

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 737**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2012 PCT/EP2012/059805**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO2012163817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12726374 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2714911**

54 Título: **Composición inmunogénica**

30 Prioridad:

27.05.2011 US 201161490707 P

27.05.2011 US 201161490734 P

27.05.2011 US 201161490716 P

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

08.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CASTADO, CINDY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 615 737 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a antígenos de *Clostridium difficile*. En particular, la invención se refiere a antígenos de proteínas recombinantes que comprenden fragmentos de toxina A y/o toxina B. La invención se refiere adicionalmente a composiciones inmunogénicas o vacunas que comprenden estos antígenos y al uso de las vacunas y composiciones inmunogénicas de la invención en profilaxis o terapia. La invención se refiere también a procedimientos de inmunización utilizando las composiciones de la invención, y al uso de las composiciones de la invención en la fabricación de un medicamento.

Antecedentes de la invención

10 *C. difficile* es la causa más importante de infecciones intestinales nosocomiales y es la principal causa de colitis pseudomembranosa en seres humanos (Bartlett y col Am. J. Clin. Nutr. 11 suppl: 2521-6 (1980)). La tasa de mortalidad general asociada a los individuos infectados con *C. difficile* se calculó en un 5,99 % en los 3 meses posteriores al diagnóstico, con una mayor mortalidad asociada con la edad avanzada, siendo el 13,5 % en los
15 pacientes mayores de 80 años (Karas y col Journal of Infection 561:1-9 (2010)). El tratamiento actual para la infección por *C. difficile* es el suministro de antibióticos (metronidazol y vancomicina), sin embargo, ha habido pruebas de cepas resistentes a estos antibióticos (Shah y col., Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8(5), 555-564 (2010)). Por consiguiente, existe una necesidad de composiciones inmunogénicas capaces de inducir anticuerpos, y/o una respuesta inmunoprotectora contra *C. difficile*.

Sumario de la invención

20 La enterotoxicidad de *C. difficile* se debe principalmente a la acción de dos toxinas, la toxina A y la toxina B. Ambas son potentes citotoxinas (Lyerly y col Current Microbiology 21:29-32 (1990)). Los dominios C terminal de la toxina A y de la toxina B comprenden unidades de repetición, por ejemplo el dominio C terminal de la toxina A está constituido por unidades de repetición contiguas (Dove y col Infect. Immun. 58:480-499 (1990)), por esta razón el dominio C
25 terminal puede denominarse "dominio de repetición". Además estas porciones de repetición se pueden separar en repeticiones cortas (RC) y repeticiones largas (RL) como se describe en Ho y col (PNAS 102:18373-18378 (2005)).

Se ha determinado la estructura de un fragmento de 127aa desde el dominio de repetición C terminal de la toxina A (Ho y col PNAS 102:18373-18378 (2005)). Este fragmento forma un pliegue semejante a un solenoide β , compuesto predominantemente por láminas β con una proporción baja de hélices α .

30 Se ha demostrado que fragmentos de toxina A, en particular fragmentos del dominio C terminal, pueden conducir a una respuesta inmunoprotectora en hámsteres (Lyerly y col Current Microbiology 21:29-32 (1990)) y documentos WO96/12802 y WO00/61762.

35 Se sabe que en el diseño de proteínas de fusión es difícil que estas proteínas se plieguen correctamente durante la expresión. Los polipéptidos de la presente invención son proteínas de fusión en las que se mantiene la estructura similar a un solenoide β nativo, y que se observa que proporcionan una respuesta inmunitaria contra la toxina A y la toxina B en ratones.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en el que

- 40 (i) el primer fragmento es un fragmento de dominio de repetición de la toxina A;
(ii) el segundo fragmento es un fragmento de dominio de repetición de la toxina B;
(iii) el primer fragmento tiene un primer extremo proximal;
(iv) el segundo fragmento tiene un segundo extremo proximal; y

45 en el que el primer fragmento y el segundo fragmento están separados por menos de, o exactamente, 5 aminoácidos en la estructura primaria, en el que el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan tanto la toxina A como la toxina B, en el que el primer extremo proximal está dentro de una repetición corta, el segundo extremo proximal está dentro de una repetición corta y el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal no interrumpen las porciones de repetición corta - repetición larga - repetición corta.

