirse a la célula huésped elegida mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, cloruro de calcio, fosfato de calcio o electroporación. Pueden seleccionarse células transformadas mediante los plásmidos por la resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo* y *hyg*.

Una vez expresadas, las proteínas recombinantes pueden purificarse según procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. R. Scopes, en: Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); y Deutscher *et al.*, en: Methods in Enzymology vol. 182 (1990). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95% de homogeneidad, y lo más preferido es del 98 al 99% o más de homogeneidad. Una vez purificadas, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden usarse entonces, por ejemplo, como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

VII. Infecciones por *Clostridium*

Clostridium difficile, una bacteria anaerobia Gram-positiva, provoca frecuentemente morbilidad en pacientes hospitalizados y se cree que es un agente etiológico de diarrea asociada a antibióticos y colitis pseudomembranosa. Borriello *et al.*, "Virulence factors of *Clostridium difficile*" Rev. Infect. Dis. 12:S185-S191 (1990); Cerquetti *et al.*, "Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates" Microb. Pathog. 28:363-372 (2000); y Kuipers *et al.*, "Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria" J Biotechnol. 64: 15-21 (1998). Se han evaluado dos factores para determinar su implicación en la patogénesis de estos estados: i) la supresión de la flora intestinal residente mediante la administración de antibióticos (Freeman *et al.*, "Antibiotics and *Clostridium difficile*" Microbes Infect. 1:377-384 (1999); y George W., "Antimicrobial agent-associated colitis and diarrhea: historical background and clinical aspects" Rev. Infect. Dis. 6:S208-S213 (1984); y ii) la producción por la bacteria de dos toxinas de alto peso molecular (PM) (toxinas A y B) (Pothoulakis *et al.*, "Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins" Am. J Physiol. -Gastroint. Liver Physiol. 280:G178-G183 (2001); y Wren B., "Molecular characterisation of *Clostridium difficile* toxins A and B" Rev. Med. Microbiol. 3:21-27 (1992).

Como con otros patógenos enterotoxigénicos, a la colonización del intestino por *C. difficile* le sigue el suministro de toxinas, lo que requiere adherencia bacteriana a la mucosa. En un modelo de hámster sirio de enfermedad inducida por clindamicina, se notificó una correlación entre eficacias variables de colonización del intestino por diferentes cepas de *C. difficile* y sus capacidades para asociarse con regiones del tracto gastrointestinal que abarcan desde el yeyuno hasta el colon. Al menos parte de la variación se sugirió que se debía a factores distintos de la producción de toxinas. Sin embargo, la adherencia de una cepa escasamente virulenta a la mucosa del intestino delgado aumentó mediante la administración de una preparación de toxinas en bruto, posiblemente debido al enmascaramiento de sitios de receptor tras daño celular.

Se ha mostrado que dos factores de virulencia de *C. difficile* son exotoxinas, toxina A (TcdA) y toxina B (TcdB) 3, poco se sabe sobre otros factores implicados en los procesos de adherencia y colonización. Voth *et al.*, "*Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease" Clin. Microbiol. Rev. 18, 247-263 (2005). Esto está en contraposición con otros organismos entéricos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella spp.* Posiblemente, esto podría explicarse parcialmente por la falta de sistemas de mutagénesis bien desarrollados para estudiar *C. difficile*. Un enfoque para comprender posiblemente *C. difficile* implica identificar las ubicaciones genómicas de posibles factores implicados en la patogenicidad. Se ha notificado la secuencia genómica completa de la cepa de *C. difficile* 630 (tipo epidémico X; virulenta y resistente a múltiples fármacos). Wust *et al.*, "Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods" Clin. Microbiol 16:1096-1101 (1982).

El genoma de la cepa de *C. difficile* 630 comprende un cromosoma circular de 4.290.252 pb y un plásmido, pCD630,

de 7.881 pb. El cromosoma codifica para secuencias codificantes predichas de 3.776 (CDS); en común con otras bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C, el cromosoma tiene un fuerte sesgo de codificación, codificándose el 82,1% de las CDS en la hebra líder. El plásmido porta 11 CDS, ninguna de las cuales tiene una función obvia. El análisis mediante FASTA recíproco frente a los cuatro genomas de clostridio secuenciados, *C. acetobutylicum*, *C. botulinum*, *C. perfringens* y *C. tetani*, mostró que sólo 567 (15%) de las CDS de *C. difficile* se comparten con todos los clostridios secuenciados, mientras que 1.893 (50%) son únicas para *C. difficile*. Las CDS de clostridio conservadas codifican principalmente para funciones esenciales, mientras que las CDS únicas de *C. difficile* codifican para muchas funciones auxiliares y elementos móviles. Sebahia *et al.*, "The multi-drug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome" *Nature Genetics* 38:779-786 (2006).

Se ha observado la unión de proteínas de capa de superficie (SLP) de *C. difficile* purificadas tanto en células epiteliales humanas como en tejidos gastrointestinales. Calabi *et al.*, "Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues" *Infect Immun* 70:5770-5778 (2002). Se observa la unión tanto de células como de tejidos con SLP extraídas con ácido y con la subunidad de alto PM recombinante soluble. En contraposición, se observa mucha menos o ausencia de unión con una subunidad de SLP de bajo PM recombinante soluble, expresada y purificada en las mismas condiciones que una subunidad de SLP de alto PM recombinante. Debido a que un suero de anti-subunidad de alto PM bloqueó parcialmente la adherencia de *C. difficile* a células HEP-2, es posible que las SLP estén implicadas en la adherencia de bacterias completas a células epiteliales. Se cree que las conformación natural de estas proteínas se conserva durante la adhesión porque; i) preparaciones de SLP tanto nativas como recombinantes conservaban las actividades peptidoglicano hidrolasa; ii) las SLP extraídas con ácido pueden polimerizarse en estructuras de orden superior tras la adición de calcio; y iii) antisueros generados contra ambas subunidades recombinantes reaccionan a altos títulos con células de *C. difficile* completas.

Se sospecha que *Clostridium perfringens* provoca gangrena gaseosa y es una forma grave de gangrena (muerte tisular; también denominada infección subcutánea necrotizante). Las gangrena gaseosa también puede resultar de infecciones por *Streptococcus spp.* y *Vibrio vulnificus*.

La gangrena gaseosa se produce habitualmente como resultado de la infección con una bacteria *Clostridium perfringens* que, en condiciones anaerobias (bajo contenido en oxígeno), produce toxinas que provocan muerte tisular y síntomas asociados. En los Estados Unidos, la gangrena gaseosa es poco común, con sólo 1.000-3.000 casos anuales. La gangrena gaseosa se produce generalmente en el sitio de traumatismo o una herida quirúrgica reciente pero también puede producirse espontáneamente. Los pacientes que desarrollan gangrena gaseosa espontáneamente a menudo tienen un factor de riesgo alto incluyendo, pero sin limitarse a, una enfermedad de los vasos sanguíneos subyacente (es decir, por ejemplo, aterosclerosis o endurecimiento de las arterias), diabetes o cáncer de colon.

La aparición de gangrena gaseosa es generalmente súbita y drástica. La inflamación comienza en el sitio de infección como una hinchazón de color rojo pálido a parduzco y extremadamente dolorosa. Puede sentirse gas en el tejido como una sensación crepitante cuando se presiona la zona hinchada con los dedos. Los bordes de la zona infectada se expanden tan rápidamente que son visibles cambios a lo largo de unos cuantos minutos. El tejido implicado se destruye completamente.

Las bacterias *Clostridium perfringens* producen muchas toxinas diferentes, cuatro de las cuales (es decir, por ejemplo, alfa, beta, épsilon y iota) pueden provocar síndromes potencialmente mortales. Además, provocan muerte tisular (es decir, por ejemplo, necrosis), destrucción de células sanguíneas (es decir, por ejemplo, hemólisis), disminución local de la circulación (es decir, por ejemplo, vasoconstricción) y fuga de los vasos sanguíneos (es decir, por ejemplo, aumento de la permeabilidad vascular).

Las toxinas de *Clostridium perfringens* son responsables tanto de la destrucción del tejido local como de los síntomas sistémicos (los otros síntomas que se producen por todo el cuerpo). Los síntomas sistémicos se desarrollan de manera temprana en una infección por gangrena gaseosa e incluyen, pero no se limitan a, sudoración, fiebre y ansiedad. Si no se trata, el sujeto desarrolla un síndrome similar a un shock que incluye, pero no limita a, disminución de la tensión arterial (es decir, por ejemplo, hipotensión), insuficiencia renal, coma y finalmente muerte. Otros síntomas de gangrena gaseosa pueden incluir, pero no se limitan a, dolor de moderado a intenso alrededor de una lesión cutánea, hinchazón progresiva alrededor de una lesión cutánea, fiebre de moderada a alta, color de la piel inicialmente pálido, posteriormente progresión hacia tez oscura hasta color rojo o púrpura oscuro, ictericia, formación de vesículas, vesículas coalescentes que se combinan en ampollas grandes, ampollas llenas de fluido de color rojo parduzco, drenaje de los tejidos, fluido sanguinolento o de color rojo parduzco con olor fétido (es decir, por ejemplo, descarga serosanguínea), aumento de la frecuencia cardíaca (es decir, por ejemplo, taquicardia), sudoración, enfisema subcutáneo (es decir, por ejemplo, aire bajo la piel) o crepitación (es decir, por ejemplo, aire en los tejidos).

Alternativamente, el sujeto puede estar en shock, que comprende palidez general, extremidades frías, baja tensión arterial o frecuencia cardíaca rápida. En última instancia, puede desarrollarse una infección sistémica que implica todo el cuerpo (es decir, por ejemplo, toxicidad sistémica o septicemia). Otros métodos de determinación de la presencia de gangrena gaseosa incluyen, pero no se limitan a, una tinción de Gram de fluido de la zona infectada

5 puede mostrar bacilos Gram-positivos (es decir, por ejemplo, una especie de *Clostridium*); un cultivo puede hacer crecer las bacterias que provocan la infección; cultivos de sangre pueden hacer crecer las bacterias infecciosas; un cultivo anaerobio de tejido y/o fluido puede revelar al menos una especie de *Clostridium*; o un exploración mediante rayos X, tomografía computarizada o una imagen de resonancia magnética de la zona infectada puede mostrar gas en los tejidos.

10 El tratamiento de la gangrena gaseosa implica generalmente una eliminación quirúrgica rápida del tejido muerto, dañado e infectado (es decir, por ejemplo, desbridamiento). Puede estar indicada la amputación de un brazo o una pierna para controlar la propagación de la infección. Pueden administrarse antibióticos convencionales (es decir, por ejemplo, penicilina) por vía intravenosa como una dosis en bolo inicial seguido por un régimen oral a largo plazo.

VIII. Usos profilácticos y terapéuticos

A. Descontaminación de hospitales

15 Los patógenos de hospitales (es decir, por ejemplo, *C. difficile*) son responsables de la gran mayoría de las infecciones bacterianas tanto en el personal del hospital como en la población de pacientes residentes. Tales infecciones pueden provocar síntomas incluyendo, pero sin limitarse a, diarrea grave pero también pueden dar como resultado muerte tras la infección de un paciente comprometido (es decir, por ejemplo, un paciente inmunocomprometido). En consecuencia, el mantenimiento antiséptico mejorado tanto de la instalación hospitalaria como del personal debe facilitar la recuperación del paciente y reducir los costes globales del cuidado sanitario debido a duraciones de la hospitalización más cortas.

20 Algunas bacterias (es decir, por ejemplo, *C. difficile*) producen esporas que se ha demostrado que son altamente resistentes a desinfectantes comunes de piel y superficies. Los limpiadores disponibles actualmente tanto para las superficies de instalaciones hospitalarias como para la piel del personal del hospital (es decir, capas epidérmicas) son ineficaces para destruir y/o eliminar esporas bacterianas. Las bacterias anaerobias (es decir, por ejemplo, *C. difficile*) requieren técnicas de manejo y equipo especializados para trabajar con las mismas y manipularlas. En consecuencia, actualmente no hay ningún modo fácil de desarrollar un "limpiador para lavarse las manos de eliminación de esporas" específico para bacterias anaerobias.

25 De hecho, *C. difficile* es responsable del 15-25% de todos los casos de diarrea asociada a antibióticos. Las reapariciones de este tipo de diarrea es un problema de gestión grave, difícil y todavía sin resolver y aumentan tanto la duración como el coste global de la hospitalización. La mayoría de los estudios demuestran que las reapariciones hospitalarias de infecciones por *C. difficile* se dividen 50:50 entre una reinfección con el mismo subtipo bacteriano o uno diferente. El control adecuado de estos tipos de reapariciones depende de la calidad de los procedimientos antimicrobianos tales como lavado de manos, descontaminación ambiental y aislamiento entérico. Se ha demostrado la contaminación del entorno y la persistencia de esporas y se ha implicado en infecciones cruzadas. Barbut *et al.*, "Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-Associated diarrhea" J Clin Microbiol 38: 2386-2388 (2000).

35 En una realización, se da a conocer una composición que comprende al menos un componente de proteína más exterior de una spora bacteriana anaerobia. En una realización, la bacteria anaerobia comprende una spora de *C. difficile*. En una realización, el componente de proteína se deriva de una capa de exosporio. En una realización, el componente de proteína comprende una proteína de superficie de esporas. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que el componente de proteína más exterior de una spora bacteriana anaerobia dirige la unión de las esporas a los tejidos de un organismo (es decir, por ejemplo, piel o intestino) o a superficies duras inanimadas (es decir, por ejemplo, acero inoxidable, granito, cuero, vinilo, cerámica, etc.).

40 En una realización, se describe un método que comprende examinar composiciones que pueden alterar las interacciones de unión entre proteínas de esporas anaerobias y tejidos o superficies inanimadas. En una realización, un componente de proteína más externa de una spora bacteriana anaerobia sirve como diana molecular para examinar tales composiciones.

45 Puede expresarse una proteína de superficie de esporas derivada de un exosporio de *C. difficile* y purificarse mediante métodos convencionales (mencionados anteriormente). En consecuencia, usando proteína de superficie de esporas aislada y purificada, pueden usarse ensayos de examen sencillos para desarrollar productos de eliminación de esporas anaerobias (por ejemplo, limpiadores para lavarse las manos, limpiadores de superficies inanimadas, disoluciones para la descontaminación de todo el cuerpo) sin la necesidad de trabajar con el organismo de *C. difficile* intacto. Esto elimina la necesidad mencionada anteriormente de equipo anaerobio a gran escala y miniaturiza eficazmente el procedimiento de examen.

B. Personal de emergencias

50 Se describen métodos tratamiento profiláctico y terapéutico de personal de urgencias que responden a la contaminación microbiana (es decir, por ejemplo, equipos de primera respuesta). En una realización, el personal de

emergencias incluye, pero no se limita a, técnicos de emergencias médicas (EMT), bomberos, policías, periodistas, perros policía o caballos policía.

5 La recogida e identificación de sustancias desconocidas puede ser un procedimiento peligroso y que generalmente requiere mucho tiempo. En particular, el análisis microbiano requiere normalmente equipo especializado en un laboratorio. Con el reciente aumento en el terrorismo global en el que hay un alto riesgo aumentado de encontrarse con sustancias tóxicas (es decir, por ejemplo ántrax), hay una necesidad de prevenir y/o tratar rápidamente la contaminación del personal de emergencias. Además, deben estar fácilmente disponibles protocolos de examen y/o prueba sin equipo especializado.

10 Con la reciente aceleración de las actividades terroristas alrededor del mundo, el personal de emergencias necesita una composición fácilmente disponible que comprenda compuestos que proporcionen protección específica frente a la infección microbiana. La necesidad de tal protección para el personal de emergencias se extiende más allá de los ataques terroristas a acontecimientos que incluyen, pero no se limitan a, desastres naturales, choques de camiones y accidentes industriales. Estos acontecimientos pueden dispersar sustancias microbianas y hacen que la identificación rápida sea casi imposible al eliminar o destruir las descripciones escritas, etiquetas de aviso, etc. de dichas fuentes microbianas.

15 Sin conocer la identidad del microbio, el personal de emergencias se pone a sí mismo, a sus familias y a otros en alto riesgo de contaminarse así como a las personas a las que están tratando. También es necesario que un trabajador de emergencias conozca a qué ha estado expuesta la persona a la que está tratando porque no puede tratar apropiadamente a una persona sin conocer qué está provocando el estado de la persona y si el personal de emergencias no conoce a qué sustancia ha estado expuesta una persona, pueden tratar a esa persona con un fármaco que reaccionará con la sustancia desconocida de un modo negativo.

20 El personal de emergencias no son las únicas personas que necesitan análisis, protección y tratamiento rápido y eficaz de/frente a sustancias desconocidas. Otros ejemplos de personas que necesitan tener profilaxis, tratamiento y/o análisis rápido de sustancias desconocidas incluyen, pero no se limitan a, una persona de limpieza de residuos que limpia un emplazamiento industrial, un empleado de correos que observa un paquete del que se escapa un fluido, un oficial de policía que ha encontrado una sustancia desconocida en el coche de un sospechoso y un profesor que ha encontrado un niño inconsciente al lado de un frasco de productos químicos sin etiquetar.

25 Los métodos actuales usados para someter a prueba una sustancia desconocida están a menudo disponibles sólo en un laboratorio especializado. Se pierde un tiempo precioso esperando por el transporte de la muestra, la reunión del personal entrenado para realizar las pruebas. En consecuencia, se da a conocer un kit que comprende un alineamiento de ADN microbiano marcado, una disolución de extracción de ADN de muestra y un detector que puede cuantificar el marcador. Un kit de este tipo permitiría una determinación en el sitio del tipo de contaminación microbiana.

30 La descontaminación no específica es una tarea laboriosa y que requiere mucho tiempo que puede no ser eficaz si están presentes esporas microbianas. Se contempla una composición de descontaminación fácilmente disponible que comprende una pluralidad de fragmentos de péptidos derivados de al menos una proteína de superficie de esporas. Tales fragmentos desplazarían a las esporas bacterianas de superficie sólidas (es decir, por ejemplo, paredes, techos, escaleras de edificios, muebles de oficina, etc.) así como de las capas epiteliales externas (es decir, por ejemplo, la piel) del personal de emergencias. Además, composiciones o bien parenterales, intranasales, pulmonares o bien orales adecuadas para su administración a seres humanos y/o animales desplazarían a esporas bacterianas de tejidos corporales (es decir, por ejemplo, boca, garganta, conductos nasales, pulmones, estómago, intestino, vejiga o colon). En consecuencia, se da a conocer una composición que comprende un compuesto que tiene una afinidad por una proteína de superficie de esporas, en la que la proteína es responsable de la unión de una espora microbiana a una superficie (es decir, por ejemplo, una superficie artificial sólida o una superficie cutánea).

C. Aplicaciones militares

55 Se describe un tratamiento profiláctico y terapéutico de personal militar que responde a la contaminación microbiana (es decir, por ejemplo, equipos de primera respuesta). En una realización, el personal militar puede incluir, pero no se limita a, infantería, pilotos, caballería, personal naval, marines, fuerzas especiales, personal de logística, contratistas o periodistas.

60 Se describe una composición de descontaminación fácilmente disponible que comprende una pluralidad de fragmentos de péptidos derivados de al menos una proteína de superficie de esporas. Tales fragmentos desplazarían a esporas bacterianas de superficie sólidas (es decir, por ejemplo, tiendas, todoterrenos, tanques, armas, uniformes, etc.) así como de las capas epiteliales externas (es decir, por ejemplo, la piel) de personal militar. Además, composiciones o bien parenterales, intranasales, pulmonares o bien orales adecuadas para su administración a seres humanos y/o animales desplazarían a esporas bacterianas de tejidos corporales (es decir, por ejemplo, boca, garganta, conductos nasales, pulmones, estómago, intestino, vejiga o colon). En consecuencia, se describe una composición que comprende un compuesto que tiene una afinidad por una proteína de superficie de

esporas, en la que la proteína es responsable de la unión de una espora microbiana a una superficie (es decir, por ejemplo, una superficie artificial sólida o una superficie cutánea).

Se describe un método de descontaminación de rutina de materiales textiles balísticos. En la actualidad, las prendas de vestir hechas de materiales textiles balísticos se lavan a mano con agua fría y detergente suave, enjuagando meticulosamente para eliminar todas las trazas de detergente. El enjuague apropiado evita la acumulación de una película de jabón residual, que puede absorber agua y reducir la resistencia balística de determinados tipos de material textil balístico. Aunque un procedimiento de este tipo requiere mucho tiempo y es laborioso, es necesario puesto que el lavado o secado a máquina puede ser dañino para el material textil, afectando en última instancia a su rendimiento balístico. Además, algunos detergentes, disolventes de limpieza en seco, blanqueante y almidón pueden reducir el nivel de resistencia balística de la prenda de vestir y la mayoría de los fabricantes recomiendan enérgicamente evitar su uso. Además, la mayoría de los fabricantes de material textil balístico recomiendan enérgicamente que los materiales textiles balísticos no se sumerjan nunca en agua ni se sequen en el exterior, incluso a la sombra, porque la luz ultravioleta provoca la degradación de determinados tipos de material textil balístico.

De manera similar, el cuidado y la limpieza de ropa protectora, tal como equipo de protección militar y otros artículos protectores tales como rodilleras, espinilleras, hombreras y similares, es laborioso y requiere mucho tiempo. La limpieza repetida puede reducir la vida útil de tales prendas de vestir.

Un problema común del equipo protector y las prendas de vestir hechas de material textil balístico es el sudor del usuario. Si no se elimina el sudor, puede obtenerse como resultado el crecimiento de hongos y/o bacterias a lo largo del tiempo. Este crecimiento de hongos y/o bacterias degrada en última instancia las propiedades protectoras del artículo, da como resultado olores nocivos y posiblemente incluso da como resultado a largo plazo problemas para el usuario. Con respecto al equipo de protección militar en particular, todos los materiales textiles y componentes usados en la construcción de ropas protectoras militares deben cumplir unos requisitos de rendimiento mínimos. Por tanto, el revestimiento interior de las prendas de vestir protectoras diseñadas para personal militar en las que hay un peligro de exposición a armas de fuego y/o llamas y altas temperaturas están hechas habitualmente de fibras e hilos de aramida.

En una realización, se describe un método que se refiere a la descontaminación de artículos de material textil balístico y otro equipo protector militar, en el que los artículos y el equipo comprenden componentes incluyendo, pero sin limitarse a, aramida, polibenzazol o fibra de polietileno de alto rendimiento. En una realización, los artículos y/o el equipo se descontaminan mediante una composición que comprende un compuesto que tiene afinidad por una proteína de superficie de esporas. La composición puede aplicarse al artículo directamente o a la fibra o como un acabado para materiales textiles fácilmente y de un modo económico.