En un segundo aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención.

50 En un tercer aspecto de la invención se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de la invención unido a un promotor inducible.

En un cuarto aspecto de la invención se proporciona una célula huésped que comprende un vector de la invención o un polinucleótido de la invención.

En un quinto aspecto de la invención se proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un sexto aspecto de la invención se proporciona una vacuna que comprende una composición inmunogénica de la invención.

- 5 En un séptimo aspecto de la invención se proporciona un uso de una composición inmunogénica de la invención o una vacuna de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad provocada por *C. difficile*.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - Listados de secuencias de polipéptidos de la invención.

- 10 Figura 2 - Representación gráfica de los dominios C terminal de ToxA y ToxB, con las repeticiones cortas, RC, representadas como casillas blancas y las repeticiones largas, RL, representadas como casillas negras.

Figura 3 - Representación gráfica de una unión entre la tercera RC VIII de ToxA y la cuarta RC II de Tox B utilizada en la Fusión 1.

Figura 4 - Representación gráfica de una unión entre la segunda RC VIII de ToxA y la tercera RC II de Tox B utilizada en la Fusión 2.

- 15 Figura 5 - Representación gráfica de una unión entre la RL VII de ToxA y la RL II de ToxB utilizada en la Fusión 3 (que contiene sólo parte de la RL VII de ToxA y parte de la RL II de ToxB).

Figura 6 - Representación gráfica de una unión entre la segunda RC VIII de ToxA y la tercera RC I de ToxB utilizada en la Fusión 4.

- 20 Figura 7 - Representación gráfica de una unión que comprende un enlazador de glicina entre el último resto de la secuencia de la proteína ToxA y el comienzo de la cuarta RC II de ToxB utilizado en la Fusión 5.

Figura 8 - Gráficos que describen la distribución de las fusiones 1-5 de ToxA-ToxB de *C. difficile*, como se determina por ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación. El panel a) describe la distribución de la Fusión 1, el panel b) describe la distribución de la Fusión 2, el panel c) describe la distribución de la Fusión 3, el panel d) describe la distribución de la Fusión 4 y el panel e) describe la distribución de la Fusión 5.

- 25 Figura 9 - Gráfico que describe el espectro UV lejano de las Fusiones 2, 3, 4 y 5, medido usando dicroísmo circular. El espectro para la Fusión 2 está representado por una línea con los puntos en forma de cuadrado pequeño, el espectro para la Fusión 3 está representado por una línea con los puntos en forma de diamante pequeño, el espectro para la Fusión 4 está representado por una línea con los puntos en forma de círculo y el espectro para la Fusión 5 está representado por una línea con los puntos en forma de cruz.

- 30 Figura 10 - Gráfico que describe el espectro UV cercano de las Fusiones 2, 3, 4 y 5, medido usando dicroísmo circular. El espectro para la Fusión 2 está representado por una línea con los puntos en forma de cruz, el espectro para la Fusión 3 está representado por una línea con los puntos en forma de círculo, el espectro para la Fusión 4 está representado por una línea con los puntos en forma de triángulo y el espectro para la Fusión 5 está representado por una línea con los puntos en forma de diamante pequeño.

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

- 40 Figura 12 - Gráfico que muestra la inhibición de la hemaglutinación en ratones inmunizados con un fragmento del extremo C de la toxina A (aa 2387-2706), con un fragmento del extremo C de la toxina B (aa 1750-2360), o con las fusiones 1, 2, 3, 4 o 5.

Figura 13 - Gráfico que muestra la inmunogenicidad anti-ToxB en ratones inmunizados con un fragmento del extremo C de la toxina A (aa 2387-2706), con un fragmento del extremo C de la toxina B (aa 1750-2360), o con las fusiones 1, 2, 3, 4 o 5.

- 45 Figura 14 - Títulos de inhibición de la citotoxicidad de ratones inmunizados con un fragmento del extremo C de la toxina A (aa 2387-2706), con un fragmento del extremo C de la toxina B (aa 1750-2360), o con las fusiones 1, 2, 3, 4 o 5.

- 50 Figura 15 - Gráficos que describen la distribución de las fusiones de *C. difficile* ToxA-ToxB F52New, F54Gly, F54New y F5ToxB, según lo determinado por ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación. El panel a) describe la distribución de F52New, el panel b) describe la distribución de F54Gly, el panel c) describe la distribución de F54New y el panel d) describe la distribución de F5ToxB.