IX. Péptidos antimicrobianos

La investigación del control de infecciones incluye ahora la búsqueda de péptidos antimicrobianos así como compuestos químicos orgánicos antimicrobianos novedosos. Se han aislado péptidos antimicrobianos de plantas, insectos, peces, anfibios, aves y mamíferos. Gallo, *J Invest Dermatol.*, 111:739-743 (1998); y Ganz *et al*, *Pharmac. Ther.*, 66:191-205 (1998). Estos péptidos son aparentemente un componente primario de la protección innata del huésped frente a la patogénesis microbiana que funcionan creando poros en la membrana citoplasmática de microorganismos. Oren *et al* *Biopolymers*, 47(6):451-463 (1998). Además, los péptidos antimicrobianos también actúan sobre células animales estimulándolas para que cambien comportamientos tales como expresión de sindecano, quimiotaxis y secreción de cloruro. Gallo, *J Invest Dermatol*, 111:739-743 (1998). Tras el contacto con microorganismos, se ha notificado que la piel de vertebrados, epitelios de la tráquea y la lengua producen antibióticos peptídicos. Russell *et al.*, *Infect Immun*, 64(5): 1565-1568 (1996). Sin embargo, no se ha observado que los péptidos antimicrobianos sean eficaces contra esporas microbianas.

Los péptidos antimicrobianos de eucariotas superiores, aunque reconocidos durante mucho tiempo como componentes del sistema inmunitario innato, se consideraron inicialmente primitivos y de poca significación clínica. Sin embargo, la relativa simplicidad de estos péptidos oculta su importancia no sólo en la prevención de la infección microbiana primaria, sino también en la inmunomodulación posterior. Bowman, "Peptide antibiotics and their role in innate immunity", *Annu. Rev. Immunol.*, 13:61-92 (1995). Además, el pequeño tamaño de las moléculas sugiere una sensibilidad disminuida a muchos de los mecanismos de resistencia microbiana.

Los péptidos antimicrobianos son generalmente letales para bacterias y algunos hongos. Presentan toxicidad diferencial hacia células de mamífero. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que esos péptidos antimicrobianos interactúan con la bicapa lipídica y por tanto pueden comprometer la integridad de la membrana bacteriana. Hwang *et al.*, *Biochem Cell Biol*, 76:235-246 (1998).

SMAP 29 es un péptido antimicrobiano ovino de la catelicidina identificado originalmente a través de análisis de 3' RACE de ARN de médula ósea de oveja. Mahoney, *FEBS Lett*, 377:519522 (1995). RCAP 18 es un péptido antimicrobiano de lupina de la catelicidina identificado originalmente a partir de granulocitos. Hirata *et al.*, *Infect.*

Immun. 62:421-1426 (1994). Se cree que los péptidos SMAP 29 y RCAP 18 proporcionan protección contra algunas cepas bacterianas resistentes a fármacos. Por ejemplo, composiciones de SMAP 29 pueden controlar infecciones resistentes a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes xylooxidans* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

5 La potencia antibacteriana de los péptidos antimicrobianos de longitud completa aparentemente se correlaciona directamente con un gradiente de hidrofobicidad a lo largo de su estructura principal, inversamente con su abundancia relativa de residuos aniónicos, pero no con el grado de formación de hélice en trifluoroetanol.

10 Esta invención contempla por tanto métodos para examinar e identificar composiciones que pueden controlar la inhibición de la interacción, unión y/o estabilización de esporas microbianas a una superficie sólida. Se contempla además que estos métodos de examen también identifiquen compuestos que puedan inhibir la interacción, unión y/o estabilización de esporas microbianas a un organismo huésped (es decir, por ejemplo, un ser humano, animal doméstico, ganado, etc.).

15 X. Composiciones antimicrobianas de células vegetativas/esporas en combinación

20 Se describen métodos para solucionar problemas relacionados con resistencia antimicrobiana a fármacos antibióticos comunes. Un motivo para la resistencia antimicrobiana aparente es que agentes antimicrobianos comunes son ineficaces contra esporas microbianas. En consecuencia, cuando todavía están presentes esporas microbianas tras la “descontaminación” con un compuesto antimicrobiano convencional, la espora se convertirá en un crecimiento microbiano activo. Esto puede interpretarse (erróneamente) como “resistencia microbiana” cuando, de hecho, la presencia microbiana recurrente se debe a una técnica de descontaminación incompleta. En una realización, se describe una composición que comprende un compuesto que tiene afinidad por un péptido de superficie de esporas en combinación con uno o más antibióticos o agentes antimicrobianos convencionales.

25 Aunque no es necesario comprender el mecanismo, se cree que una composición que comprende un compuesto que tiene afinidad por un péptido de espора de superficie microbiana y/o uno o más antibióticos o agentes antimicrobianos convencionales no sólo destruirá eficazmente los microbios activos (es decir, por ejemplo, células vegetativas) sino que también desprenderá esporas microbianas de superficie sólida y/o tejidos corporales. Se cree además que esta estrategia de combinación da como resultado un nivel antiséptico que no es posible con descontaminación con un agente antimicrobiano solo.

30 En la tabla XIII se enumera una lista de cepas bacterianas que se ha identificado con características de resistencia.

35 Tabla XIII: Mecanismos de resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos

Agente antimicrobiano	Mecanismos que provocan resistencia	Ejemplos de microorganismos
Aminoglucósidos	Enzimas de modificación: acetiltransferasas, adenilil-transferasas (nucleotidil-transferasas), fosfotransferasas Resistencia ribosómica (estreptomycin, espectinomycin) Transporte de fármacos inadecuado	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , anaerobios
β-Lactamas	Inactivación enzimática PBP de baja afinidad Falta de penetración a través de la membrana externa	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Neisseria spp.</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Cloranfenicol	Acetilación Falta de penetración	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> , estreptococos, <i>Bacteroides uniformis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Clindamicina, eritromicina, lincomicina	Resistencia ribosómica debida a metilación de ARN Inactivación por esterasa Disminución de la penetración	Estreptococos, <i>E. faecalis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. hominis</i>
Fluoroquinolonas	Disminución de la captación Sitio diana alterado (ADN girasa)	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , estafilococos, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Lincomicina	Inactivación	<i>S. aureus</i>
Sulfonamidas	Síntesis de un sitio diana alterado o alternativo (dihidropteroato sintetasa) Falta de penetración Sobreprducción de PABA	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Neisseria spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , anaerobios, <i>Neisseria</i> , <i>S. aureus</i>

Tetraciclina	Flujo de salida del fármaco Protección del ribosoma frente a la inactivación de tetraciclina	<i>Enterobacteriaceae</i> , estafilococos, estreptococos, <i>E. faecalis</i> , <i>Neisseria spp.</i> , <i>Mycoplasma spp.</i> , gen críptico encontrado en <i>B. fragilis</i> , resistencia expresada en <i>E. coli</i>
Trimetoprim	Síntesis de un sitio diana alterado o alternativo (dihidrofolato reductasa) Falta de penetración Capacidad para usar una ruta alternativa Sobreproducción de dihidrofolato reductasa	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>V. cholerae</i> , estafilococos, <i>P. aeruginosa</i> , enterococos, <i>H. influenzae</i>
Vancomicina	? ?Bloqueo del sitio activo	Pediococos, <i>Leuconostoc spp.</i> (intrínseco), enterococos (adquirido)

Lonan, en: Antibiotics in Laboratory Medicine, Satterfield (Ed), Williams & Wilkins, Filadelfia, págs. 558-559 (1991).

5 Se describe una composición que comprende un compuesto que tiene afinidad por péptidos de superficie de
 esporas microbianas, en la que el compuesto comprende una afinidad por péptidos derivados de diferentes especies
 y cepas de bacterias. En una realización, diferentes cepas de bacterias son resistentes a una pluralidad de fármacos
 antibióticos. En una realización, las composiciones de la presente invención comprenden formulaciones
 farmacéuticas estables. En una realización, la formulación puede comprender además un portador
 10 farmacéuticamente aceptable. Se contempla además que puedan administrarse formulaciones a seres humanos o
 animales, incluidas en preparaciones alimenticias, preparaciones farmacéuticas, productos médicos y farmacéuticos,
 productos cosméticos, productos higiénicos, productos de limpieza y agentes de limpieza, así como cualquier
 material sobre el que puedan pulverizarse las composiciones, o adherirse, en el que se desea la inhibición de la
 unión y posterior crecimiento de esporas microbianas sobre un material de este tipo.

15 La cantidad aplicada apropiada de las composiciones descritas necesaria para prevenir la unión microbiana y el
 posterior crecimiento y proliferación depende de varios factores incluyendo los tipos de bacterias que pueden estar
 presentes, el entorno en el que está introduciéndose la composición y el tiempo que se prevé que permanezca la
 composición en una zona dada.

20 Se contempla además que las composiciones descritas puedan usarse en combinación con otros agentes
 antimicrobianos o antibióticos para potenciar su actividad. Combinaciones de composiciones descritas con otros
 agentes pueden ser útiles para permitir que se usen antibióticos a dosis inferiores debido a problemas de toxicidad,
 para potenciar la actividad de antibióticos cuya eficacia se ha reducido o para efectuar un sinergismo entre los
 componentes de manera que la combinación sea más eficaz que la suma de la eficacia de cualquier componente
 25 independientemente.

Los antibióticos que pueden combinarse con composiciones descritas en terapia de combinación incluyen, pero no
 se limitan a, penicilina, ampicilina, amoxicilina, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cefalosporina, imipenem,
 colistina, metilina, estreptomina, kanamicina, tobramicina, gentamicina, tetraciclina, clorotetraciclina, doxiciclina,
 30 cloranfenicol, lincomicina, clindamicina, eritromicina, oleandomicina, polimixina, ácido nalidíxico, rifamicina,
 rifampicina, gantrisin, trimetoprim, isoniazida, ácido paraminosalicílico y etambutol.

Se describe un método de reducción de la resistencia de un microorganismo a un agente antimicrobiano, tal como
 se ejemplifica reduciendo la resistencia de una bacteria a un antibiótico, o para destruir un microorganismo o
 35 bacteria, poniendo en contacto generalmente el microorganismo o bacteria con una cantidad eficaz del antibiótico o
 agente antimicrobiano en combinación con una cantidad de una composición que tiene afinidad por un péptido de
 superficie de esporas microbianas eficaz para inhibir la unión y/o posterior crecimiento del microorganismo o
 bacteria. Los términos "microorganismo" y "bacteria" se usan por simplicidad y se entenderá que la invención es
 adecuada para su uso contra una población de microorganismos.

40 El microorganismo, por ejemplo, bacteria, o población de la misma, puede ponerse en contacto o bien *in vitro* o bien
in vivo. La puesta en contacto *in vivo* puede lograrse administrando a un animal (incluyendo un paciente humano)
 que se ha contaminado, o se sospecha que se ha contaminado, con un microbio o bacteria, una cantidad
 terapéuticamente eficaz de una formulación farmacológicamente aceptable que comprende una composición que
 45 tiene un compuesto que tiene afinidad por un péptido de superficie de esporas microbianas solo, o en combinación
 con, una cantidad terapéutica de una formulación farmacológicamente aceptable de un agente antibiótico. La
 invención puede emplearse por tanto para tratar infecciones microbianas y bacterianas tanto sistémicas como
 localizadas introduciendo la combinación de agentes en la circulación general o aplicando la combinación, por
 ejemplo, por vía tópica a un sitio específico, tal como una herida o quemadura, o al ojo, oído u otro sitio de infección.

50 Cuando se usa una composición de la presente invención en combinación con otros agentes antimicrobianos o
 antibióticos, una "cantidad eficaz de un agente antimicrobiano o antibiótico" significa una cantidad, o dosis, dentro
 del intervalo administrado o recetado normalmente. Tales intervalos están bien establecidos en la práctica clínica de
 rutina y por tanto los conocerán los expertos en la técnica. En el presente documento se detallan adicionalmente

dosis y regímenes de tratamiento apropiados. Véase la tabla XIV. Naturalmente, al confirmar la dosis terapéutica óptima para compuestos que tienen afinidad por péptidos de superficie de esporas microbianas, en primer lugar se realizarán estudios en animales y luego ensayos clínicos, tal como se pone en práctica de manera rutinaria en la técnica. Véase el ejemplo II.

5

Tabla XIV: Antibióticos comunes y dosificación de antibióticos a dosis orales habituales

Antibiótico	Dosificación
Penicilina V	2
Rugby (genérico)	50 mg qid
V-cilina K	
Dicloxacilina Glenlawn (genérico) Dynapen Cloxacilina (Tegopen) Amoxicilina Rugby (genérico) Polyrnox Ampicilina Moore (genérico) Policilina	250 mg qid
Augmentin	tid comprimidos de 250 mg masticables (250 mg) 125 mg (suspensión) masticables (125 mg)
Carbenicilina (geocilina)	382 mg qid (1 comp.) 2 comp. qid
Cefalexina Rugby (genérico) Keflex	250 mg qid
Rugby (genérico) Keflex	500 mg qid
Cefadroxilo Rugby (genérico) Duricef	1 gm bid
Cefradina	250 mg qid
Rugby (genérico) Velosef Rugby (genérico)	500 mg qid
Cefaclor Ceclor	250 mg tid
Cefuroxima axetilo	125 mg bid
Ceftin	250 mg bid 500 mg bid
Cefixima Suprax	400 mg q24h
Cefprozilo Cefzil	250 mg q12h
Loracarbef (Lorabid)	200 mg bid
Cefpodoxima proxetilo (Vantin)	200 mg bid
Clindamicina Cleocin	300 mg q8h
TMP/SMZ Bactrim Septra (genérico)	1 de concentración doble bid
Trimetoprim Rugby (genérico) Proloprim	100 mg bid
Eritromicina (base) E-micina de Abbott (liberación retardada)	250 mg qid
Estearato de eritromicina Rugby (genérico)	250 mg qid
Azitromicina Zithromax	1 g sólo una vez; 500 mg al día 1 más 250 mg al día 2-5
Claritromicina	250 mg bid
Biaxina	500 mg bid

Clorhidrato de tetraciclina Sumicina 250 de Mylan	250 mg qid
Doxiciclina Lederle (genérico) Vibramicina	100 mg qd (con 200 mg de carga inicial)
Vancomicina Vancocina HCl	Cápsulas (oral 125 mg q6h disol./polvo por v.o.)
Metronidazol Rugby (genérico) Flagyl	250 mg qid
Norfloxacin Noroxin	400 mg bid
Ciprofloxacino	250 mg bid
Cipro	500 mg bid 750 mg bid
Ofloxacino	200 mg bid
Floxin	300 mg bid 400 mg bid
Lomefloxacino Maxaquin	400 mg una vez qid

qid (4 veces al día), tid (3 veces al día), bid (dos veces al día), qd (una vez al día), q4h (cada 4 horas todo el día), q6h (cada 6 horas todo el día) y q8h (cada 8 horas todo el día).

- 5 La razón DL_{50}/DE_{50} requerida para un uso seguro de las composiciones y/o combinaciones propuestas de las composiciones con otros agentes antimicrobianos se evalúa determinando la DL_{50} (mediana de la dosificación tóxica letal) y la DE_{50} (mediana de la dosificación terapéutica eficaz) en animales experimentales. Entonces se define la dosis óptima para sujetos humanos ajustando finamente el intervalo en ensayos clínicos. En el caso de DL_{50} , se administra habitualmente un inhibidor a ratones o ratas (por vía oral o intraperitoneal) a varias dosis (habitualmente 10 4-5) en el intervalo letal. Se representa gráficamente la dosis en mg/kg frente al % de mortalidad y la dosis al 50% representa la DL_{50} . Se determina la DE_{50} de un modo similar.

15 En un ensayo clínico, la dosis terapéutica se determinará maximizando el beneficio para el paciente, al mismo tiempo que se minimiza cualquier efecto secundario o toxicidad asociada. En la optimización de una dosis terapéutica dentro de los intervalos dados a conocer en el presente documento, no se usará el límite superior del intervalo como punto de partida en un ensayo clínico debido a la heterogeneidad de los pacientes. Se comienza con un nivel de dosis en el intervalo inferior o medio, y luego el aumento de la dosis limitará la posibilidad de provocar una reacción tóxica o no deseada en cualquier paciente dado o subconjunto de pacientes. La presencia de algunos efectos secundarios o determinadas reacciones tóxicas *per se* no limitará, por supuesto, la utilidad de la invención, 20 ya que se sabe bien que la mayoría de los fármacos beneficiosos también producen una cantidad limitada de efectos no deseados en determinados pacientes.

25 En el tratamiento de animales o pacientes humanos con terapia de combinación, hay diversas formulaciones y regímenes de tratamiento apropiados que pueden usarse. Por ejemplo, puede administrarse una composición que comprende un compuesto que tiene afinidad por un péptido de superficie de esporas y al menos un fármaco antimicrobiano adicional a un animal simultáneamente, por ejemplo, en forma de una única formulación que incluye el compuesto y fármaco(s) adicional(es), o usando al menos dos formulaciones distintas. Los compuestos que tienen afinidad por un péptido de superficie de esporas también pueden administrarse a un animal antes del/de los fármaco(s) adicional(es) o viceversa. 30

35 Las realizaciones adicionales incluyen kits terapéuticos que comprenden, en un medio de recipiente adecuado, una composición farmacéutica de al menos un compuesto que tiene afinidad por un péptido de superficie de esporas y al menos un fármaco antimicrobiano y/o antibiótico adicional. El compuesto, agente antimicrobiano y/o antibiótico puede estar contenido dentro un único medio de recipiente, o puede emplearse una pluralidad de recipientes distintos.

40 Dependiendo de las circunstancias, pueden emplearse agentes antimicrobianos en regímenes de tratamiento orales o parenterales. Se describen métodos para lograr dosis apropiadas en diversas publicaciones. Reese y Betts, en: *A Practical Approach to Infectious Diseases*, (3ª ed.), Boston, Little Brown, (1993).

XI. Composiciones de limpiadores antibacterianos

45 Se usan normalmente composiciones de limpieza antibacterianas para limpiar los brazos y las manos del usuario y para destruir bacterias y cualquier otro microorganismo que pueda estar presente en los brazos o las manos del usuario. Estas composiciones se usan ampliamente en la industria del cuidado sanitario por el personal de

hospitales y otro personal de cuidado sanitario como limpiadores para lavarse las manos para prevenir infecciones o bien entre el personal o bien entre el personal y los pacientes. Son particularmente adecuadas para su uso por trabajadores sanitarios tales como cirujanos, enfermeras y otros profesionales el cuidado sanitario que pueden estar sometidos a contacto con bacterias y similares. También son adecuadas para su uso por personal en las industrias del procesamiento de carne y servicio de alimentos y, generalmente, se usan para la limpieza antimicrobiana de las manos y los brazos por el público.

Hay varios agentes antimicrobianos disponibles actualmente para su uso en composiciones de limpieza. Por ejemplo, muchas composiciones de limpieza antimicrobianas contienen una sustancia bactericida de bisbiguanida tal como digluconato de clorhexidina (CHG). Otras composiciones de limpieza usan compuestos fenólicos. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de estas sustancias depende a menudo del/de los tipo(s) de tensioactivos u otros componentes empleados con las mismas, y por tanto, del uso de los mismos componentes con estas sustancias antimicrobianas no se derivará necesariamente el mismo resultado. Por ejemplo, cuando se emplea CHG como agente antimicrobiano activo, la composición de limpieza puede incluir, pero no se limita a, alquilpoliglucósidos y etoxilatos de alcohol no iónicos como tensioactivos primarios. Sin embargo, en composiciones que contienen fenoles sustituidos tales como para-cloro-meta-xilenol (PCMX; 4-cloro-3,5-dimetilfenol) como agente antimicrobiano activo, la mayoría de los etoxilatos de alcohol no iónicos inhiben, más que potencian, la actividad antibacteriana de PCMX. PCMX puede producir reducciones iniciales altas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas así como hongos, y proporciona buena actividad residual durante varias horas entre lavados de manos. Normalmente, cuando se usa PCMX en composiciones de limpieza, se usa en concentraciones de dese aproximadamente el 0,1 hasta el 4 por ciento en peso. Sin embargo, la mayoría de las fórmulas contienen el 1 por ciento o menos en peso.

Las composiciones de limpieza antimicrobianas que contienen fenoles sustituidos como agente antimicrobiano activo llevan también incluidos detergentes aniónicos, jabones, tensioactivos, y similares, así como otros compuestos (tensioactivos etoxilados no iónicos, polietilenglicol, etc.) que pueden reducir la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos. También son útiles compuestos fenólicos sustituidos y detergentes o jabones tensioactivos aniónicos en un portador a base de agua y alcohol. Adicionalmente, pueden añadirse agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético (a continuación en el presente documento, EDTA). Winicov *et al.*, patente estadounidense n.º 3.824.190 y RE 28.778.

Las composiciones antimicrobianas que presentan características de suavidad pueden incluir, pero no se limitan a, un fenol sustituido, concretamente PCMX, un detergente aniónico, un espesante tal como monoestearato de etilenglicol y un espumante tal como una alcanolamida de ácido graso. Se sospecha que el espesante y las alcanolamidas de ácido graso así como el tensioactivo aniónico dificultan la actividad antibacteriana de un compuesto fenólico. Garabedian *et al.* patente estadounidense n.º 4.632.772 (incorporada en el presente documento como referencia). Otras composiciones de PCMX comprenden combinaciones anhidras en mezclas de tensioactivos. Corti *et al.*, patente estadounidense n.º 5.114.978.

Puede solubilizarse PCMX en altas concentraciones de agua o composiciones acuosas. Las composiciones de PCMX incluyen, pero no se limitan a, dietanolamidas de ácidos grasos y tensioactivos aniónicos de la clase de sales de dietanolamonio de ácido alquilpolioxietilsulfúrico.

Las composiciones antimicrobianas a base de alcohol pueden incluir, pero no se limitan a, PCMX o CHG, hidropropilcelulosa, un alcohol, un emoliente y agua. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que el uso de alcohol como disolvente o portador en la composición desengrasa la piel, lo que puede conducir a sequedad e irritación de la piel. White *et al.*, patente estadounidense n.º 5.288.486.