Figura16 - Gráfico que describe el espectro UV lejano de las fusiones F52New, F54Gly, F54New y F5ToxB, medido usando dicroísmo circular. El espectro para F52New está representado por una línea con los puntos en forma de cruz doble, el espectro para F54Gly está representado por una línea con los puntos en forma de triángulo, el espectro para F54New está representado por una línea con los puntos en forma de cuadrado y el espectro para F5ToxB está representado por una línea con los puntos en forma de cruz.

Figura 17 - Gráfico que describe el espectro UV cercano de las fusiones F52New, F54Gly, F54New y F5ToxB, medido utilizando dicroísmo circular. El espectro para F52New está representado por una línea con los puntos en forma de cruz doble, el espectro para F54Gly está representado por una línea con los puntos en forma de triángulo, el de F54New está representado por una línea con los puntos en forma de cuadrado y el espectro para F5ToxB está representado por una línea con los puntos en forma de cruz.

Figura 18 - Gráfico que muestra los resultados de ELISA anti-ToxA para ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, G54New o F5ToxB.

Figura 19 - Gráfico que muestra los resultados de ELISA anti-ToxB para ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB.

Figura 20 - Gráfico que muestra la inhibición de la hemaglutinación de ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB.

Figura21 - Gráfico que muestra los títulos de citotoxicidad en células HT29 de ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB.

Figura22 - Gráfico que muestra los títulos de citotoxicidad en células IMR90 de ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB.

Descripción detallada

POLIPÉPTIDOS

La invención se refiere a un polipéptido que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en el que

- (i) el primer fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina A;
- (ii) el segundo fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina B;
- (iii) el primer fragmento tiene un primer extremo proximal;
- (iv) el segundo fragmento tiene un segundo extremo proximal; y

en el que el primer fragmento y el segundo fragmento están separados por menos de, o exactamente, 5 aminoácidos en la estructura primaria, en el que el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan tanto la toxina A como la toxina B, en el que el primer extremo proximal está dentro de una repetición corta, el segundo extremo proximal está dentro de una repetición corta y el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal no interrumpen las porciones de repetición corta - repetición larga - repetición corta.

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

La expresión "dominio de repetición de toxina A" se refiere al dominio C terminal de la proteína de la toxina A de *C. difficile*, que comprende secuencias de repetición. Este dominio se refiere a los aminoácidos 1832-2710 de la toxina A de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y sus equivalentes en una cepa diferente, la secuencia de los aminoácidos 1832-2710 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) corresponde a los aminoácidos 1832-2710 de SEQ ID N° 1.

La expresión "dominio de repetición de toxina B" se refiere al dominio C terminal de la proteína de la toxina B de *C. difficile*. Este dominio se refiere a los aminoácidos 1834-2366 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y sus equivalentes en una cepa diferente, la secuencia de los aminoácidos 1834-2366 de la cepa VPI10463 (ATCC43255) corresponde a los aminoácidos 1834-2366 de SEQ ID N° 2.

Las toxinas A y B de *C. difficile* son proteínas conservadas, sin embargo la secuencia difiere de una pequeña cantidad entre las cepas, además la secuencia de aminoácidos para las toxinas A y B en diferentes cepas puede diferir en cuando al número de aminoácidos.

Por lo tanto, en la invención, la expresión dominio de repetición de la toxina A y/o dominio de repetición de la toxina B, se refiere a una secuencia que es una variante con una identidad de secuencia de 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % en los aminoácidos 1832-2710 de SEQ ID N° 1 o una variante con una identidad de secuencia de 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % en los aminoácidos 1834-2366 de SEQ ID N° 2. En una realización, una "variante" es un polipéptido que varía de los polipéptidos referentes por sustituciones conservativas de aminoácidos, por lo que un resto se sustituye por otro con las mismas propiedades fisicoquímicas. Típicamente, tales sustituciones están entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los restos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln, y entre los restos básicos Lys y Arg; o los restos aromáticos Phe y Tyr. En una realización, un "fragmento" es un polipéptido que comprende una porción contigua de al menos 250 aminoácidos de un polipéptido.

- Además, la numeración de los aminoácidos puede diferir entre los dominios C terminal de la toxina A (o toxina B) de una cepa y de la toxina A (o toxina B) de otra cepa. Por esta razón, la expresión "equivalentes en una cepa diferente" se refiere a aminoácidos que corresponden a los de una cepa de referencia (por ejemplo, *C. difficile* VP110463), pero que se encuentran en una toxina de una cepa diferente y que pueden por lo tanto estar numerados de manera diferente. Una región de aminoácidos 'equivalentes' se puede determinar alineando las secuencias de las toxinas de las diferentes cepas. Los números de aminoácidos proporcionados en su totalidad se refieren a los de la cepa VP110463.
- El término 'fragmento' de un polipéptido o proteína se refiere a una porción contigua de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos de ese polipéptido o proteína. La expresión "primer fragmento" se refiere a una porción contigua de al menos 100, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos del dominio de repetición de la toxina A. La expresión "segundo fragmento" se refiere a una porción contigua de al menos 100, 200, 230, 250, 280, 300, 350, 400, 450 o 500 aminoácidos del dominio de repetición de la toxina B.
- La expresión "primer extremo proximal" se refiere al extremo del primer fragmento (fragmento ToxA) que está unido covalentemente al segundo fragmento (fragmento ToxB) o unido covalentemente a una secuencia enlazadora entre el primer y segundo fragmento y está más próximo al segundo fragmento en la estructura primaria. La expresión "segundo extremo proximal" se refiere al extremo del segundo fragmento que está unido covalentemente al primer fragmento (fragmento ToxA) o unido covalentemente a una secuencia enlazadora entre el primer y segundo fragmento y está más próximo al primer fragmento en la estructura primaria.
- El polipéptido puede ser parte de una proteína más grande tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias que ayuden en la purificación, tales como restos múltiples de histidina, o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante. Además, también se contempla la adición de secuencias polipeptídicas exógenas o colas lipídicas o polinucleotídicas para aumentar el potencial inmunogénico de la molécula final.
- Los fragmentos pueden estar situados de tal manera que el extremo N del primer fragmento sea adyacente al extremo C del segundo fragmento, como alternativa, el extremo C del primer fragmento puede ser adyacente al extremo N del segundo fragmento, o el extremo C del primer fragmento puede ser adyacente al extremo C del segundo fragmento, o el extremo N del primer fragmento puede ser adyacente al extremo N del segundo fragmento.
- La palabra "adyacente" significa separada por menos de, o exactamente, 5, 2, 1 o 0 aminoácidos en la estructura primaria.
- El polipéptido de la invención provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A o la toxina B o ambas. En una realización, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A. En una realización adicional, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina B. En una realización adicional, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A y la toxina B.
- Se puede medir si un polipéptido provoca anticuerpos contra una toxina inmunizando ratones con una composición inmunogénica que comprenda el polipéptido, recogiendo sueros y analizando los títulos anti-toxina de los sueros usando ELISA. Los sueros deben compararse con una muestra de referencia obtenida de ratones que no se han inmunizado. Un ejemplo de esta técnica se puede encontrar en el ejemplo 6. El polipéptido de la invención provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A si el suero contra el polipéptido da una lectura en ensayo ELISA de 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más alta que la de la muestra de referencia.
- En una realización adicional, el polipéptido de la invención provoca una respuesta inmunoprotectora en un huésped mamífero contra cepas de *C. difficile*. En una realización, el huésped mamífero se selecciona del grupo que consiste en ratón, conejo, cobaya, primate no humano, mono y ser humano. En una realización, el huésped mamífero es un ratón. En una realización adicional, el huésped mamífero es un ser humano.
- La determinación de si un polipéptido provoca una respuesta inmunoprotectora en un huésped mamífero contra cepas de *C. difficile* se puede determinar usando un ensayo de exposición. En dicho ensayo, el huésped mamífero se vacuna con el polipéptido y expone a *C. difficile*, el tiempo que el mamífero sobrevive después de la exposición se compara con el tiempo que sobrevive un mamífero de referencia que no ha sido inmunizado con el polipéptido. Un polipéptido provoca una respuesta inmunoprotectora si un mamífero inmunizado con el polipéptido sobrevive al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 80 %, 80 %, 90 % o 100 % más que un mamífero de referencia que no ha sido inmunizado después de la exposición a *C. difficile*.
- La estructura nativa de los dominios C terminal de las toxinas A y B consta de una estructura alargada de tipo β -solenoides. Esta estructura consta principalmente de estructuras β laminares, con una minoría de estructuras α helicoidales como se observa en Ho y col (PNAS 102:18373-18378 (2005)). Las estructuras secundarias presentes se pueden determinar usando difracción circular. Por ejemplo, midiendo la forma y la magnitud de los espectros de DC en la región UV lejana (190-250 nm) y comparando los resultados con los de estructuras conocidas. Esto puede llevarse a cabo usando una trayectoria óptica de 0,01 cm de 178 a 250 nm, con una resolución de 1 nm y un ancho de banda en un espectropolarímetro Jasco J-720, por ejemplo como se observa más adelante en el ejemplo 5.