En consecuencia, PCMX es similar a CHG y otros fenoles sustituidos contra microorganismos porque su eficacia depende altamente tanto del portador como de otros constituyentes químicos dentro de la composición de limpiador antimicrobiano. Aunque la actividad antimicrobiana de PCMX puede potenciarse contra *Pseudomonas aeruginosa* mediante la adición del agente quelante ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y/o el agente secuestrante hexametáfosfato de sodio, PCMX puede reducirse en presencia de algunos materiales orgánicos, y/o concentraciones moderadas de tensioactivos aniónicos. La actividad antimicrobiana también puede perderse como consecuencia de interacciones reversibles entre PCMX y tensioactivos no iónicos, polietilenglicol y estearato de polietilenglicol. De manera similar, también se ha encontrado que la reducción en la eficacia antibacteriana de PCMX es el resultado directo de su interacción con una variedad de macromoléculas, concretamente, metilcelulosa, polietilenglicol 6000 y polisorbato 80.

La presente invención no se limita a composiciones de limpiador antibiótico convencionales tales como PCMX y CGH. En una realización, la presente invención contempla una composición antibacteriana que contiene un fenol sustituido que no incluye tensioactivos aniónicos convencionales u otros componentes químicos perjudiciales para la actividad antimicrobiana de fenoles sustituidos. En una realización, una composición de limpieza antimicrobiana comprende un fenol sustituido y al menos un tensioactivo primario. En una realización, la composición comprende un fenol sustituido en cantidades que oscilan entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 4 por ciento en peso de la composición total, y preferiblemente en cantidades que oscilan entre aproximadamente el 0,3 y el 1 por ciento en peso de la composición total. En una realización, la composición comprende un fenol sustituido en cantidades

que son de más del 4 por ciento en peso del agente antimicrobiano. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que el límite superior de la cantidad de agente antimicrobiano está relacionado con la cantidad de fenol sustituido que se considera que no es tóxica ni irritante para la piel.

5 Cualquier fenol sustituido que sea soluble en agua u otro disolvente distinto de alcohol (es decir, por ejemplo, trietilenglicol, propilenglicol, hexilenglicol, etc.) puede usarse en las composiciones de la presente invención. En una realización, un fenol sustituido puede incluir, pero no se limita a, fenoles sustituidos con alquilo, sustituidos con halógeno, sustituidos con fenol, sustituidos con haloalquilo, sustituidos con bencilalquilo, sustituidos con feniletalquilo y sustituidos con halobencilo, y bisfenoles sustituidos con alquilo, sustituidos con halógeno y
10 sustituidos con haloalquilo, bis(hidroxifenil)alcanos, fenoles sustituidos con amino, derivados de resorcinol, derivados de fenol trihidroxilado, derivados de naftol y fenoles sustituidos con ácido carboxílico (por ejemplo, ácido salicílico y ésteres). En una realización, un fenol sustituido comprende un fenol sustituido con cloro, concretamente para-cloro-meta-xilenol (PCMX). Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que PCMX puede tener 60 veces la actividad antimicrobiana de un fenol no sustituido contra un amplio espectro de bacterias y
15 también se considera que no es tóxico ni irritante para la piel humana a niveles por debajo de aproximadamente el 3 por ciento en peso. Fendler, *et al.*, "Antimicrobial cleansing compositions" patente estadounidense 5.635.462.

En una realización, una composición de limpiador de control de infecciones comprende al menos un tensioactivo primario seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, óxidos de amina, fosfolípidos, ácidos carboxílicos parcialmente neutralizados y diácidos, betaínas o metilglucósidos etoxilados, y/o mezclas de los mismos. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que la cantidad de tensioactivo(s) primario(s) que va a añadirse a la composición depende en cierta medida del número de tensioactivos primarios añadidos. En una realización, la composición comprende una pluralidad de tensioactivos primarios en la que la cantidad combinada de los tensioactivos primarios es inferior a aproximadamente el 20 por ciento en peso de la composición.

25 En una realización, la composición comprende un tensioactivo primario que incluye, pero no se limita a, un óxido de amina o un óxido de alquilamina. En una realización, se añade un óxido de amina a la composición en una cantidad que oscila entre aproximadamente el 0 (ausente) y aproximadamente el 10 por ciento en peso pero más preferiblemente en una cantidad que oscila entre aproximadamente el 5 y el 7 por ciento en peso. En una
30 realización, una composición comprende un óxido de amina como único tensioactivo primario en la que el óxido de amina se añade en cantidades que oscilan entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 10 por ciento en peso. En una realización, un óxido de amina tiene una longitud de la cadena de alquilo de desde aproximadamente C₈ hasta aproximadamente C₁₆, con longitudes de cadena de desde C₁₂ hasta C₁₄.

35 Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que los óxidos de amina contemplados por la presente invención se considera que son tensioactivos anfóteros. Los ejemplos de óxidos de amina que se encuentra que son adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, óxido de lauramina, un óxido de alquilamina C₁₂ (Mackamina LO®) y óxido de cocamina, un óxido de alquilamina C₁₂-C₁₄ (Mackamina CO®) (McIntyre Chemical Co., Ltd., Chicago, Ill.), así como un óxido de alquilamina C₁₄ (Barlox 14®) y
40 un óxido de alquilamina C₁₂ (Barlox 12®) (Lonza, Inc., Fair Lawn, N.J.). Alternativamente, las composiciones contempladas en el presente documento son adecuadas para óxidos de amidopropilamina incluyendo, pero sin limitarse a, Standamox LAO® o Mackamina CAO® (Henkel Corp., Hoboken, N.J.).

Además, pueden usarse alquilamidas tales como cocamida conjuntamente con los óxidos de amina u otros tensioactivos primarios para reforzar la formación de espuma y añadir viscosidad a la composición. Los modificadores de la viscosidad y/o estabilizadores de la espuma pueden incluir, pero no se limitan a, Standamide CD®, Standamide SD® y Cocamide DEA® (Henkel Corp., Hoboken, N.J.).

45 Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que los óxidos de amina no reducen significativamente la actividad bacteriana de un fenol sustituido y se ha encontrado que son eficaces en combinación con PCMX para destruir microorganismos.

En una realización, se describe una composición para el control de infecciones que comprende tensioactivos zwitteriónicos/anfóteros tales como fosfolípidos y betaínas como tensioactivo primario. En una realización, pueden usarse fosfolípidos y/o betaínas en lugar de, o conjuntamente con, óxidos de amina. En una realización, una
55 composición puede comprender fosfolípidos y betaínas en cantidades de hasta aproximadamente el 10 por ciento en peso.

En una realización, una composición de limpiador de control de infecciones comprende un fosfolípido incluyendo, pero sin limitarse a, un cloruro de alquilfosfatidil-PG-dimonio. En una realización, un cloruro de alquilfosfatidil-PG-dimonio puede seleccionarse del grupo que comprende cloruro de cocamidopropilfosfatidil-PG-dimonio (fosfolípido PTC®, MONA Industries, Inc., Paterson, N.J.); cloruro de estearamidopropilfosfatidil-PG-dimonio (fosfolípido PTS®, MONA Industries, Inc., Paterson, N.J.); cloruro de linoleamidopropilfosfatidil-PG-dimonio (fosfolípido EFA®, MONA Industries, Inc., Paterson, N.J.); y cloruro de estearamidopropilfosfatidil-PG-dimonio/alcohol cetílico (fosfolípido SV®, MONA Industries, Inc., Paterson, N.J.). En una realización, se incorporan cloruros de alquilfosfatidil-PG-dimonio en la composición en una cantidad que oscila entre el 0 (ausente) y aproximadamente el 10 por ciento en peso de la
65

composición total.

- 5 En una realización, se describe una composición de limpiador de control de infecciones que comprende un lípido de betaína como tensioactivo primario o bien solo o bien conjuntamente con otros tensioactivos primarios. En una realización, un lípido de betaína comprende un carboxilato de alquilamonio que oscila entre 8 y 18 átomos de carbono. En una realización, una composición que comprende un carboxilato de alquilamonio incluye hasta el 10 por ciento en peso de la composición total. En una realización, un carboxilato de alquilamonio comprende cocobetaina (Mackam CB-35®, McIntyre Chemical Co., Chicago, Ill.).
- 10 En una realización, se describe una composición de limpiador de control de infecciones que comprende una mezcla de al menos un ácido y/o diácido carboxílico parcialmente neutralizado (es decir, por ejemplo, caproil-1-acrilato de sodio) que puede emplearse como tensioactivo primario. En una realización, se añade un ácido y/o diácido carboxílico a la composición de limpieza en cantidades que oscilan entre el 0 (ausente) y aproximadamente el 5 por ciento en peso. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que aunque ácidos y
- 15 diácidos carboxílicos parcialmente neutralizados pueden contener algunos tensioactivos aniónicos, tienen un carácter ácido protonado considerable y, por tanto, estos compuestos se excluyen expresamente del término "tensioactivos aniónicos convencionales".
- 20 En una realización, se describe una composición de limpiador de control de infecciones que comprende un tensioactivo primario no iónico. En una realización, el tensioactivo primario no iónico comprende un metilglucósido no iónico etoxilado. En una realización, también puede añadirse un metilglucósido no iónico etoxilado a una composición en cantidades que oscilan entre el 0 (ausente) y aproximadamente el 10 por ciento en peso.
- 25 La composición también puede incluir otros aditivos tales como espesantes, emolientes, agentes quelantes y secuestrantes, fragancias, agentes colorantes, agentes opacificantes, agentes de perlado, vitaminas y similares. Por ejemplo, una composición puede incluir un espesante o viscosificante de polímero tal como hidroxietilcelulosa para hacer que la composición sea más agradable estéticamente. Los ejemplos de otros viscosificantes de polímero adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa.
- 30 Puede añadirse un glicol con el fin de acelerar la velocidad de disolución del fenol sustituido y como emoliente y/o humectante. Los glicoles pueden incluir, pero no se limitan a, propilenglicol, trietilenglicol y hexilenglicol. Pueden añadirse glicoles a una composición en cantidades que oscilan entre el 0 (ausente) y aproximadamente el 10 por ciento en peso de la composición total, pero más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente el 3 por ciento. En una realización, puede disolverse un PCMX y/o un segundo fenol sustituido en al menos una porción de
- 35 un glicol antes de añadir otros componentes a la disolución. En una realización, una composición comprende una razón del 25 por ciento/el 75 por ciento de PCMX:glicol.
- 40 En una realización, la presente invención contempla una composición de limpiador de control de infecciones que comprende un agente quelante y/o secuestrante que oscila hasta aproximadamente el 1 por ciento en peso. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que puede añadirse un agente quelante y/o secuestrante para ablandar la composición a base de agua. En una realización, un agente quelante adecuado para la presente invención comprende ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) (es decir, por ejemplo, EDTA de disodio).
- 45 Las composiciones pueden comprender además cantidades menores pero eficaces de otros aditivos convencionales tales como fragancias, aditivos de color, agentes opacificantes, agentes de perlado, vitaminas, etc. Un ejemplo de un agente de perlado particular incluye, pero no se limita a, diestearato de etilenglicol. Generalmente, estos aditivos se usan en cantidades que no afectan a la naturaleza esencial de la composición con respecto a sus propiedades de control de infecciones.
- 50 Para lograr una eficacia antibacteriana óptima, el pH de la composición debe estar entre 4 y 8, y preferiblemente entre 5,5 y 6,5. Para ajustar el pH de la composición, puede usarse cualquier ácido compatible con los componentes de la composición. Los ácidos pueden incluir, pero no se limitan a, ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético, ácido glicólico o ácido glucónico. Normalmente, se usa menos del 1 por ciento en peso de estos ácidos para lograr el equilibrio de pH apropiado.
- 55 El resto de la composición es normalmente agua para proporcionar el 100 por ciento en peso de la composición pero otros compuestos solubles en agua también son adecuados (es decir, por ejemplo, alcoholes).
- 60 Todos los tantos por ciento en peso indicados en el presente documento se basan en el tanto por ciento de la composición activa. Por tanto, por ejemplo, cuando se emplea el 5 por ciento en peso de óxido de lauramina y el óxido de lauramina se obtiene del fabricante o se ha diluido en la disolución para que comprenda un 30 por ciento de la disolución activa, tendrá que usarse un 16,7 por ciento de la disolución con el fin de obtener el 5 por ciento en peso recomendado.
- 65 Las composiciones de limpieza de control de infecciones se preparan generalmente disolviendo fenol sustituido, concretamente PCMX, en glicol tal como se indicó anteriormente en el presente documento, y añadiendo esta

disolución a uno o más del tensioactivo primario comentado anteriormente en el presente documento, en agua. Más particularmente, el tensioactivo o tensioactivos primarios, y otros componentes (es decir, por ejemplo, fragancia, agente quelante, agente de perlado, etc.) se añaden a la disolución con agitación. El pH de la composición se ajusta con ácido láctico o un ácido similar. El espesante/viscosificante se añade entonces preferiblemente y se mezcla la disolución hasta que es completamente homogénea. Se comprueba el pH y se ajusta de nuevo si es necesario. Este procedimiento puede emplearse con o sin la aplicación de calor para potenciar la hidratación del viscosificante, si se requiere.

XII. Detección de microbios que comprenden secuencias de nucleótidos de proteínas de superficie de esporas

Se dan a conocer métodos para la detección de microbios que contienen una secuencia de nucleótidos de proteína de superficie de esporas (es decir, por ejemplo, SEQ ID NO: 2) y/o una secuencia de nucleótidos de proteína de superficie de esporas (es decir, por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 6 u 8). Pueden identificarse microbios que contienen secuencias de nucleótidos mediante una variedad de procedimientos. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridación ADN-ADN o ADN-ARN así como amplificación (por ejemplo, PCR) usando sondas de ADN (por ejemplo, sondas o amplímeros de oligonucleótido u oligómero), sondas de ARNm y fragmentos de la secuencia de interés. Estas sondas y fragmentos pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas incluyendo, pero sin limitarse a, síntesis química, digestión por restricción y expresión de la secuencia de nucleótidos, o cualquier porción de la misma, en un vector de expresión. El marcaje de sondas y fragmentos de secuencias de nucleótidos expresados o sintetizados puede lograrse usando marcaje de oligos, marcaje de extremos o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado.

Habiendo generado sondas marcadas, pueden someterse a prueba los microbios presentes en una muestra biológica para detectar la presencia de una secuencia de nucleótidos usando análisis de tipo Northern inverso o de tipo Southern de ADN celular total de plásmido aislado, o usando análisis de tipo Northern de ARNm. Los microbios o bien pueden hacerse crecer sobre filtros o bien disponerse en puntos sobre filtros o bien directamente o bien tras cultivo durante la noche. Moseley *et al.*, J Infect. Dis. 142:892-898 (1980); Perine *et al.*, J Infect. Diseases 152(1):59-63 (1985); y Gootz *et al.*, Antimicrob. Agents and Chemother. 28(1):69-73 (1985). En resumen, se inocula un soporte sólido tal como papel de nitrocelulosa o una membrana de nailon con una muestra clínica, o con cultivo en caldo de una muestra clínica que se sospecha que contiene bacterias. Se lisan las células sobre el papel de nitrocelulosa y se desnaturaliza el ADN, por ejemplo mediante tratamiento con NaOH. Se trata el soporte con pronasa y cloroformo para reducir la unión no específica de fondo de sondas de ADN con el material de la colonia. Entonces se realiza la prehibridación e hibridación de los filtros (es decir, soporte) con oligonucleótidos, oligómeros o porciones de una secuencia de nucleótidos usando técnicas convencionales. Se detecta la hibridación usando uno cualquiera de muchos métodos disponibles, tales como mediante sondas radiactivas de obtención de imágenes usando películas de rayos X (es decir, autorradiografía).

La detección de bacterias que albergan una secuencia de nucleótidos de proteína de superficie de esporas microbianas en una muestra derivada de una superficie demuestra que es beneficiosa administrar composiciones para el control de infecciones que alteran la unión de proteínas de superficie de esporas microbianas a la superficie. Además, tal detección también permite monitorizar la superficie para detectar la presencia de las bacterias durante y después de la administración de la composición para el control de infecciones.

En una realización, pueden realizarse métodos de examen (es decir, por ejemplo, un ensayo) contemplados por esta invención en fase sólida en los que uno o más componentes del ensayo se unen a una superficie sólida. En ensayos en fase sólida, uno o más componentes del ensayo se unen a una superficie sólida. Prácticamente cualquier superficie sólida es adecuada, siempre que el material de superficie sea compatible con los reactivos del ensayo y sea posible unir el componente a la superficie sin alterar excesivamente la reactividad de los componentes del ensayo. Algunos componentes pueden mostrar actividad reducida en fase sólida, pero esto es generalmente aceptable siempre que la actividad sea suficiente para interactuar con un compuesto de prueba de control de infecciones.

Los soportes sólidos incluyen esencialmente cualquier superficie sólida, incluyendo, pero sin limitarse a, una perla de vidrio, vidrio plano, vidrio de poro controlado, plástico, metal plástico poroso o resina al que puede adherirse la molécula. Los soportes sólidos pueden derivatizarse con grupos funcionales (por ejemplo, hidroxilos, aminas, carboxilos, ésteres y sulfhidrilos) para proporcionar sitios reactivos para la unión de ligadores o la unión directa del/de los componente(s).

La adhesión de un componente del ensayo (por ejemplo, una proteína de superficie de esporas) al soporte sólido puede ser directa o indirecta (es decir, un compuesto o compuestos particulares se unen al soporte, y un componente del ensayo se une a este compuesto o compuestos en vez de al soporte sólido). El componente puede inmovilizarse o bien: i) covalentemente (es decir, por ejemplo, utilizando grupos tiol reactivos individuales de cisteína para anclar componentes proteicos; Colliud *et al.*, Bioconjugate Chem. 4:528-536 (1993)); ii) no covalentemente pero específicamente (es decir, por ejemplo, por medio de anticuerpos inmovilizados u otras proteínas de unión específica; Schuhmann *et al.* Adv. Mater. 3:388-391 (1991); y Lu *et al.* Anal. Chem. 67:83-87 (1995); iii) mediante el sistema de biotina/estreptavidina; Iwane *et al.*, Biophys. Biochem. Res. Comm. 230:76-80 (1997); iv) usando

películas de Langmuir-Blodgett de quelación de metales; Ng *et al.* Langmuir 11:4048-4055 (1995); y Schmitt *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 317320 (1996); y v) monocapas autoensambladas de quelación de metales para la unión de proteínas de fusión de polihistidina; Sigal *et al.*, Analytical Chem. 68:490-497 (1996).

5 XIV. Detección de microbios que comprenden proteínas de superficie de esporas

En una realización, se dan a conocer métodos que comprenden detectar una proteína y/o fragmento de péptido de esporas microbianas. En una realización, la proteína y/o fragmento de péptido de esporas microbianas comprende una proteína y/o fragmento de péptido de superficie de esporas microbianas. En una realización, la proteína y/o fragmento de péptido de superficie de esporas microbianas comprende una proteína y/o fragmento de péptido de superficie de esporas de *Clostridium*. En una realización, la proteína y/o fragmento de péptido de superficie de esporas de *Clostridium* comprende una proteína y/o fragmento de péptido de superficie de esporas de *Clostridium difficile*.

15 Pueden detectarse proteínas y/o fragmentos de péptidos, de cualquier fuente, mediante una variedad de métodos adecuados. En algunas realizaciones, se detectan proteínas y/o fragmentos de péptidos mediante inmunohistoquímica. En otras realizaciones, se detectan proteínas y/o fragmentos de péptidos mediante su unión a un anticuerpo producido contra la proteína.

20 La unión de anticuerpos puede detectarse mediante muchas técnicas diferentes incluyendo, pero sin limitarse a, (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (por ejemplo, usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o de radioisótopos, por ejemplo), inmunotransferencias de tipo Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación al complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.).

25 En una realización, la unión de anticuerpos se detecta detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado.

30 En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de detección automatizado. Los métodos para la automatización de inmunoensayos incluyen los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.885.530, 4.981.785, 6.159.750 y 5.358.691. En algunas realizaciones, el análisis y la presentación de resultados también están automatizados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza software que genera un pronóstico basándose en la presencia o ausencia de una serie de proteínas correspondientes a marcadores del cáncer.

En otras realizaciones, el inmunoensayo descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 5.599.677 y 5.672.480.

40 En otras realizaciones, se proporcionan kits para la detección y caracterización de proteínas y/o ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los kits contienen anticuerpos específicos para una proteína expresada a partir de un gen de interés, además de reactivos de detección y tampones. En otras realizaciones, los kits contienen reactivos específicos para la detección de ARNm o ADNc (por ejemplo, sondas o cebadores de oligonucleótidos). En realizaciones preferidas, los kits contienen todos los componentes necesarios para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar los ensayos y cualquier software necesario para el análisis y la presentación de resultados.

45 XV. Formulaciones farmacéuticas

50 Las composiciones activas pueden incluir formulaciones farmacéuticas tradicionales. La administración de estas formulaciones según la presente invención será por medio de cualquier vía común siempre que el tejido diana esté disponible por medio de esa vía. Ésta incluye tópica, oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Alternativamente, la administración puede ser mediante inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Tales formulaciones se administrarán normalmente como una composición farmacéuticamente aceptable.

55 A. Disoluciones para administración oral o parenteral

60 Las formulaciones, composiciones y otros agentes y fármacos pueden ser compuestos activos que pueden administrarse por vía parenteral o por vía oral. Pueden prepararse disoluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclados adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante.

65 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, pero no se limitan a, disoluciones o

dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En una realización, una formulación es estéril. En una realización, la formulación comprende características fluidas de manera que la formulación se manipula fácilmente usando una jeringa. En una realización, la formulación es estable en condiciones de fabricación y/o almacenamiento. En una realización, la formulación puede comprender además un portador tal como un disolvente o medio de dispersión incluyendo, pero sin limitarse a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ocasionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ocasionarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización (es decir, por ejemplo, mediante filtración, radiación y/o exposición a óxido de etileno). Generalmente, pueden prepararse dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración.

Para administración oral, pueden incorporarse composiciones que tienen afinidad por proteínas de superficie de esporas microbianas con excipientes y usarse en forma de dentífricos y colutorios no ingeribles. Un colutorio puede prepararse incorporando el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, tal como una disolución de borato de sodio (es decir, por ejemplo, disolución de Dobell). Alternativamente, el principio activo puede incorporarse en un lavado antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El principio activo también puede dispersarse en dentífricos, incluyendo: geles, pastas, polvos y suspensiones. El principio activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una pasta dentífrica que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

Las composiciones pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Tras la formulación, se administrarán las disoluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en cantidades tales que sean terapéuticamente eficaces. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Las vías de administración pueden seleccionarse de intravenosa, intraarterial, intrabucal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, oral, tópica, rectal, vaginal, nasal e intraocular.

Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido en primer lugar se vuelve isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que pueden emplearse en vista de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podrá disolverse en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y o bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermólisis o bien inyectarse en el sitio de infusión propuesto. En: Remington's Pharmaceutical Sciences 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580. Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo del estado del sujeto que está tratándose. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para su administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridas por la Oficina de Normas de Productos Biológicos de la FDA.

B. Liposomas para administración tópica o parenteral

En una realización, la presente invención contempla una formulación que comprende una preparación liposómica que comprende un compuesto que tiene afinidad por una proteína de superficie de esporas microbianas. En una realización, el compuesto se encapsula por un liposoma, en el que la encapsulación prolonga la semivida del compuesto en comparación con sistemas de administración de fármacos convencionales.

Un "liposoma" se usa generalmente como un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos uni y

multilamelares formados por la generación de bicapas lipídicas cerradas. Por ejemplo, pueden usarse fosfolípidos para preparar liposomas y pueden portar una carga neta positiva, una carga neta negativa o ser neutros. Puede emplearse fosfato de dicetilo para conferir una carga negativa sobre los liposomas, y puede usarse estearilamina para conferir una carga positiva sobre los liposomas. Los liposomas pueden caracterizarse por una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Los liposomas se forman habitualmente de manera espontánea cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de disolución acuosa. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que los componentes lipídicos experimentan autorredistribución antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas. Ghosh *et al.*, en: Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands, Wu G. y C. Wu (eds.), Nueva York: Marcel Dekker, págs. 87-104, (1991). También se contemplan complejos de lípido catiónico-ácido nucleico, tales como complejos de lipofectamina-ácido nucleico. En determinadas realizaciones de la invención, el liposoma puede complejarse con un virus hemaglutinante (VHJ). Se ha mostrado que VHJ facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula. Kaneda *et al.*, J Biol Chem., 264: 12126-12129 (1989).

Pueden obtenerse lípidos adecuados para preparar liposomas de fuentes comerciales. Por ejemplo, puede obtenerse dimiristilfosfatidilcolina ("DMPC") de Sigma Chemical Co., se obtiene fosfato de dicetilo ("DCP") de K & K Laboratories (Plainview, N.Y.); se obtiene colesterol ("Chol") de Calbiochem-Behring; pueden obtenerse dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Pueden almacenarse disoluciones madre de lípidos en cloroformo, cloroformo/metanol o t-butanol a aproximadamente -20°C. Preferiblemente, se usa cloroformo como único disolvente puesto que se evapora más fácilmente que el metanol.

Preferiblemente, no se usan fosfolípidos de fuentes naturales, tales como fosfatidilcolina de huevo o soja, ácido fosfatídico cerebral, fosfatidilinositol cerebral o vegetal, cardiolipina cardiaca y fosfatidiletanolamina vegetal o bacteriana como fosfátido primario, es decir, que constituye el 50% o más de la composición de fosfátido total, debido a la inestabilidad y las filtraciones de los liposomas resultantes.

Pueden prepararse liposomas mediante diferentes métodos. El tamaño de los liposomas varía dependiendo del método de síntesis. Un liposoma suspendido en una disolución acuosa tiene generalmente la conformación de una vesícula esférica, teniendo una o más capas concéntricas de moléculas de bicapa lipídica. Cada capa consiste en una serie paralela de moléculas representadas por la fórmula XY, en la que X es un resto hidrófilo e Y es un resto hidrófobo. En suspensión acuosa, las capas concéntricas se disponen de modo que los restos hidrófilos tienden a permanecer en contacto con una fase acuosa y las regiones hidrófobas tienen a autoasociarse. Por ejemplo, cuando están presentes fases acuosas tanto dentro como fuera del liposoma, las moléculas lipídicas formarán una bicapa, conocida como lamela, de la disposición XY-YX.

Pueden prepararse liposomas según muchas técnicas de laboratorio. En una realización, se preparan liposomas mezclando lípidos liposomales, en un disolvente en un recipiente, por ejemplo, un frasco de vidrio, con forma de pera. El recipiente debe contener un volumen diez veces mayor que el volumen de la suspensión de liposomas esperada. Usando un evaporador rotatorio, se elimina el disolvente a aproximadamente 40°C y a presión negativa. El disolvente normalmente se elimina en el plazo de aproximadamente 5 min a 2 horas, dependiendo del volumen deseado de los liposomas. La composición puede secarse adicionalmente en un desecador a vacío. Los lípidos secados se desechan generalmente tras aproximadamente 1 semana debido a una tendencia a deteriorarse con el tiempo.

Los lípidos secados pueden hidratarse a fosfolípido aproximadamente 25-50 mM en agua estéril, libre de pirógenos agitando hasta que toda la película lipídica se resuspenda. Entonces pueden separarse los liposomas acuosos en alícuotas, colocarse cada una en un vial, liofilizarse y sellarse a vacío.

En un método alternativo, pueden prepararse liposomas según otros procedimientos. Bangham *et al.*, J Mol. Biol., 13:238-252, (1965); Gregoriadis (Ed), en: Drug Carriers in Biology and Medicine, págs. 287-341 (1979); Deamer *et al.*, "Liposome Preparation: Methods and Mechanisms", en: Liposomes, M. Ostro (Ed.) (1983); y Szoka *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75:4194-4198 (1978). Los métodos mencionados anteriormente pueden diferir en cuanto a sus respectivas capacidades para atrapar material acuoso y sus respectivas razones de espacio acuoso con respecto a lípido.

Los lípidos secados o liposomas liofilizados preparados tal como se describió anteriormente pueden reconstituirse en una disolución de ácido nucleico y diluirse hasta una concentración apropiada con un disolvente adecuado, por ejemplo, DPBS. La mezcla se agita entonces vigorosamente en una mezcladora de vórtex. Se elimina el ácido nucleico no encapsulado mediante centrifugación a 29.000xg y se lavan los sedimentos liposómicos. Se resuspenden los liposomas lavados a una concentración de fosfolípido total apropiada, por ejemplo, aproximadamente 50-200 mM. La cantidad de ácido nucleico encapsulado puede determinarse según métodos convencionales. Tras la determinación de la cantidad de ácido nucleico encapsulado en la preparación de liposomas, los liposomas pueden diluirse hasta una concentración apropiada y almacenarse a 4°C hasta su uso.

En una realización, se usa un dioleoilfosfatidilcolina lipídica para crear una formulación de liposomas. En una

realización, se mezclan composiciones que tienen afinidad por péptidos de superficie de esporas microbianas con lípidos en presencia de t-butanol en exceso. Se agitó la mezcla con vórtex antes de congelarse en un baño de acetona/nieve carbónica. Se liofilizó la mezcla congelada y se hidrató con solución salina tamponada con HEPES (HEPES 1 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5) durante la noche, y luego se sonicaron los liposomas en un sonicador de tipo baño durante de 10 a 15 min. El tamaño del péptido-liposomas oscila normalmente entre 200-300 nm de diámetro tal como se determina mediante el medidor de tamaño de partículas submicrométricas Autodilute modelo 370 (Nicomp, Santa Barbara, Calif).

Pueden usarse composiciones purificadas que comprenden una composición para el control de infecciones que tiene afinidad por un péptido de superficie de esporas sin modificaciones adicionales o puede diluirse en un portador farmacéuticamente aceptable. La composición para el control de infecciones puede usarse independientemente o en combinación con otros fármacos antimicrobianos. Debido a la estabilidad de las composiciones, se contempla que la invención pueda administrarse a seres humanos o animales, incluirse en preparaciones alimenticias, preparaciones farmacéuticas, productos médicos y farmacéuticos, productos cosméticos, productos higiénicos, productos de limpieza y agentes de limpieza, así como cualquier material sobre el que puedan pulverizarse o adherirse los péptidos en el que se desea la inhibición del crecimiento microbiano.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Se pretende que estos ejemplos representen técnicas que pueden poner en práctica realizaciones específicas de la presente invención. Sin embargo, pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y todavía obtener un resultado igual o similar sin apartarse del alcance de la invención tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo I

Síntesis de péptido de superficie de esporas

Pueden sintetizarse péptidos de superficie de esporas mediante el método en fase sólida empleando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 433A y estrategia de Fastmoc a escala de 0,1 mM. Puede realizarse la purificación de péptidos mediante HPLC de fase inversa en un instrumento Waters Delta Prep empleando una columna Vydac 218TPI022 (22 x 250 mm). Se realiza la separación con un sistema de gradiente de ácido trifluoroacético acuoso al 0,1% (disolvente A) y acetonitrilo al 100% que contiene ácido trifluoroacético al 0,085% (disolvente B). Se aplica un gradiente lineal de desde el 0 hasta el 100% de B a lo largo de 70 min y se recogen fracciones cada 0,2 min. Posteriormente se monitorizan las fracciones mediante HPLC de fase inversa a escala analítica en un sistema Beckman Gold usando una columna Vydac 218TP54 (4,6x250 mm) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min en condiciones de elución isocrática. Se combinan las fracciones seleccionadas y se liofilizan; se proporciona una caracterización adicional de péptidos mediante espectrometría de masas y electroforesis capilar. Se realizan mediciones de masas mediante inyección de flujo a 0,1 ml/min en acetonitrilo al 64% que contiene ácido trifluoroacético al 0,05% con un instrumento Hewlett-Packard modelo 1100 MSD equipado con una fuente de ionización por electropulverización.

Se realiza la electroforesis capilar en un instrumento Hewlett-Packard 3D equipado con una columna de sílice fundida con trayecto de luz extendido de 75 micrómetros (DI) x 80,5 centímetros (longitud total). Se llevan a cabo experimentos de electroforesis capilar a 18°C en tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 2,9 a 20.000 voltios. Se determina la concentración de péptido mediante análisis de aminoácidos cuantitativo en un analizador de aminoácidos Beckman 6300.

Ejemplo II

Cepas bacterianas y preparación de esporas

Se usaron las siguientes cepas de *Clostridium difficile*: ATCC 700057, ATCC BAA-1382 (cepa 630), ATCC 43594 y ATCC 9689. Se produjeron cultivos de esporas mediante crecimiento anaerobio sobre placas de *Brucella*-sangre-agar-Oxryase (BBAO) a 35°C durante 2 días, seguido por nuevo cultivo en línea sobre BBAO. Se recogieron las esporas en 15 ml de 1x PBS y Tween-80 al 0,1% (PBST) tras hacer crecer durante 4 días a 35°C. Se centrifugaron las esporas a 3000 x g durante 20 min a 4°C, se lavaron 3 veces con 15 ml de (PBST) y se resuspendieron en 10 ml de HistoDenz (Sigma). Se recubrió la suspensión encima de 15 ml de disolución de HistoDenz al 50% para formar un gradiente. Se centrifugó el gradiente a 5000 x g durante 15 min a 4°C. Se lavó el sedimento tres veces en 15 ml de PBST, anteriormente descrito, y se resuspendió en 5 ml de PBST. Entonces se sonicó la muestra dos veces durante 5 s a un nivel de potencia de 0,5 para lisar las células madre vegetativas. Entonces se repitió el procedimiento de HistoDenz anteriormente descrito. Se almacenaron las suspensiones de esporas finales a 4°C.

Ejemplo III

Microscopía electrónica de transmisión de secciones delgadas

Se usó el siguiente procedimiento para la preparación de muestras y la microscopía electrónica:

- 5 1. Fijar las muestras con glutaraldehído al 2,5%, paraformaldehído al 2%, tampón fosfato 0,01 M, DMSO al 2,5% a temperatura ambiente durante 2 horas.
2. Lavar en tampón fosfato 0,1 M (3 cambios a lo largo de un tiempo transcurrido de 15-30 minutos).
- 10 3. Tetróxido de osmio acuoso al 1% + ferrocianuro de potasio al 1,5% durante 1 h a TA.
4. Lavar en DDW (3-4 cambios a lo largo de un tiempo transcurrido de 15-30 minutos) a TA.
- 15 5. Tinción de bloques: acetato de uranilo acuoso al 0,5% durante la noche a 4°C.
6. Deshidratación (es decir, por ejemplo, con etanol), cada etapa durante 10-15 min: a) 30%; b) 50%; c) 70% (posible durante la noche a 4°C); d) 80%; e) 90%; f) 95%; g) 99%; y h) 100%
- 20 7. Óxido de propileno (PO): cada etapa durante 15-30 min
 - a) Etanol:PO = 50:50
 - b) Etanol:PO = 25:75
 - 25 c) PO = 100%
8. Epon: cada etapa durante 2 h
 - a) Epon:PO = 30:70
 - 30 b) Epon:PO = 50:50
 - c) Epon:PO = 75:25
 - 35 d) Epon = 100%
 - e) Epon = 100%
9. Polimerización, es decir, por ejemplo calentando a 60-70°C durante 48 h.
- 40 10. Corte en secciones
11. Tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo
- 45 12. Recubrimiento con carbono.
13. Observación mediante EM (JEOL 1200EX o Zeiss 902)

Ejemplo IV

Preparación de exosporio de *Clostridium difficile*

Se hicieron pasar aproximadamente 109 esporas una vez a través de una prensa francesa enfriada (4°C) a 20.000 lb/pulgada², véase la figura 17. El examen mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) confirmó que este procedimiento eliminaba fragmentos de exosporio grandes sin daño detectable al resto de la espora en comparación con fragmentos de exosporio de control sin procesar. Las fotografías comparan esporas antes y después de la separación junto con exosporio purificado unido. Véanse la figura 18A frente a la figura 18B. Se centrifugó la muestra extruída a partir de la prensa francesa durante 5 min a 9.000 x g y 4°C, y se guardó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 10 ml de tampón TEP frío, y se centrifugó tal como se describió anteriormente. Se resuspendió el sedimento en 10 ml de tampón TEP y se almacenó a -20°C mientras que se combinó el sobrenadante con el sobrenadante de la centrifugación anterior y se centrifugó durante 15 min a 9.500 x g y 4°C.

Entonces se concentró el sobrenadante resultante mediante centrifugación durante aproximadamente 60 min a 5000 x g y 4°C usando dispositivos de filtro para ultracentrifuga Amicon (Millipore), volumen final de 500 µl. El examen con microscopio electrónico de esta muestra de exosporio confirmó la práctica ausencia de esporas. Véase

la figura 18C.

Ejemplo V

5 Solubilización de exosporios, electroforesis de proteínas e inmunotransferencia

Se solubilizaron muestras de exosporio, de 10 μ l, mediante ebullición durante 5 min en 45 μ l de 2x tampón de muestra de Tris-glicina-SDS Novex (Invitrogen), 35 μ l de agua y 10 μ l de ditioneol 200 mM. Se separaron las proteínas solubilizadas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) con geles de Tris-glicina al 4-12%. Para la inmunotransferencia, se transfirieron proteínas mediante electroforesis de un gel de SDS-poliacrilamida a una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) y se trataron tal como se describe en el manual para el kit de ensayo Western Breeze de Invitrogen. En resumen, se bloqueó cada transferencia, se analizó con sonda con una dilución 1:1000 del AcM primario durante 1 h y se lavó. Entonces se analizó con sonda la transferencia con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina durante 30 min, se lavó y se reveló con la disolución de revelador de fosfatasa alcalina.

Ejemplo VI

20 Secuenciación de proteínas amino-terminal y espectrometría de masas

Se lavaron los fragmentos de SDS-PAGE con agua y se deshidrataron en acetonitrilo. Entonces se alquilaron las bandas con yodoacetamida antes de la digestión en gel. Se digirieron todas las bandas en gel mediante incubación durante la noche a temperatura ambiente en tripsina, 5 μ l de tripsina 20 ng/ μ l en bicarbonato de amonio 50 mM. Se extrajeron los péptidos formados de la poliacrilamida en dos alícuotas de 30 μ l de acetonitrilo al 50% con ácido fórmico al 5%. Se combinaron estos extractos y se evaporaron hasta <10 μ l en un instrumento Speedvac y después se resuspendieron en ácido acético al 1% para constituir un volumen final de ~30 μ l para el análisis mediante CL-EM.

El sistema de CL-EM (Finnigan LTQ) contenía una columna para HPLC capilar de fase inversa Phenomenex Jupiter C18 autoempaquetada de 9 cm x 75 μ m de di. Se inyectaron volúmenes de diez μ l del extracto y se introdujeron los péptidos eluidos en la fuente del espectrómetro de masas en línea. Se analizó el digesto usando la capacidad de multitarea dependiente de datos del instrumento adquiriendo espectros de masas de barrido completo para determinar pesos moleculares de péptidos y espectros iónicos de producto para determinar la secuencia de aminoácidos en barridos de instrumento sucesivos. Este modo de análisis produce aproximadamente 2500 espectros de disociación inducida por colisiones (CID) de iones cuya abundancia oscila a lo largo de varios órdenes de magnitud.

Se analizaron los datos usando todos los espectros de CID recogidos en el experimento para buscar en la base de datos no redundante del NCBI con el programa de búsqueda Mascot usando un filtro de taxonomía de mamíferos. Todos los espectros coincidentes se verificaron mediante interpretación manual. El procedimiento de interpretación estuvo ayudado mediante búsquedas adicionales usando los programas Sequest y Blast según se necesitara (Cleveland Clinic for Mass Spectrometry and Protein Sequencing).

Ejemplo VII

45 Espectroscopía por DC

Puede realizarse espectroscopía por dicroísmo circular (DC) en un espectrómetro AVIV 62 DS (AVIV Associates, Lakewood, N.J.) equipado con un control de temperatura termoeléctrico a 25°C. Las muestras contenían péptido a 0,11 - 0,24 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0; algunas muestras también contenían trifluoroetanol al 40% o lipopolisacárido (LPS) al 0,1% (0,22 mM). Se recogieron espectros a intervalos de 0,5 nm con un tiempo promedio de 2 s por punto de datos usando una longitud de trayecto de 0,1 cm. Se suavizan los espectros una vez a lo largo de un intervalo de cinco puntos de datos antes de trazarlos, representando cada espectro el promedio de dos barridos. Se resta el promedio de dos barridos de tampón antes de suavizar los datos. Se calcula el contenido helicoidal fraccional a partir de la razón de la elipticidad de residuo principal observada con respecto a la elipticidad de residuo media para un péptido helicoidal al 100% de longitud idéntica a 25°C. (Luo y Baldwin (1997)).

Ejemplo VIII

60 Cálculo del momento hidrófobo y la hidrofobicidad de péptidos. Se calculan los momentos hidrófobos y las hidrofobicidades de péptidos usando escalas de hidrofobicidad consenso normalizadas. Eisenberg *et al.*, J Cell Biochem 31: 11-7 25 (1986).

Ejemplo IX

65

Eliminación de exosporios de *Clostridium sporogenes*

Se eliminan exosporios de esporas de *C. sporogenes* usando homogenización en un homogeneizador de Braun durante intervalos de 30 s para un total de 150 s, requiriéndose de 120 a 150 s para la eliminación óptima de exosporios tal como se determinó mediante tinción con violeta cristal y microscopía óptica. Du *et al.*, “*Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surfaced localized Cry IAc toxin: physiological and pathogenic consequences” Appl. Environ. Microbiol. 62:3722-3726 (1996).

Se extraen esporas para eliminar componentes de exosporio y superficie de esporas. Aronson *et al.*, “Comparative structural and functional aspects of spore surfaces” en: Spores VII. American Society for Microbiology. págs. 54-61. G. Chambliss and J. C. Vary (ed.), Washington, D.C. (1978). Se extraen esporas de *C. sporogenes* (1,1 x 10⁹) en ácido ciclohexilaminoetanosulfónico 5 mM – urea 8 M – β-mercaptoetanol 50 mM – dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,8% a pH 9,8 durante 90 min a 378C. Se centrifugan las esporas a 12.000 x g durante 10 min, y se somete el extracto de sobrenadante a ebullición durante 5 min. Se aplican extractos directamente a geles de SDS-poliacrilamida que contienen urea 6 M. Para la determinación del peso molecular, se transfieren los geles a nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 mm. Se bloquean las transferencias con albúmina sérica bovina al 3% en TBS, pH 7,4. Entonces se incuban las transferencias con el anticuerpo biotinilado apropiado (es decir, por ejemplo, C33 y/o C225, o D89 para *C. sporogenes*) diluido 1:1.000 en TBS que contiene Tween 20 al 0,05%. Se usa peroxidasa marcada con avidina (Sigma A7419) diluida 1:1.000 en TBS-Tween 20 al 0,05% para detectar los antígenos con el sustrato insoluble 4-naftol (Bio-Rad).

Se realiza la determinación de glicoproteínas usando tinción con ácido peryódico de Schiff. Se fijan los geles durante la noche y se tratan con ácido peryódico al 0,7% durante 2 h y después con metabisulfito al 0,2% durante 2 h. Entonces se exponen los geles a un reactivo de Schiff que comprende fucsina básica, metabisulfito de sodio y ácido clorhídrico (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). Se determina la movilidad de proteínas que presentan tinción positiva como glicoproteínas a partir de los extractos de esporas y se compara con la movilidad de los antígenos determinada mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Se preparan criosecciones ultradelgadas (de aproximadamente 100 nm) de esporas para el marcaje inmunológico con oro coloidal. Chang *et al.*, “Immunocytochemical localization of antigens in *B. cereus* T spores” J Rapid Methods Automat. Microbiol. 2:229-233 (1993). Para estos experimentos se usan esporas de *C. sporogenes* PA3679 de la misma reserva madre que se había usado para el antígeno. Se hacen flotar las criosecciones sobre PBS que contiene suero de ternero fetal al 5%, seguido en secuencia por PBS, PBS que contiene cloruro de amonio 0,1 M y PBS, cada uno durante de 5 a 10 min a temperatura ambiente. Se hacen flotar las secciones sobre gotas de reactivo primario (el anticuerpo monoclonal apropiado diluido 1:100) durante de 1 a 2 h, seguido por lavado en PBS seis veces durante 5 min cada vez. Entonces se hacen flotar las secciones sobre gotas de reactivo secundario durante de 20 a 30 min. El reactivo secundario es anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón más anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón conjugados con oro coloidal de 10 nm de diámetro usados a una dilución de 1:10. Se lavan las secciones de nuevo seis veces en PBS, seguido por tres lavados con agua destilada. Se tiñen y se incrustan en metilcelulosa haciéndolas flotar sobre gotas de metilcelulosa 2,3 M que contiene acetato de uranilo acuoso saturado a aproximadamente el 20% (vol/vol). Se recogieron rejillas en bucles, se drenaron y se secaron al aire. Se visualizan en un microscopio electrónico Philips EM 300. Los controles negativos son esporas tratadas con anticuerpos monoclonales de los isotipos IgG1 e IgM que no reaccionaron con esporas bacterianas.