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

En una realización, el primer fragmento comprende una estructura beta laminar superior al 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 33 %, 35 %, 38 %, 40 % o 42 %. En una realización, el segundo fragmento comprende una estructura beta laminar superior al 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 33 %, 35 %, 38 %, 40 % o 42 %. En una realización adicional, tanto el primer fragmento como el segundo fragmento comprenden una estructura beta laminar superior al 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 33 %, 35 %, 38 %, 40 % o 42 %.

La Figura 2 representa la organización de los dominios C terminal de ToxA y ToxB. El dominio C terminal de la toxina A está constituido por 8 porciones de repetición (denominadas porción de repetición I, porción de repetición II, porción de repetición III, porción de repetición IV, porción de repetición V, porción de repetición VI, porción de repetición VII y porción de repetición VIII) pudiendo dividirse además, cada una de estas porciones de repetición, en repeticiones cortas (RC) que se representan como casillas blancas en la figura 2 y en repeticiones largas (RL) que se representan como casillas negras en la figura 2 (excepto para la porción de repetición VIII de ToxA que no tiene una repetición larga). Cada una de las repeticiones largas tiene cierta similitud estructural y de secuencia con las otras repeticiones largas. De manera similar, las repeticiones cortas tienen cierta similitud estructural y de secuencia entre sí. El dominio C terminal de la toxina B está constituido por 5 porciones de repetición subdivididas en RC y RL. Cada porción de repetición contiene una RL y entre 2 y 5 RC (excepto para la porción de repetición V de ToxB que no tiene una repetición larga). Para los fines de la divulgación, la frase 'una porción de repetición' se refiere a una de las ocho porciones de repetición de ToxA (denominadas I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII) o a una de las cinco porciones de repetición de ToxB (denominadas I, II, III, IV o VI). Como se usa en la presente memoria, la expresión 'primera porción de repetición' se refiere a una porción de repetición (o porción de repetición parcial) del dominio de repetición de la toxina A. La expresión 'segunda porción de repetición' se refiere a una porción de repetición (o porción de repetición parcial) del dominio de repetición de la toxina B. Para los fines de la divulgación, la expresión 'repetición larga' se refiere a uno de los dominios RL representados como casillas negras en la Figura 2. Para los fines de la divulgación, la expresión 'repetición corta' se refiere a uno de los dominios RC representados como casillas blancas en la Figura 2.

Así, por ejemplo, la porción de repetición I de ToxA contiene tres RC y una RL, que pueden recibir el nombre de la primera RCI de ToxA, la segunda RCI de ToxA, la tercera RCI de ToxA y la RLI de ToxA, respectivamente.

El primer extremo proximal se considera que está dentro de una 'porción de repetición' si el primer fragmento termina en un aminoácido que está dentro de esa porción de repetición (es decir, el primer extremo proximal contiene sólo parte de la secuencia de la porción de repetición). De manera similar, se considera que el segundo extremo proximal está dentro de una 'porción de repetición' si el segundo fragmento termina en un aminoácido que está dentro de esa porción de repetición. Por ejemplo, el primer extremo proximal está dentro de 'una porción de repetición I de ToxA' si el primer fragmento termina con uno cualquiera de los aminoácidos 1832-1924 (incluidos) de VPI10463 o su equivalente en otra cepa. El primer extremo proximal no está dentro de una porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta si el primer fragmento termina con un aminoácido que no está dentro de esa porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta.