Ejemplo XEnsayo de frotación con cilindro de esporas de *Clostridium difficile* unidas a una superficie

Este ejemplo describe una realización de un método que puede someter a ensayo esporas que están unidas a una superficie. En este ejemplo, se unen esporas de *C. difficile* a una superficie y se someten a ensayo mediante el método de frotación con cilindro. ATSM International, “Standard Test Method for Recovery of Microorganisms From Skin using the Cup Scrub Technique” E1874 - 09 (2009).

Materiales

Esterilizador – Cualquier esterilizador con vapor adecuado que pueda producir las condiciones de esterilización.

Cilindros para frotación – Cilindros estériles de composición adecuada, preferiblemente con mangos de barras para facilitar la estabilización, altura de aproximadamente 2,5 cm, diámetro interior de tamaño conveniente. Los tamaños útiles oscilan entre aproximadamente 1,5 y 4,0 cm.

Varilla de vidrio pulida o varilla de policía de caucho – Puede fabricarse en el laboratorio o comprarse.

Pipeteador - Con puntas desechables para suministrar volumen/volúmenes apropiado(s).

Vasos de precipitados, tubos de ensayo u otro recipiente estériles, para recibir el fluido de frotación con cilindro.

Cultivos microbianos – Este método de prueba puede usarse dentro de un protocolo dirigido a cualquier cultivo microbiano (es decir, por ejemplo, un cultivo microbiano de *C. difficile*).

- 5 Fluido de toma de muestras y fluido de dilución – Agua tamponada con fosfato de Butterfield estéril u otro fluido de recuperación de composición adecuada; debe contener un agente de inactivación antimicrobiano para cualquier agente antimicrobiano que pueda estar en el sitio de prueba; la eficacia del agente de inactivación debe determinarse mediante

10 Método de prueba

Sitios de piel de control de prueba y de nivel inicial

- 15 Se seleccionan sitios de piel que son apropiados para el crecimiento de *C. difficile*, proporcionando sitios de muestra contralaterales para su uso como controles. El número de sujetos (seres humanos o animales) seleccionados para el ensayo depende de la confianza estadística necesaria para los resultados de prueba esperados, la variabilidad encontrada en el estudio, y la eficacia relativa de cualquier agente antibacteriano que pueda evaluarse. Puede haber múltiples sitios disponibles en sujetos; se requiere aleatorización para suprimir el sesgo de la muestra. El número de repeticiones requeridas para distinguir efectos dependerá en parte de la idoneidad y el diseño de controles dentro del protocolo. El uso de esta técnica sobre piel aislada o equivalentes depende de proteger el sitio de prueba con el fin de realizar eficazmente el procedimiento.

Recogida de muestras *in vivo*

- 25 Se delinea la zona de la que van a tomarse muestras mediante un cilindro de toma de muestras estéril. Se presiona el cilindro firmemente contra la superficie de la piel durante la toma de muestras para garantizar que el fluido de toma de muestras no escape del sitio de toma de muestras. Se pipetea al interior del cilindro una alícuota de un mínimo de 1,5 ml de fluido de toma de muestras estéril, con o sin neutralizadores de producto. Entonces se frota toda la zona con presión moderada durante 60 ± 6 s usando una varilla de vidrio pulida estéril o varilla de policía de caucho. Tras frotar, se transfiere el fluido de toma de muestras mediante pipeta a un tubo de muestras estéril. Se repite este procedimiento una vez más con una alícuota nueva de fluido de toma de muestras. Se combinan los fluidos de toma de muestras. Se repite este procedimiento para cada sitio de toma de muestras. Se usan las mismas pipetas, cilindros, varillas de vidrio y varillas de policía para ambos lavados de un sitio, pero se usan equipos estériles nuevos para cada sitio. Tras recogerse las muestras, se usan toallas de papel para secar el sitio. Debe tenerse cuidado durante este proceso para evitar derramar el fluido de toma de muestras a un sitio adyacente del que no se han tomado muestras. Tras todas las tomas de muestras, cuando se usan organismos marcadores, debe descontaminarse el sitio de toma de muestras usando isopropanol a del 70 al 90% o equivalente, seguido por frotación con clorhexidina al 4%.

40 Recogida de muestras de piel aislada o equivalente de piel

- Se obtienen recuentos microbianos cuantitativos mediante la técnica de frotación con cilindro. Se usa este procedimiento para muestras de prueba y de control. Se colocan las muestras y se protegen según sea necesario para permitir la colocación y el uso eficaz del cilindro de toma de muestras. Se delinea la zona de la que van a tomarse muestras mediante un cilindro de toma de muestras estéril. Se presiona el cilindro firmemente contra la superficie de muestra durante la toma de muestras para garantizar que el fluido de toma de muestras no escape del sitio de toma de muestras. Se pipetea al interior del cilindro una alícuota de un mínimo de 1,5 ml de fluido de toma de muestras estéril, con o sin neutralizadores de producto. Entonces se frota toda la zona con presión moderada durante 60 ± 6 s usando una varilla de vidrio pulida estéril o varilla de policía. Tras frotar, se transfiere el fluido de toma de muestras mediante pipeta a un tubo de muestra estéril. Se repite este procedimiento una vez más con una alícuota nueva de fluido de toma de muestras. Se combinan los fluidos de toma de muestras. Se repite este procedimiento para cada sitio de toma de muestras. Se usan las mismas pipetas, cilindros, varillas de vidrio y varillas de policía para ambos lavados de un sitio, pero se usan equipos nuevos para cada sitio. Si hay múltiples sitios de muestra en el mismo fragmento de tejido aislado, debe tenerse cuidado durante este proceso para evitar derramar el fluido de toma de muestras a un sitio adyacente del que no se han tomado muestras.

Recuentos microbianos

- 60 Se mezcla cada muestra exhaustivamente. Se preparan diluciones en serie de diez veces de cada muestra en fluido de dilución. Se preparan placas de vertido o extensión cuantitativas por duplicado usando semilla de soja-digesto de caseína-agar con neutralizador adecuado. Se incuban las muestras sembradas en placa a una temperatura de crecimiento adecuada, 62°C durante de 24 a 72 h, o hasta que pueden verse colonias en las placas.

Ejemplo XI

- 65 Ensayos de adherencia de esporas – Proteínas de la piel

Este ejemplo proporciona una realización para someter a ensayo la adherencia de esporas a una proteína de la piel. Con fines de ilustración, el ejemplo describe la generación de una proteína de la piel, involucrina, para estudiar la adherencia de *C. difficile*.

5

Plásmidos

Los plásmidos compatibles para este ensayo pueden incluir, pero no se limitan a, vector de sobreexpresión de *lsdA* p*lsdA*, vector lanzadera de *E. coli*-*S. aureus* pMK4, vector de complementación de *rlsdA* pSRCOO1, plásmido de expresión de *L. lactis* pNZ8148, vector de expresión de *lsdA* pL*lsdA*, vector de expresión de *lsdA*_NEAT pL_NEAT, vector de expresión de *lsdA*_C pL_C, plásmido de sobreexpresión pQE30 (Qiagen), pHuman K, expresión de citoqueratina 10 humana pQE30, clon de ADNc de involucrina 4749952 pCMC-SPORT6-INV (IMAGE consortium, MRC Geneservice), involucrina con cola de 6 His pQE30-INV o clon de ADNc de loricrina pET11a-LOR. Clarke *et al.*, "LsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin" Mol. Microbiol. 51: 1509-1519 (2004); Clarke *et al.*, "The *Staphylococcus aureus* surface protein LsdA mediates resistance to innate defenses of human skin" Cell Host Microbe 1:199-212 (2007); Sullivan *et al.*, "New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments" Gene 29:21-26 (1984); Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem, y W. M. de Vos. 1998. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 64: 15-21; Sullivan *et al.*, "New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments" Gene 29:21-26 (1984); y Walsh *et al.*, "Clumping factor B, a fibrinogen binding MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus* also binds the tail region of type I cytokeratin 10" J. Biol. Chem. 279:50691-50699 (2004).

10

15

20

25

30

Se hace crecer *Clostridium difficile* en un medio de Luria-Bertani, usando selección con kanamicina (50 µg/ml) cuando sea apropiado. Se hacen crecer cepas de *C. difficile* en medio de infusión de cerebro y corazón (Oxoid) o medio CL químicamente definido. Horsburgh *et al.*, "In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis" J. Bacteriol. 183:468-475 (2001). Cuando se incluyen, se añaden antibióticos a las siguientes concentraciones: eritromicina, 5 µg/ml; lincomicina, 25 µg/ml; y tetraciclina, 2,5 µg/ml. Pueden hacerse crecer cultivos de *C. difficile* a 37°C.

Clonación del gen de involucrina

Se amplifica la secuencia codificante para involucrina a partir de pCMV-SPORT6-INV mediante PCR empleando Pfu polimerasa y el cebador directo CGCGGATCCATGTCCCAGCAA CACACAC (SEQ ID NO: 446), que incorpora un sitio BamHI (subrayado), y el cebador inverso CCCAAGCTTTATTTATGTTTGGG TGGCCAC (SEQ ID NO: 447), que incorpora un sitio HindIII (subrayado). Se clona el fragmento en pQE30 cortado con BamHI y HindIII, formando pQE30-INV.

35

40

Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

Se induce la expresión de *lsdA* recombinante con cola de hexahistidina (*rlsdA*), citoqueratina 10 e involucrina mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 100 µM (IPTG) a células en crecimiento. Se logra la purificación usando cromatografía con quelato de níquel usando el sistema Hi-Trap (Amersham Biosciences). Puede marcarse por afinidad o purificarse loricrina recombinante a partir de *E. coli* T4037 lisada.

45

Análisis mediante ELISA de la unión de ligandos.

Se usa un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para analizar la capacidad de *rlsdA* para unirse a ligandos. Clarke *et al.*, "Analysis of Ebh, a 1,1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*" Infect. Immun 70:6680-6687 (2002). En resumen, se añaden 100 µl de ligando apropiado o albúmina sérica bovina (BSA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (5 µg/ml) a pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) durante la noche a 4°C. Se lavan las placas tres veces con PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,05% [vol/vol]), y se bloquean los sitios de unión a proteína restantes con BSA al 5% (p/vol) en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavan de nuevo las placas tres veces en PBST, y se añaden diferentes concentraciones de *rlsdA* purificada (es decir, por ejemplo, de 0 a 15 µM) diluida en PBS-BSA al 0,1% (p/vol). Se incuban las placas durante 1 h adicional antes de lavarse tres veces, y se añade anticuerpo anti-*lsdA* (diluido 1:1.000) en PBS-BSA al 0,1% (p/vol), seguido por 1 h de incubación.

55

60

65

Pueden generarse anticuerpos de ratón usados para la detección de *lsdA* unida según métodos notificados. Clarke *et al.*, "LsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin" Mol. Microbiol. 51: 1509-1519 (2004). Se lavan las placas tres veces adicionales, se añaden anticuerpos anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina diluidos 1:30.000 en PBS-BSA al 0,1% (p/vol) y se incuban las placas durante 1 h. Finalmente, se detectan los anticuerpos unidos usando el sistema de p-nitrofenil-fosfato Sigma Fast (Sigma). Se leen las placas a 405 nm en un lector de placas de microtitulación Victor (Wallac).

Se realizan estudios de la inhibición de la unión mediante la incubación de IrsdA con diversas concentraciones de inhibidor o BSA (de 0 a 10 μM) durante 1 h a temperatura ambiente en PBS-BSA al 0,1% (p/vol). Entonces se añaden las mezclas de reacción a pocillos recubiertos con ligando, y se detecta la proteína unida.

5

Microscopía de fuerza atómica

Se funcionalizan puntas y soportes de microscopía de fuerza atómica (AFM) con moléculas de IrsdA y loricrina de la siguiente manera. Se recubren micropalanca de AFM (Microlevers; Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA) y obleas de silicio (Siltronix, Francia) usando evaporación térmica por haz de electrones con una capa de Cr de 5 nm de grosor seguido por una capa de Au de 30 nm de grosor. Antes de su uso, se aclaran las superficies recubiertas con oro con etanol, se secan con un flujo de nitrógeno suave y se limpian durante 15 min mediante tratamiento con UV/ozono (Jelight Co., Irvine, CA). Se sumergen las puntas de oro y los soportes de oro durante la noche en disoluciones de etanol que contienen alcanotioles terminados con nitrilotriacetato 0,05 mM (5%) (Prochimia) y terminados con tri(etilenglicol) [tri(EG)] (95%) y se aclaran con etanol. Se aplica brevemente sonicación para eliminar agregados de alcanotiol que pueden adsorberse. Entonces se sumergen las superficies recubiertas con SAM (monocapa autoensamblada) en una disolución acuosa 40 mM de NiSO_4 (pH 7,2) durante 1 h y se aclaran con PBS. Finalmente, se incuban las muestras en PBS con IrsdA con cola de His 2 μM durante 2 h y se aclaran adicionalmente varias veces con PBS. Para loricrina y BSA, se sumergen los soportes de oro durante 36 h en una disolución de etanol que contiene una mezcla de 20 μM (95:5, mol/mol) de alcanotioles terminados con oligo(EG) (OEG) y OEG-ácido propiónico. Tras un aclarado con etanol, se aplica brevemente sonicación para eliminar agregados de alcanotiol que pueden adsorberse. Se sumergen los soportes durante 30 min en agua MilliQ (Millipore) que contiene N-hidroxisuccinimida (NHS) 20 g/litro (Aldrich) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 50 g/litro (Sigma), se aclaran con agua MilliQ, se incuban con loricrina 10 $\mu\text{g/litro}$ o BSA (sigma) en PBS durante 3 h, se aclaran adicionalmente y después se usan inmediatamente.

10

15

20

25

Se obtuvieron imágenes de AFM y curvas de fuerza-distancia en PBS a temperatura ambiente usando un instrumento Picoforce Multimode AFM (Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA). Se inmovilizaron los soportes sobre un disco de muestra de acero usando un pequeño trozo de cinta adhesiva. Se transfirieron inmediatamente las muestras montadas a la celda de líquido de AFM mientras se evitaba la deshumectación. Se registraron todas las curvas de fuerza con una fuerza aplicada máxima de 450 pN. Se midieron las constantes de resorte de las micropalanca usando el método de ruido térmico (Picoforce; Veeco Metrology Group), proporcionando valores (0,011 N/m) que eran ligeramente mayores que los indicados por el fabricante (0,01 N/m). Para explicar la flexibilidad de las biomoléculas, se estimaron tasas de carga (en piconewtons por segundo) multiplicando la velocidad de retracción de la punta (en nanómetros por segundo) por la pendiente de los picos a la ruptura (en piconewtons por nanómetro).

30

35

Interacciones microbianas con ligandos inmovilizados

Puede medirse la unión de células en fase de crecimiento semilogarítmica a ligandos inmovilizados usando un método descrito anteriormente. Ni Eidhin *et al.*, "Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogenbinding adhesin of *Staphylococcus aureus*" Mol. Microbiol. 30:245-257 (1998). Además, pueden recogerse células escamosas a partir de las partes anteriores de las fosas nasales de donantes sanos, y se somete a ensayo la unión de *C. difficile* que se hacen crecer en medio libre de hierro. O'Brien *et al.*, "Staphylococcus aureus clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization" Cell. Microbiol. 4:759-770 (2002). Se realizaron comparaciones entre cepas usando la prueba de la t de Student.

40

45

Ejemplo XII

Expresión y purificación de proteínas de exosporio recombinantes

Se crearon constructos de expresión que contenían proteínas de exosporio recombinantes con una cola de polihistidina N-terminal y se transformaron en cepas de *E. coli*. Se produjeron proteínas recombinantes mediante inoculación de cultivos de 1 litro de caldo Luria (suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$) con 10 ml de un cultivo durante la noche del constructo de expresión descrito anteriormente. Tras 2,5 h de crecimiento a 37°C, se añadió isopropil- β -D-tiogalactósido a una concentración final de 0,2 mM para inducir la expresión de proteínas y se dejaron crecer los cultivos durante otras 3 h. Se recogieron bacterias mediante centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos celulares en PBS antes de almacenarse a -80°C. Posteriormente se descongeló la suspensión en un baño de agua a temperatura ambiental durante 30 min y se lisaron las células usando una prensa francesa. Se retiraron los residuos celulares insolubles mediante centrifugación a 28.000 xg durante 20 min, seguido por filtración a través de una membrana de 0,45 μm . Entonces se purificó inicialmente proteína de exosporio recombinante usando cromatografía de quelación de metales. Se aplicaron lisados bacterianos a una columna de quelación HiTrap cargada con Ni_2 de 5 ml (Amersham Pharmacia Biotech) y se eluyó la proteína unida con un gradiente lineal de 200 ml de imidazol 0-200 mM en Tris-HCl 4 mM, NaCl 100 mM, pH 7,9, a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Se combinaron las fracciones que correspondían a proteína de exosporio recombinante, tal

55

60

65

5 como se determinó mediante SDS-PAGE, y se dializaron frente a Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, antes de una purificación adicional mediante cromatografía de intercambio iónico. Se aplicó proteína dializada a una columna HiTrap Q de 5 ml (Amersham Pharmacia Biotech) y se eluyó la proteína unida con un gradiente lineal de 200 ml de NaCl 0-0,5 M en Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Se identificaron las fracciones que contenían proteína de exosporio purificada mediante SDS-PAGE y se estimó que eran puras al 90%.

Ejemplo XIII

Ensayos de adherencia de proteínas de exosporio

10 Se realizó la unión de proteínas de exosporio a proteínas de piel humana y/o queratinocitos humanos diferenciados EpiDerm® esencialmente tal como se describió en los ejemplos X y XI anteriores con la excepción de que se reemplazó la proteína de exosporio por esporas conjugadas con FITC. Se logró la detección de la proteína unida usando estreptavidina conjugada con fluoresceína (Rockland Immunochemicals). Se midió la fluorescencia total (F_{total}) por pocillo tras una incubación de 1 h usando un lector de fluorescencia Fluoroskan II (Labsystems, Beverly, MA), con $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$.

15

REIVINDICACIONES

1. Método de examen para examinar composiciones para el control de infecciones que inhiben, antagonizan, interfieren, desplazan y/o alteran la unión de una espora microbiana a una superficie animada y/o inanimada, comprendiendo el método: a) proporcionar; i) un péptido aislado, en el que el péptido se deriva de una proteína de superficie de esporas de *Clostridium*; y ii) un compuesto de prueba de control de infecciones que se sospecha que tiene una interacción con el péptido; b) poner en contacto el péptido con un compuesto de prueba de control de infecciones; c) detectar la interacción del péptido con el compuesto de prueba de control de infecciones; y d) cuando se detecta una interacción, seleccionar el compuesto de prueba de control de infecciones para pruebas adicionales para identificar composiciones eficaces para el control de infecciones, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 15.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína de superficie de esporas microbianas comprende una proteína de superficie de esporas de *Clostridium difficile*.

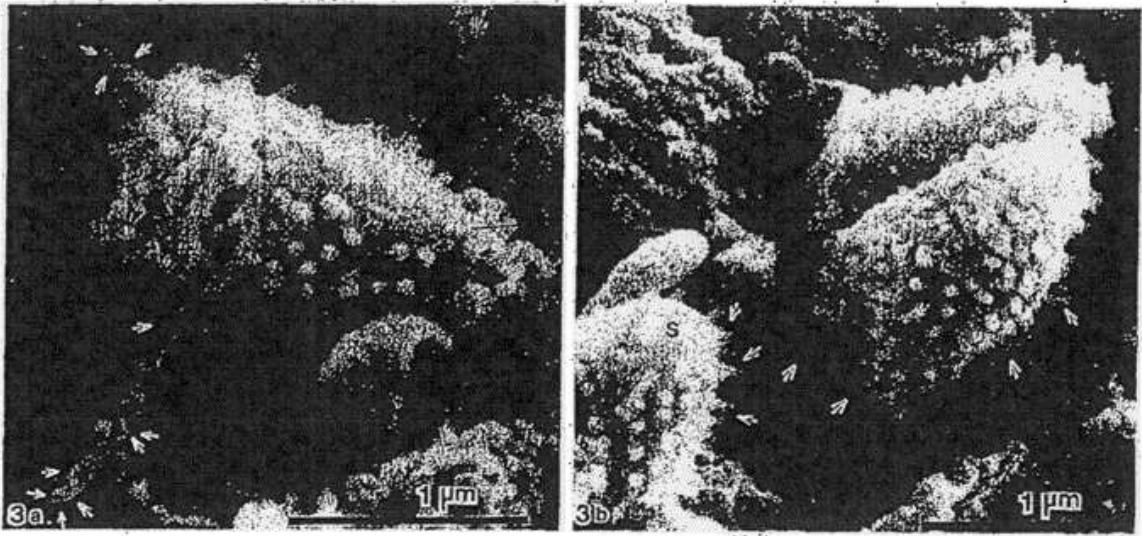


FIGURA 1



FIGURA 2



FIGURA 3

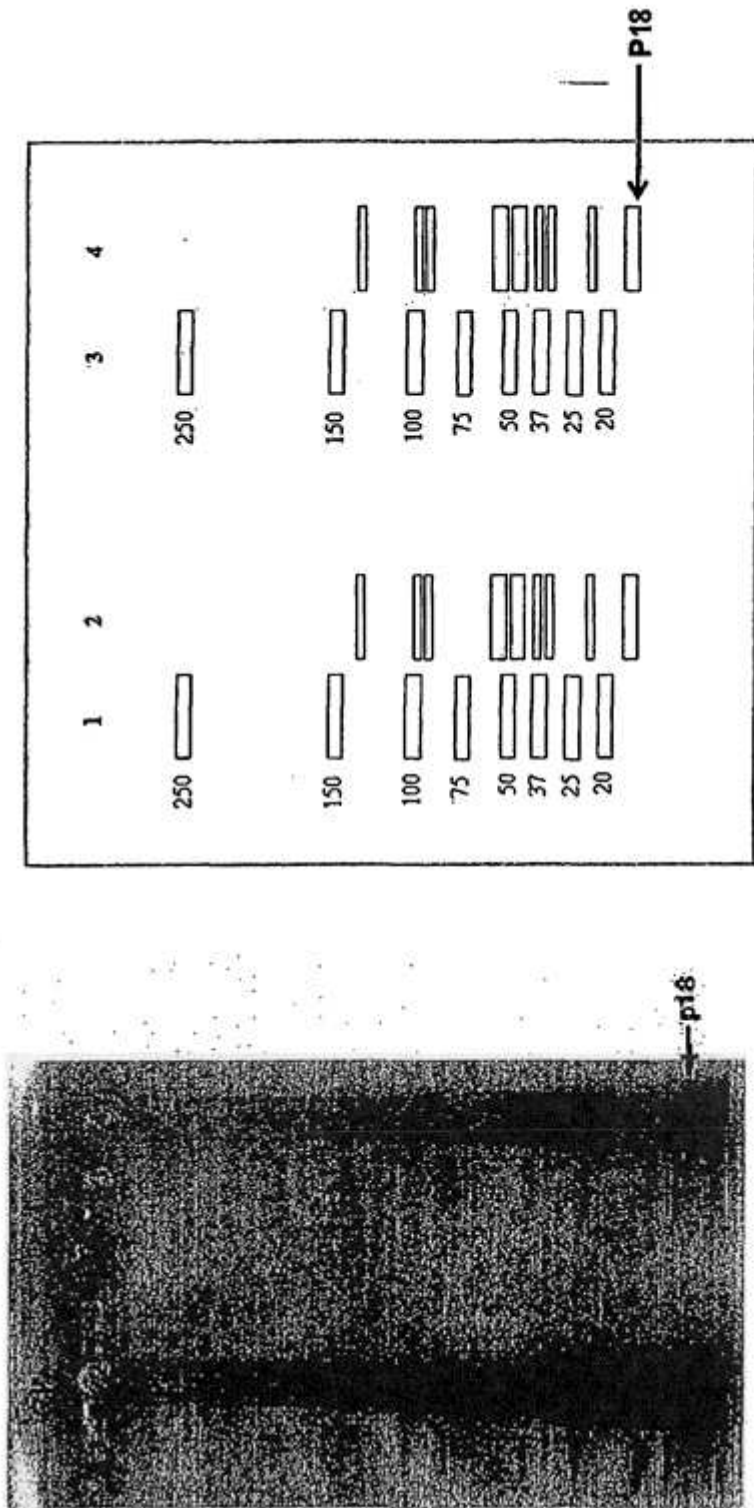


FIGURA 4

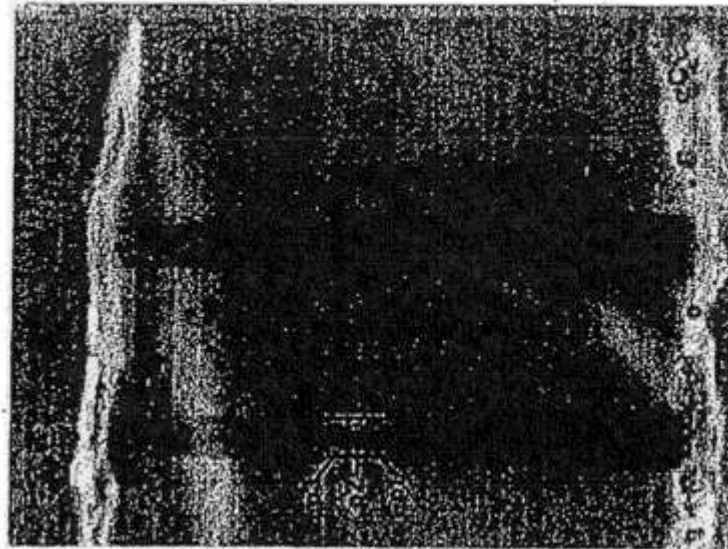
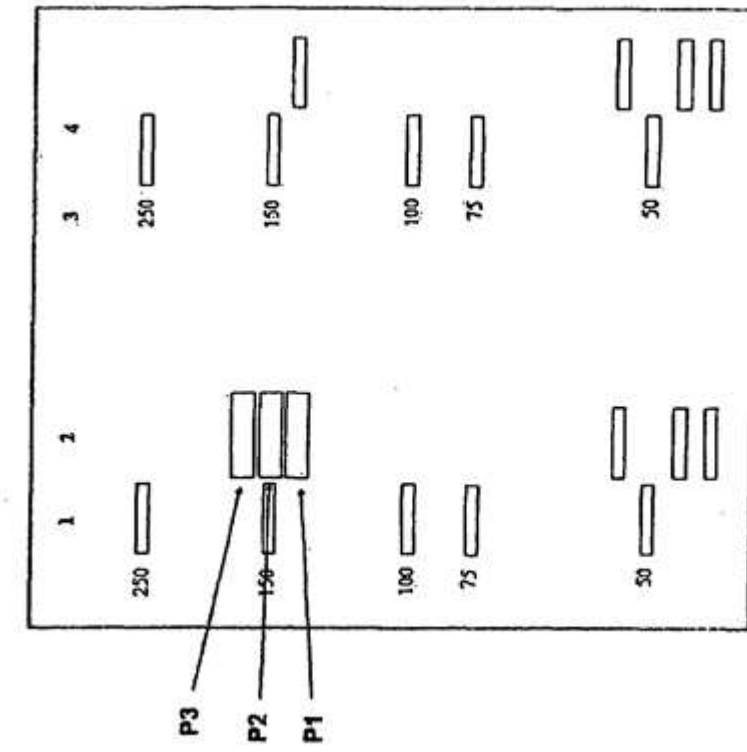


FIGURA 5

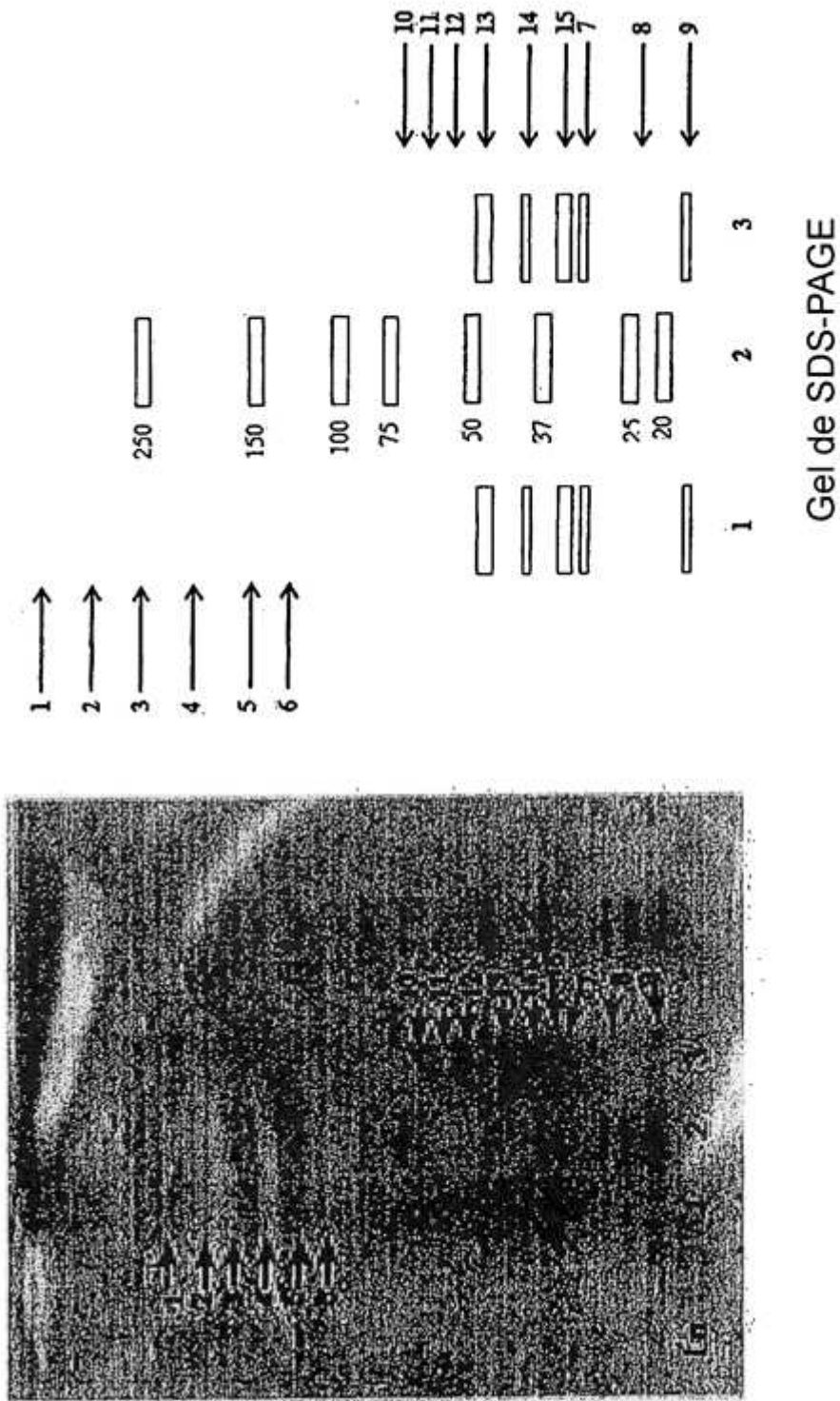


FIGURA 6A

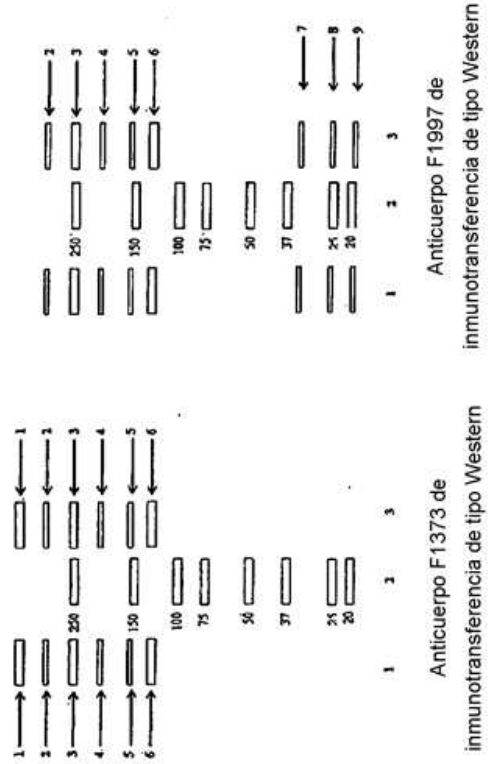
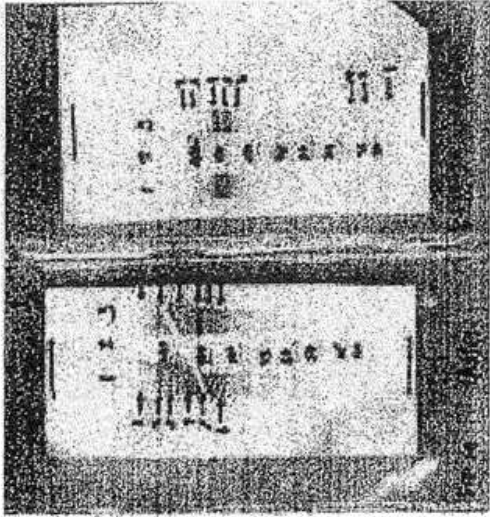


FIGURA 6C

FIGURA 6B

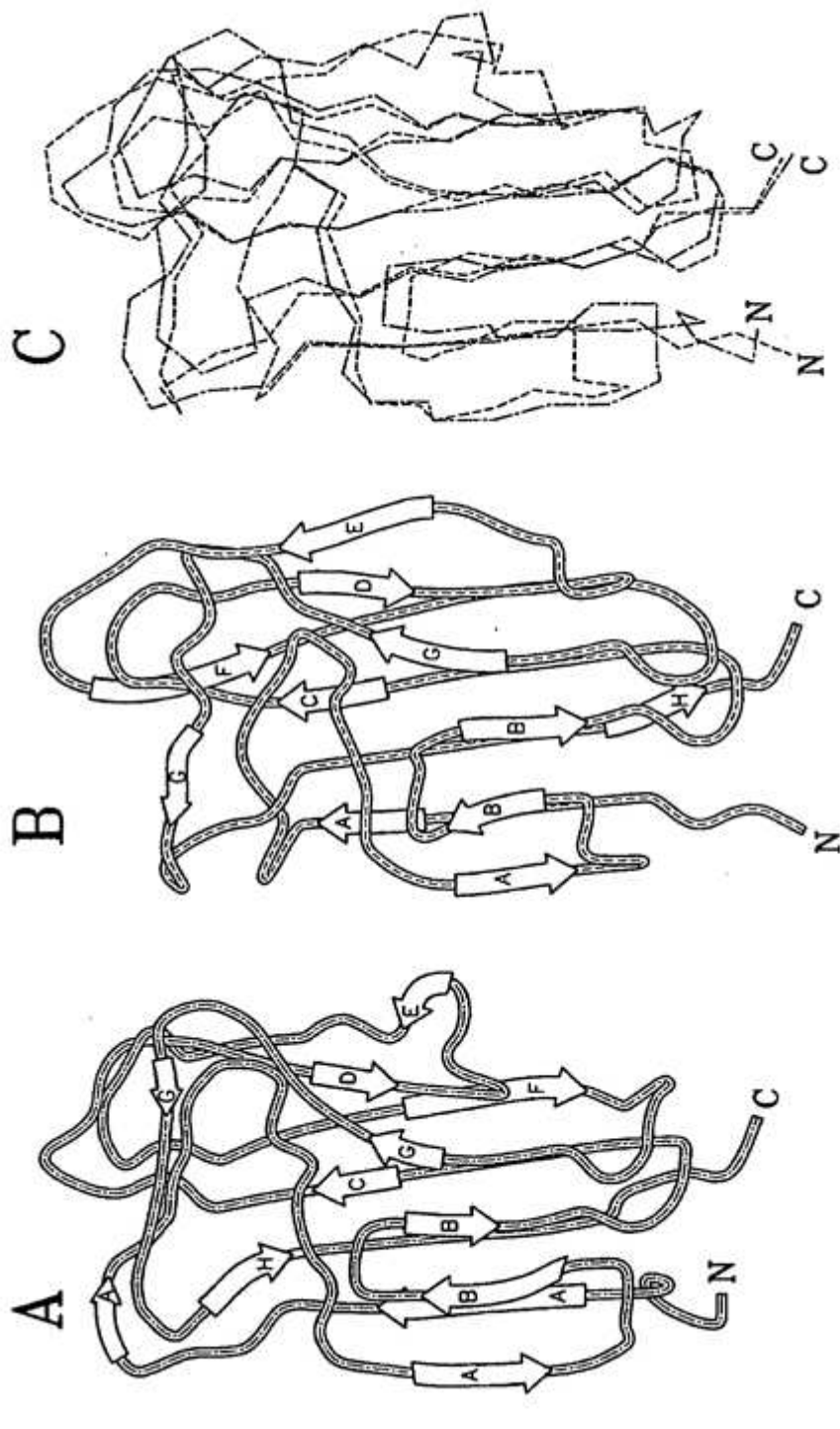


FIG--7

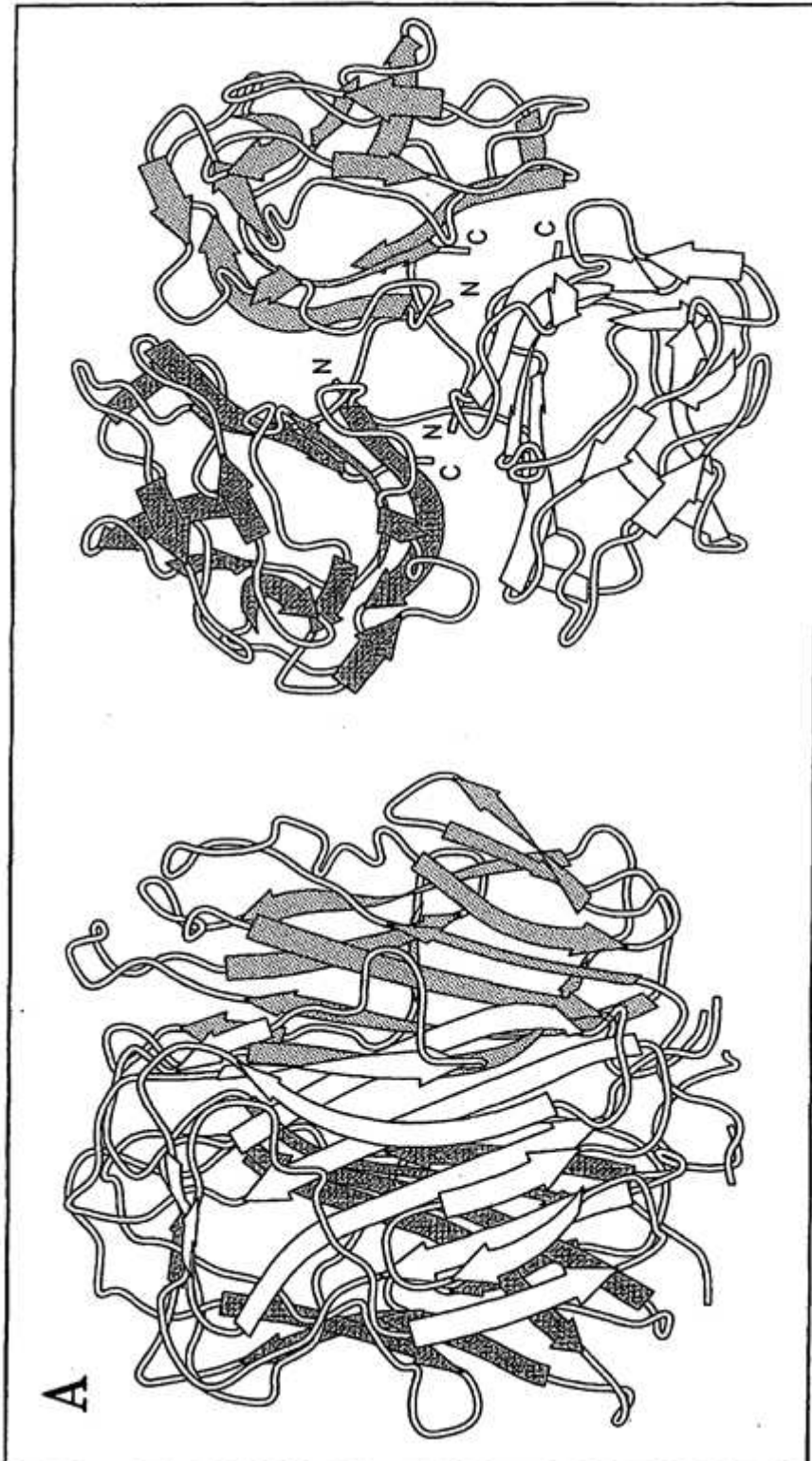


FIG-8

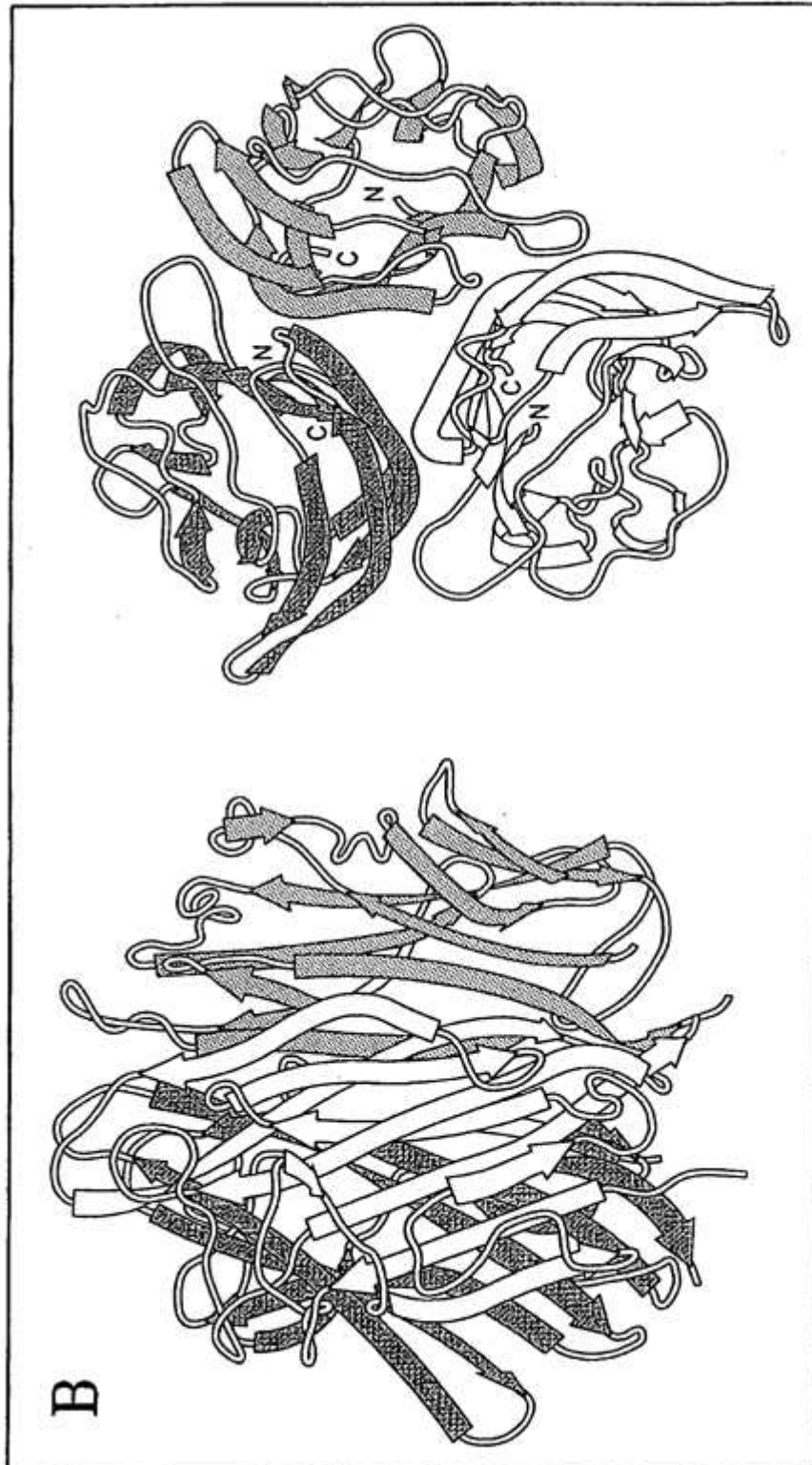


FIG-8
(continuación)