Las posiciones de aminoácidos de cada dominio se han definido para la toxina A y la toxina B de la cepa VPI10463 (ATCC43255). Estas posiciones son las siguientes

Tabla 1

Nombre		Posición inicial	Posición final
ToxA_I	RC1	1832	1852
	RC2	1853	1873
	RC3	1874	1893
	RL	1894	1924
ToxA_II	RC1	1925	1944
	RC2	1945	1965
	RC3	1966	1986
	RC4	1987	2007
	RC5	2008	2027
	RL	2028	2058

ES 2 615 737 T3

(continuación)

Nombre		Posición inicial	Posición final
ToxA_III	RC1	2059	2078
	RC2	2079	2099
	RC3	2100	2120
	RC4	2121	2141
	RC5	2142	2161
	RL	2162	2192
TOGA_II	RC1	2193	2212
	RC2	2213	2233
	RC3	2234	2253
	RC4	2254	2275
	RL	2276	2306
ToxA_V	RC1	2307	2326
	RC2	2327	2347
	RC3	2348	2368
	RC4	2369	2389
	RC5	2390	2409
	RL	2410	2440
ToxA_VI	RC1	2441	2460
	RC2	2461	2481
	RC3	2482	2502
	RC4	2503	2522
	RL	2523	2553
ToxA_VII	RC1	2554	2573
	RC2	2574	2594
	RC3	2595	2613
	RL	2614	2644
ToxA_VIII	RC1	2645	2664
	RC2	2665	2686
	RC3	2687	2710
ToxB_I	RC1	1834	1854
	RC2	1855	1876
	RC3	1877	1896
	RL	1897	1926
ToxB_II	RC1	1927	1946
	RC2	1947	1967
	RC3	1968	1987
	RC4	1988	2007
	RC5	2008	2027
	RL	2028	2057
ToxB_III	RC1	2058	2078

(continuación)

	Nombre	Posición inicial	Posición final
	RC2	2079	2099
	RC3	2100	2119
	RC4	2120	2139
	RC5	2140	2159
	RL	2160	2189
ToxB_IV	RC1	2190	2212
	RC2	2213	2233
	RC3	2234	2253
	RC4	2254	2273
	RC5	2274	2293
	RL	2294	2323
ToxB_V	RC1	2324	2343
	RC2	2344	2366

Por esta razón, la expresión 'porción de repetición' puede referirse a los aminoácidos 1832-1924, 1925-2058, 2059-2192, 2193-2306, 2307-2440, 2441-2553, 2554-2644 o 2645-2710 de la toxina A (SEQ ID N° 1), o a los aminoácidos 1834-1926, 1927-2057, 2058-2189, 2190-2323 o 2324-2366 de la toxina B (SEQ ID N° 2) o a sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*.

Por esta razón, la expresión 'repetición corta' puede referirse a los aminoácidos 1832-1852, 1853-1873, 1874-1893, 1925-1944, 1945-1965, 1966-1986, 1987-2007, 2008-2027, 2059-2078, 2079-2099, 2100 - 2120, 2121 - 2141, 2142 - 2161, 2193 - 2212, 2213 - 2233, 2234 - 2253, 2254 - 2275, 2307-2326, 2327-2347, 2348-2368, 2369-2389, 2390-2409, 2441-2460, 2461-2481, 2482-2502, 2503-2522, 2554-2573, 2574-2594, 2595-2613, 2645-2664, 2665-2686 o 2687-2710 de la toxina A (SEQ ID N° 1) o a los aminoácidos 1834-1854, 1855-1876, 1877-1896, 1927-1946, 1947-1967, 1968-1987, 1988-2007, 2008-2027, 2058-2078, 2079-2099, 2100-2119, 2120-2139, 2140 - 2159, 2190 - 2212, 2213 - 2233, 2234 - 2253, 2254 - 2277, 2274 - 2293, 2324 - 2334 o 2344 - 2336 de la toxina B (SEQ ID N° 2) o a sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*.

De manera similar, la expresión 'repetición larga' puede referirse a los aminoácidos 1894-1924, 2028-2058, 2162-2192, 2276-2306, 2410-2440, 2523-2553 o 2614-2644 de la toxina A (SEQ ID N° 1) o a los aminoácidos 1897-1926, 2028-2057, 2160-2189 o 2294-2323 de la toxina B (SEQ ID N° 2) o a sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*.