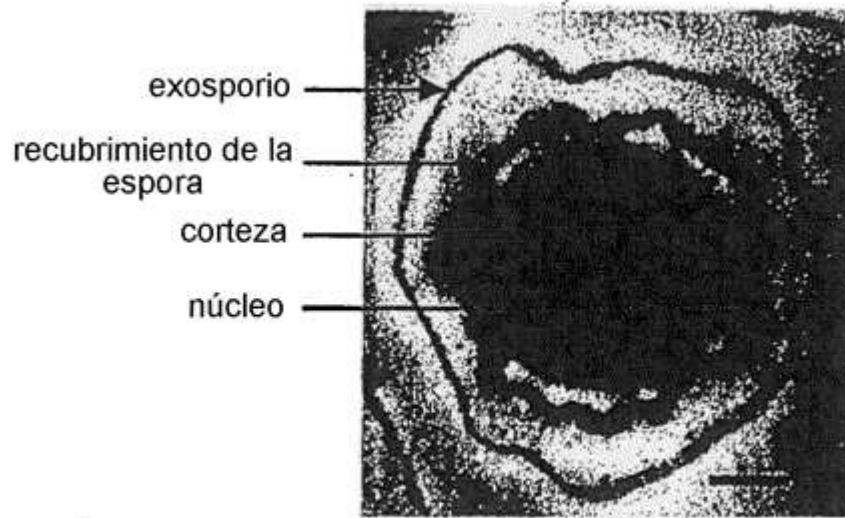


FIGURA 9A

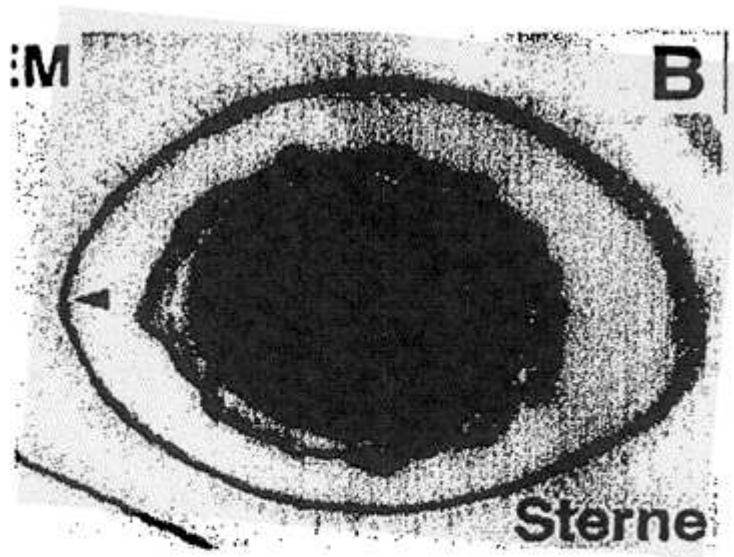


FIGURA 9B

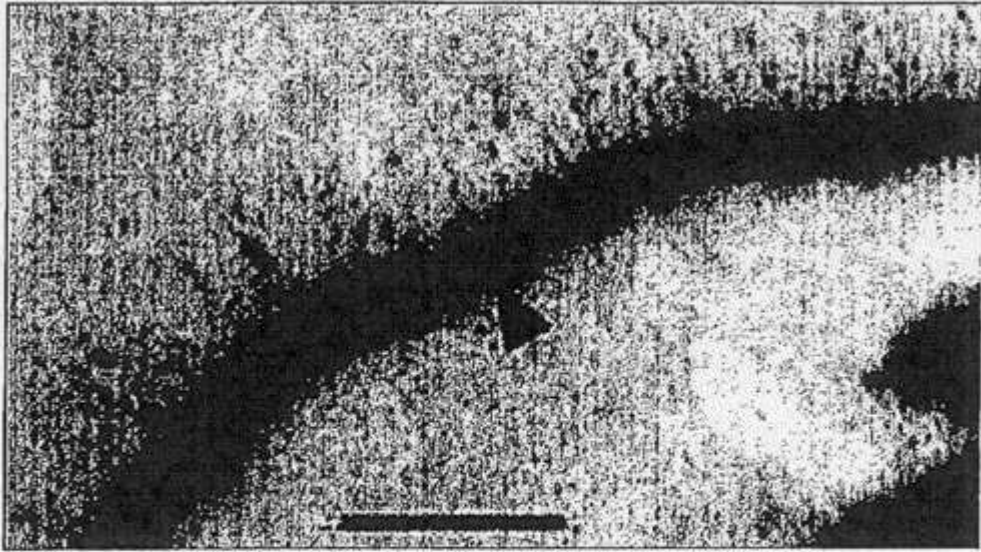


FIGURA 9C

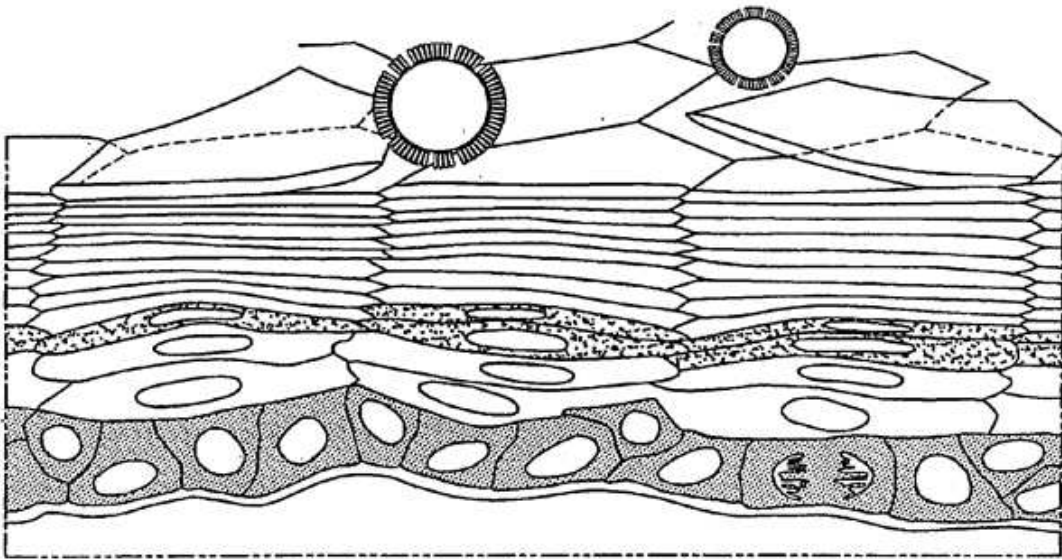


FIG-10A

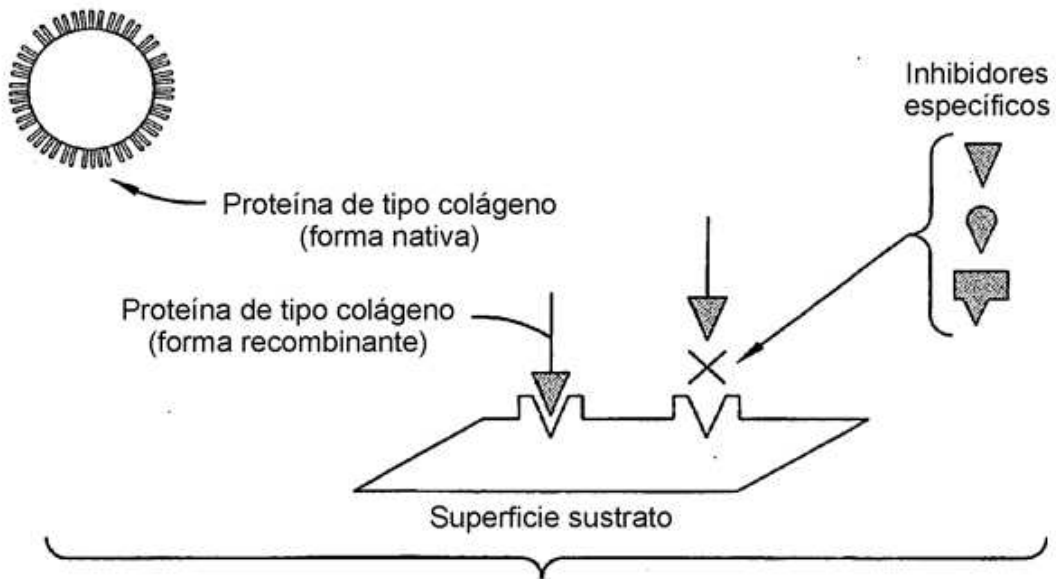


FIG-10B

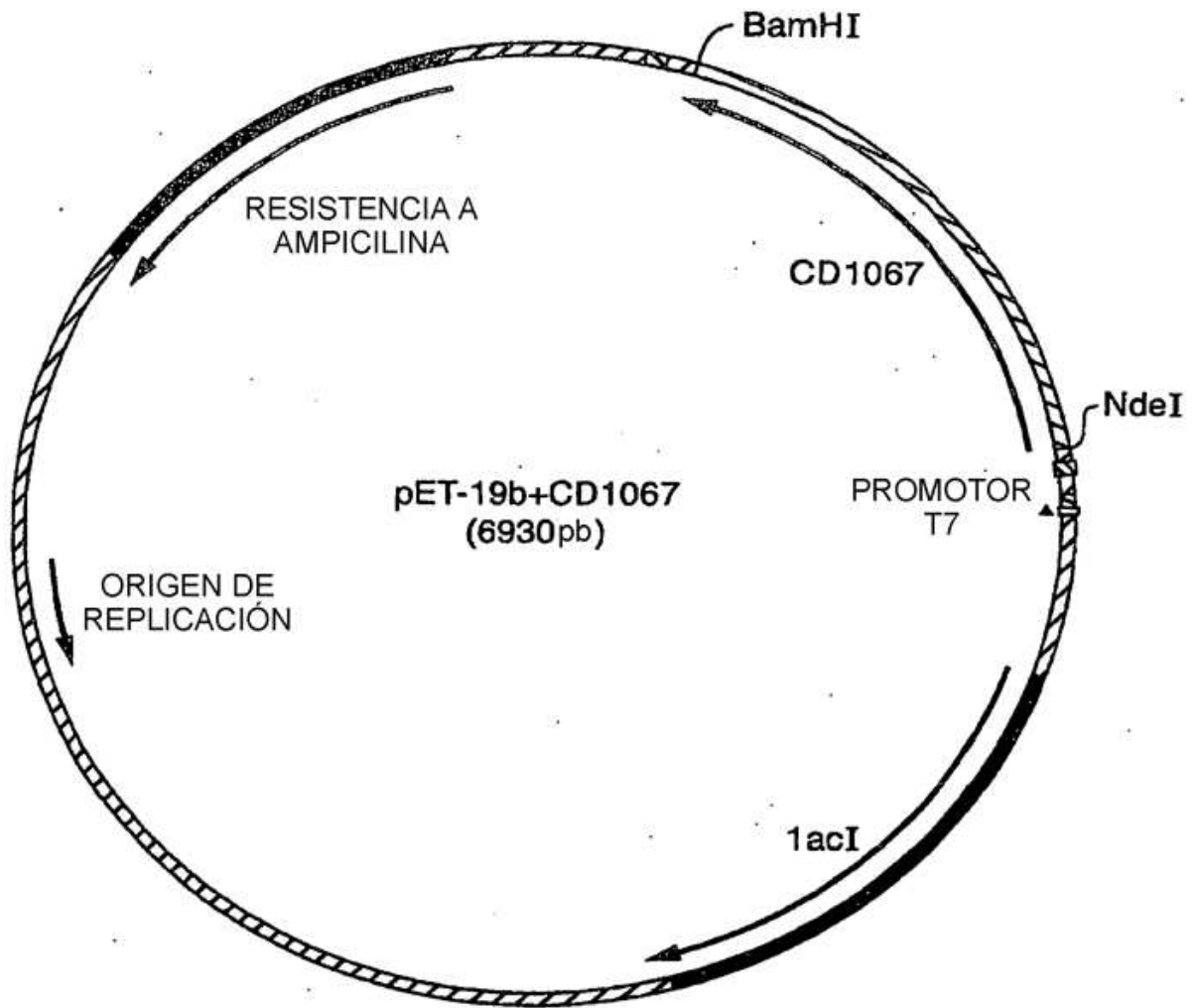


FIG. 11

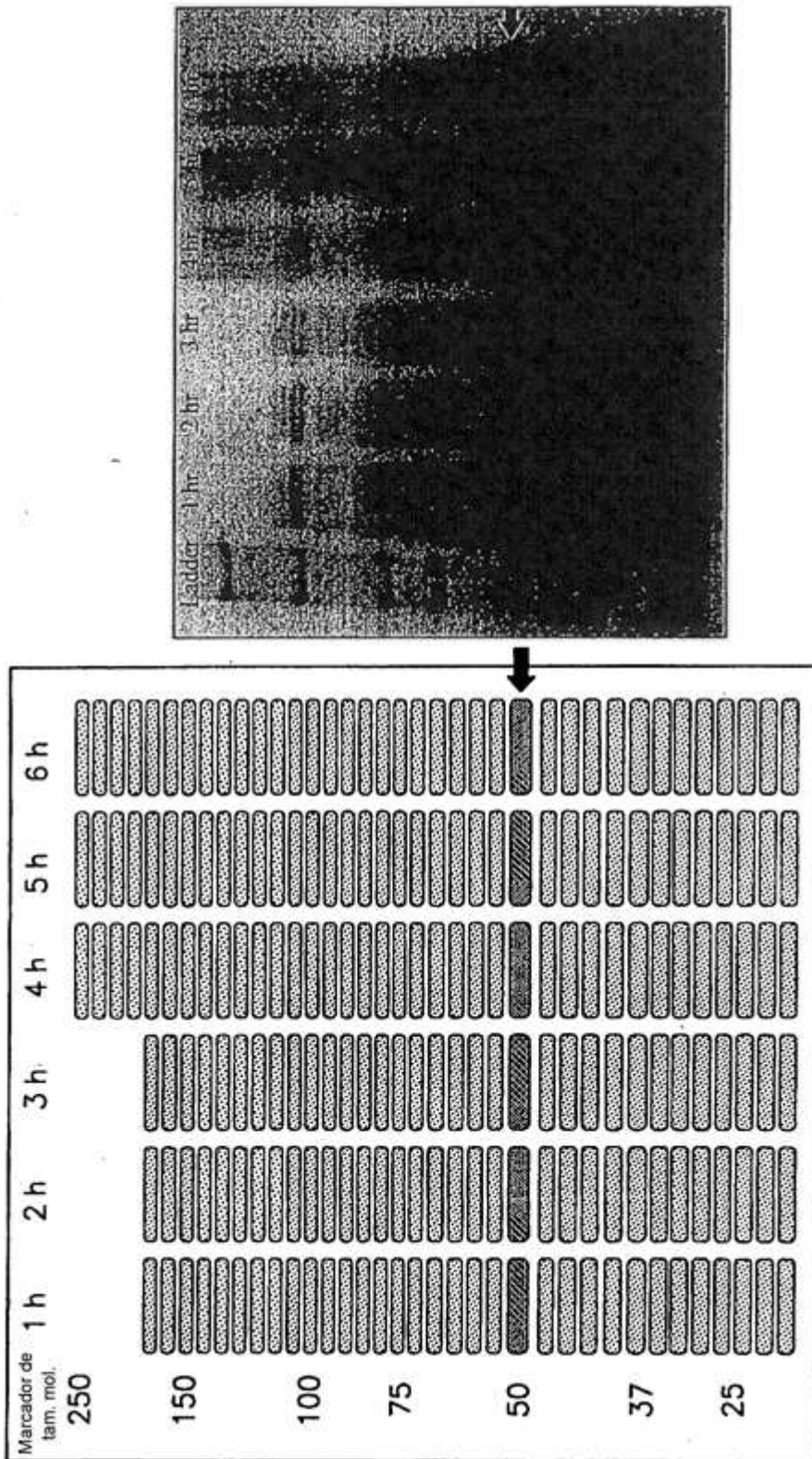


FIG-12

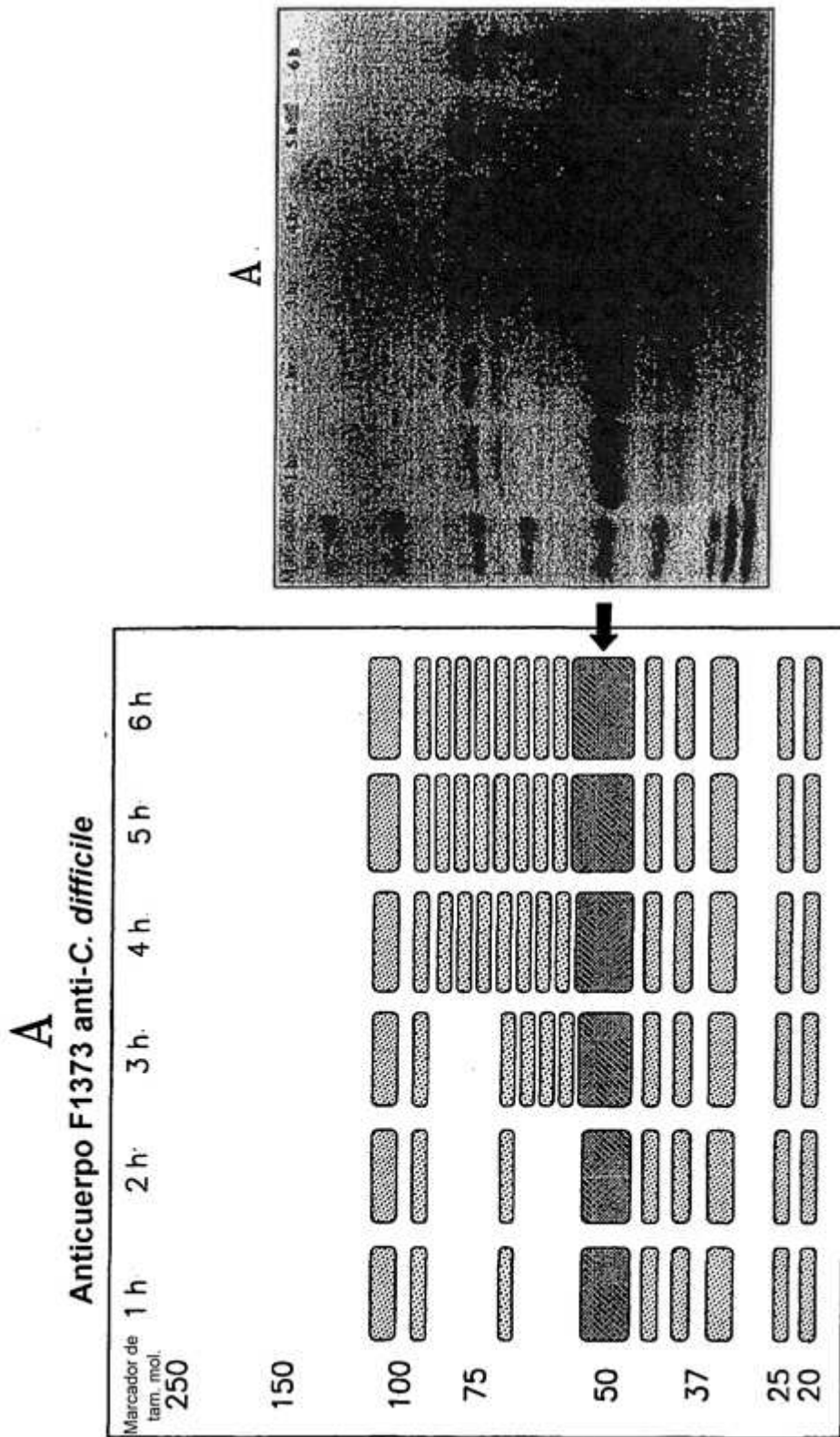


FIG-13

B

Anticuerpo anti-His

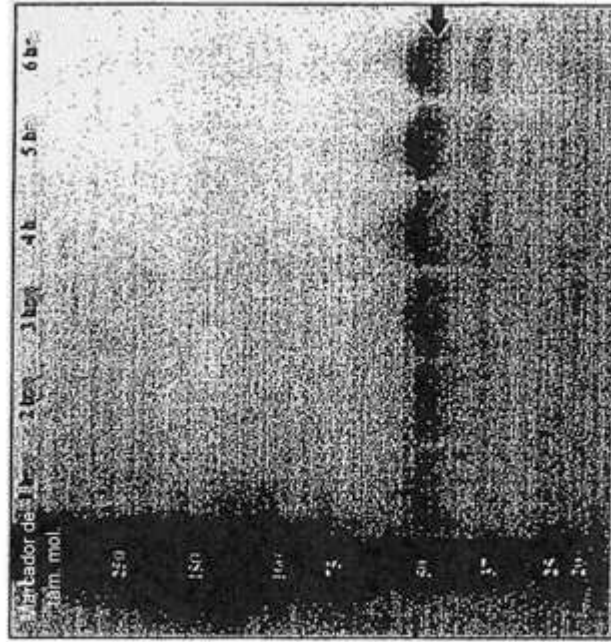
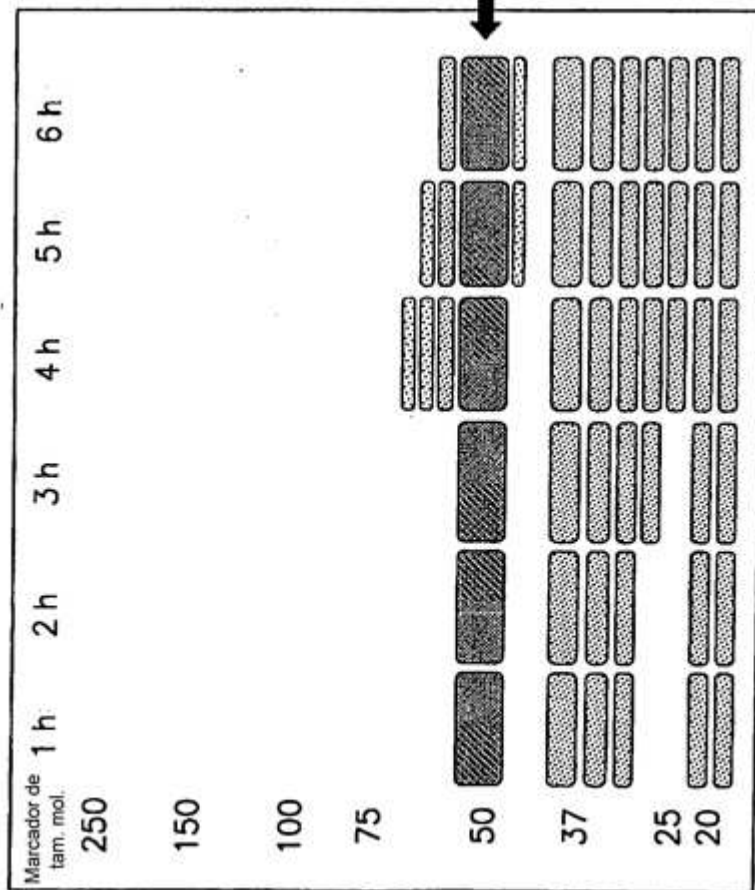


FIG-13
(continuación)

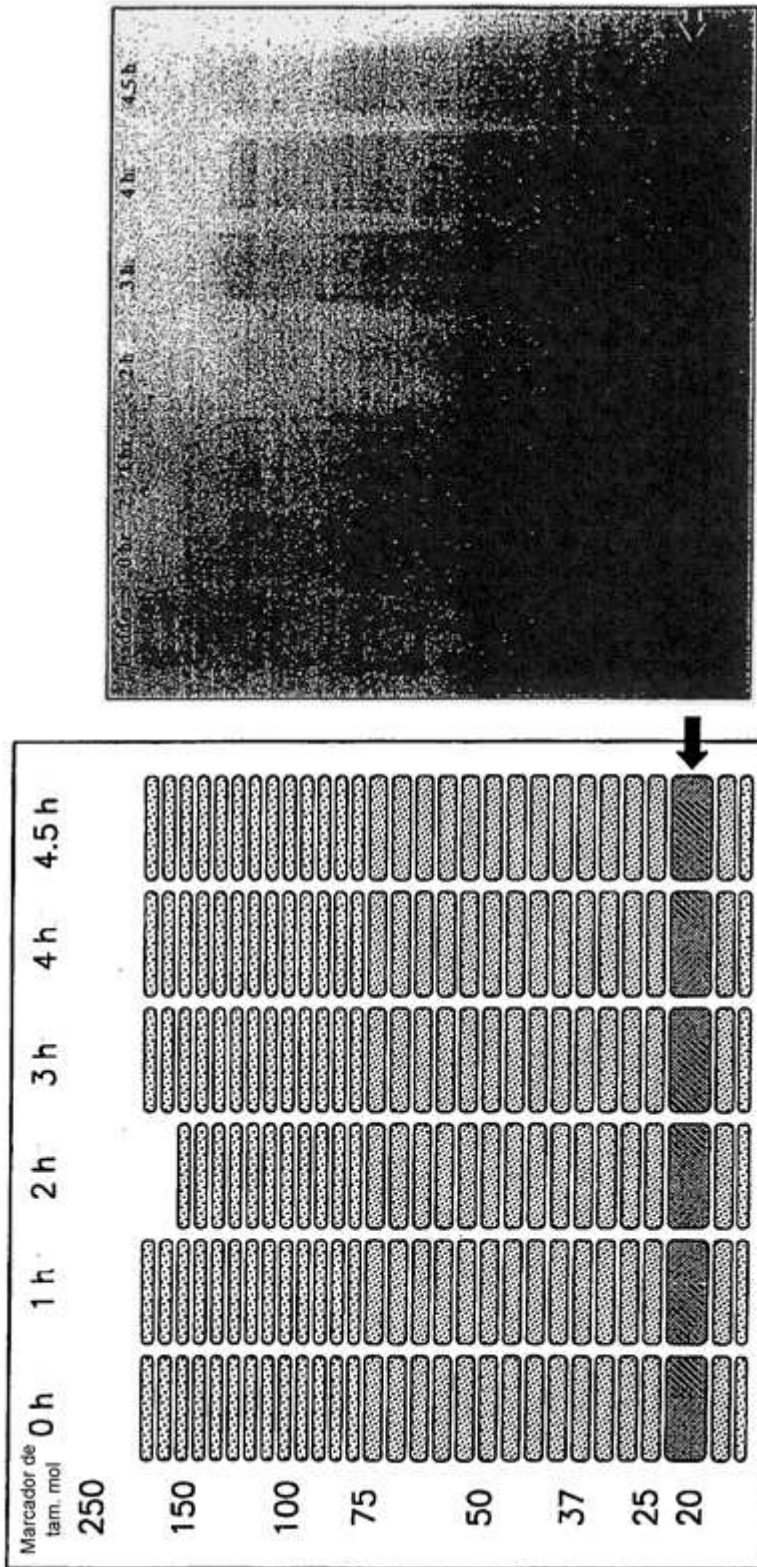


FIG-14

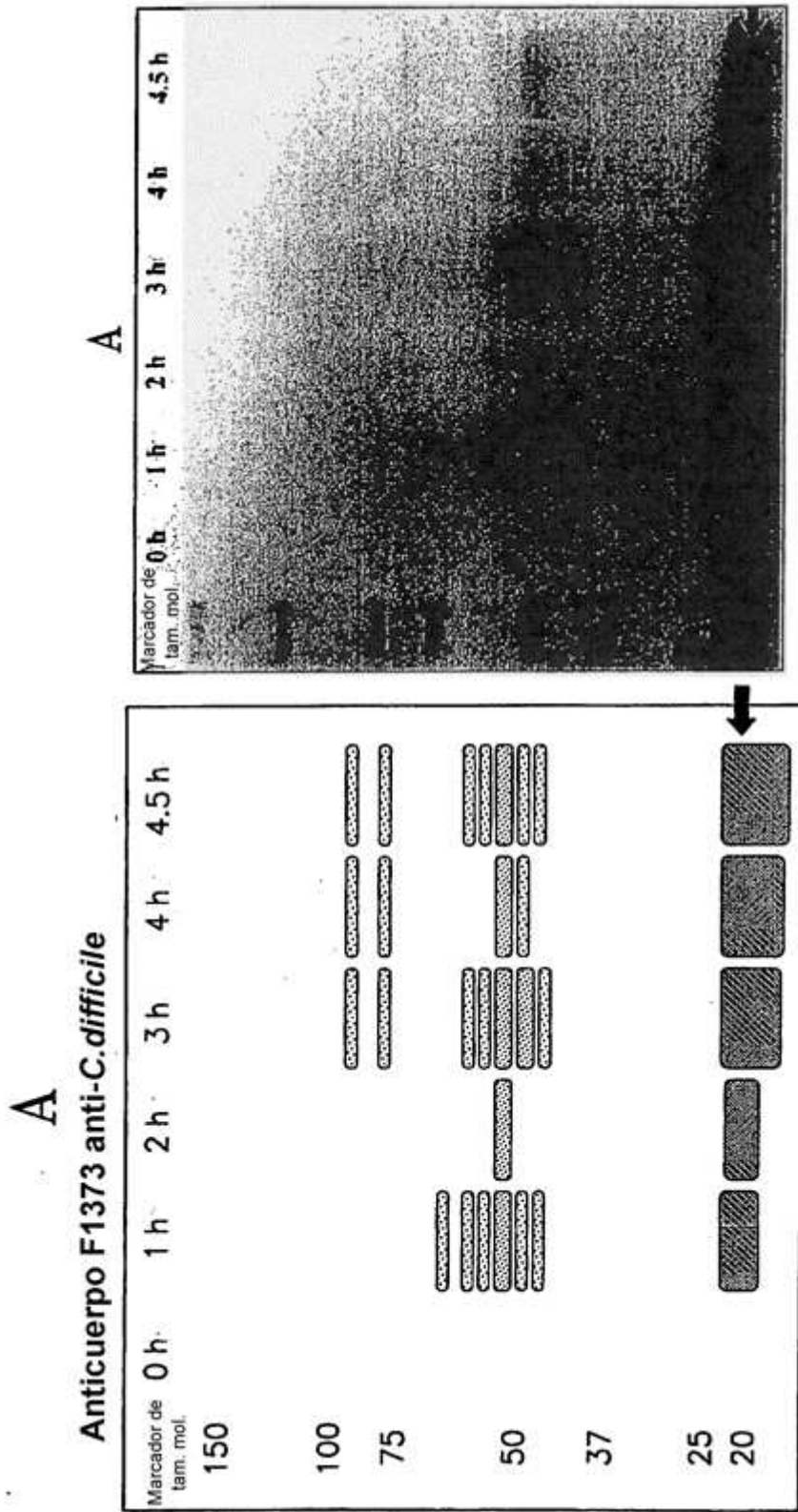


FIG-15

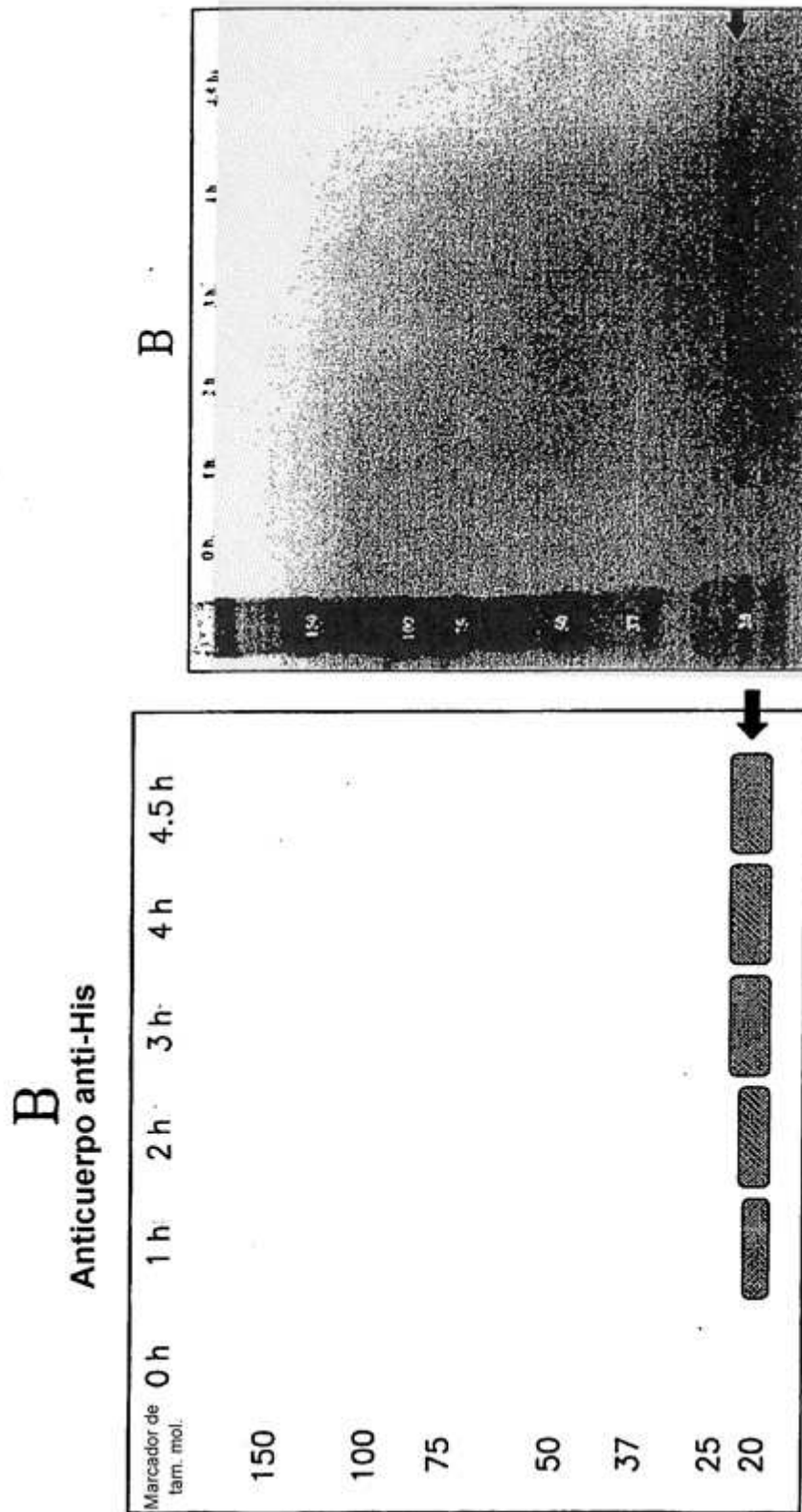


FIG-15
 (continuación)

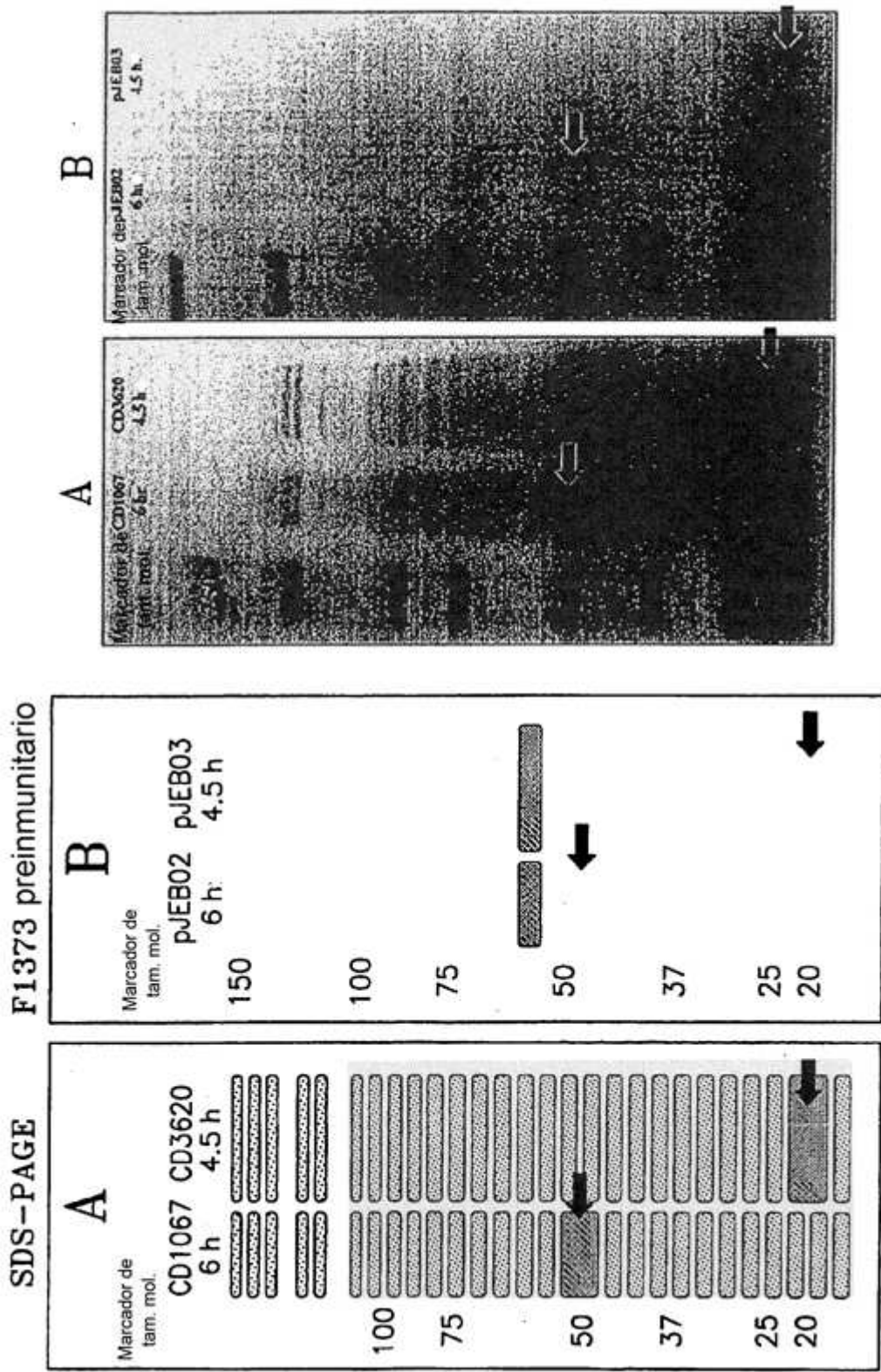


FIG-16

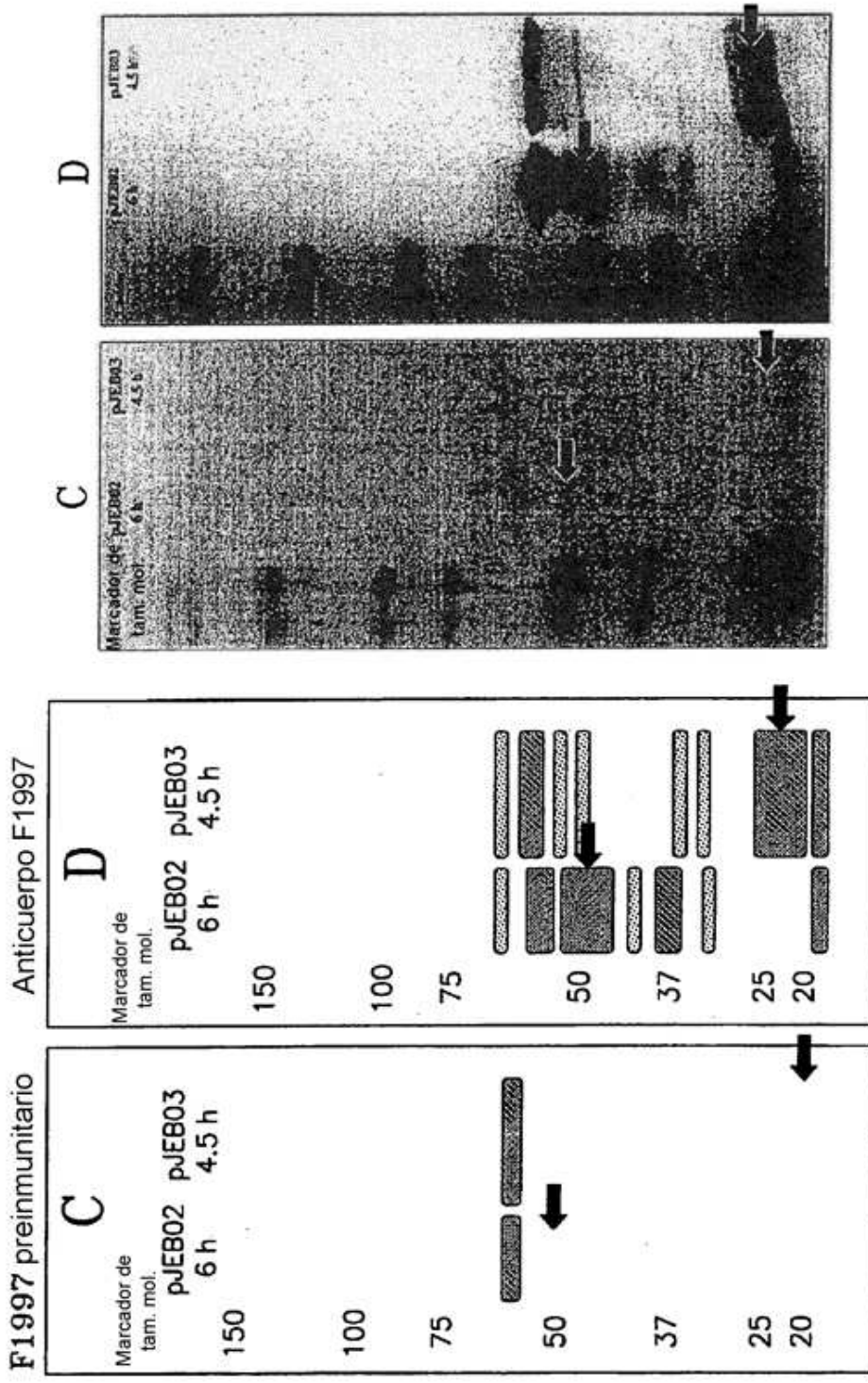


FIG-16
(continuación)

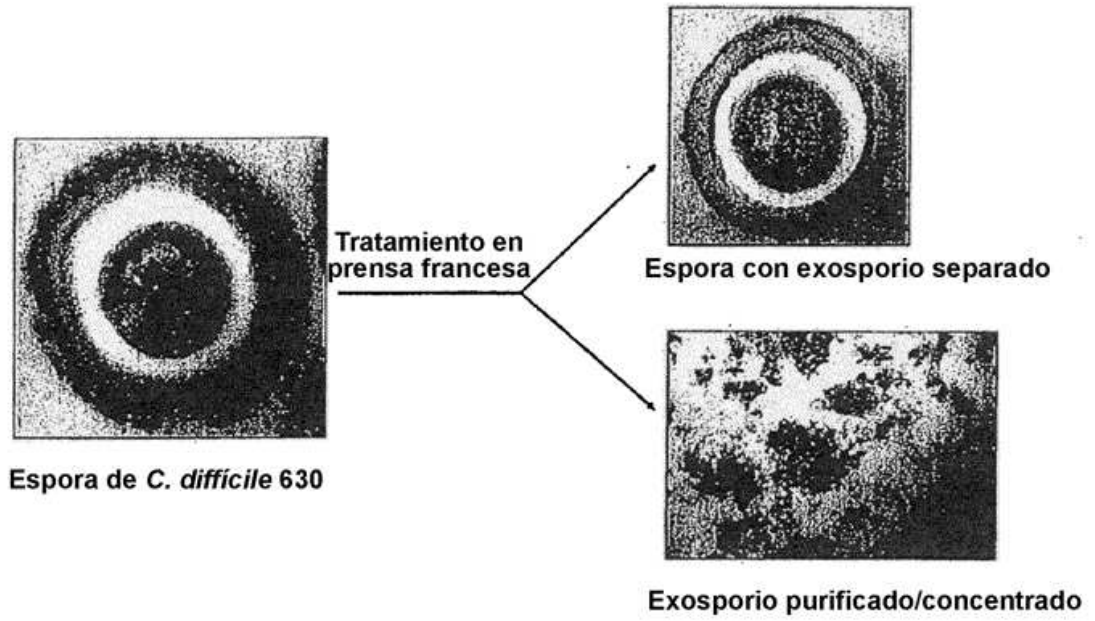
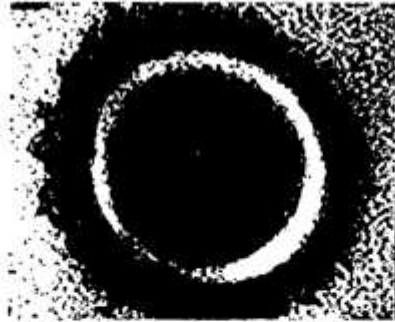


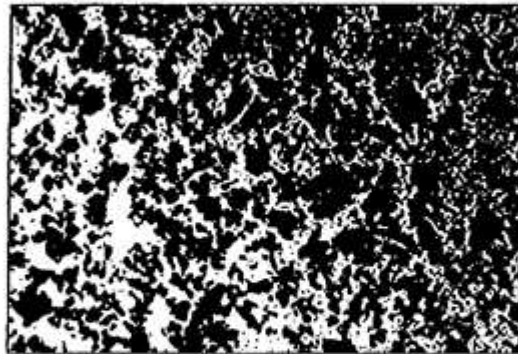
FIGURA 17



A. Espora de *C. difficile* 630



B. Espora de *C. difficile* 630, exosporio separado



C. Exosporio purificado y concentrado

FIGURA 18