De manera similar, la expresión 'porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta' puede referirse a los aminoácidos 1874-1944, 2008-2078, 2142-2212, 2254-2326, 2390-2460, 2503-2573 o 2595-2664 de la toxina A (SEQ ID N° 1) o a los aminoácidos 1877-1946, 2008-2078, 2140-2212 o 2274-2334 de la toxina B (SEQ ID N° 2) o a sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*. La expresión 'no interrumpe una porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta' significa que el extremo proximal está en una región que no interrumpe la estructura de la porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta, en general esto significa que el extremo proximal no está dentro de una repetición larga y no está dentro de las repeticiones cortas que constituyen una porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta, excepto que el extremo proximal puede estar en la región de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos de la repetición corta que está más alejada de la repetición larga en la secuencia. En una realización, la expresión 'no interrumpe una porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta' significa que el extremo proximal no está dentro de la porción de repetición corta - repetición larga - repetición corta.

En una realización, el primer extremo proximal no está dentro de los aminoácidos 1878-1940, 2146-2208, 2012-2074, 2258-2322, 2394-2456, 2507-2569, 2599-2660 o 2593-2660 de la toxina A (SEQ ID NO : 1) o sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*. En una segunda realización, el segundo extremo proximal no está dentro de los aminoácidos 1881-1942, 2012-2074, 2144-2208 o 2278-2339 de la toxina B (SEQ ID N° 2) o sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*. En una realización adicional, el primer extremo proximal no está dentro de los aminoácidos 1878-1940, 2146-2208, 2012-2074, 2258-2322, 2394-2456, 2507-2569, 2599-2660 o 2593-2660 de la toxina A (SEQ ID N° 1) o sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile* y el segundo extremo proximal no está dentro de los aminoácidos 1881-1942, 2012-2074, 2144-2208 o 2278-2339 de la toxina B (SEQ ID N° 2) o sus equivalentes en una cepa diferente de *C. difficile*.

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición V (aminoácidos 2307-2440 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente), VI (aminoácidos 2441-2553 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente), VII (aminoácidos 2554-2644 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) o VIII (aminoácidos 2645-2710 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A. En una realización adicional, el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VII (aminoácidos 2554-2644 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A. En una realización adicional el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A.

En una realización, el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834-1926 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente), II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente), o III (aminoácidos 2058-2189 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional, el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834-1926 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B.

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834 - 1926 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710 de SEQ ID N° 1), o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VII (aminoácidos 2554-2644 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834-1926 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional, el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VII (aminoácidos 2554-2644 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VI de los aminoácidos 2441-2553 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834-1926 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una ulterior realización, el primer extremo proximal está dentro de la porción VI de los aminoácidos 2441-2553 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una realización adicional, el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición V (aminoácidos 2307-2440 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está en una porción de repetición I (aminoácidos 1834-1926 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B. En una ulterior realización el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición V (aminoácidos 2307-2440 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927-2057 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente) de la toxina B.

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2690-2710, 2695-2710, o 2700-2710 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización adicional, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2670-2700, 2675-2695, o 2680-2690 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización, el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1860-1878 de la toxina B o sus equivalentes en una cepa diferente. En una realización, el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1950-1980, 1955-1975 o 1960-1970 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización adicional, el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1978-2008, 1983-2003 o 1988-1998 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización adicional, el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1860-1878, 1854-1876, 1857-1887, 1862-1882 o 1867-1877 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente.

En una realización, el primer fragmento consiste en un dominio de repetición completo de la toxina A (aminoácidos 1832 - 2710). En una realización, el segundo fragmento consiste en un dominio de repetición completo de la toxina B (aminoácidos 1833-2366).

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición VIII de la toxina A (aminoácidos 2687-2710 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 4 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1988-2007 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición VIII de la toxina A (aminoácidos 2687-2710 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1968-1987 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición VIII de la toxina A (aminoácidos 2687-2710 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo

equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 1 de la porción de repetición I de la toxina B (aminoácidos 1834-1854 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición VI de la toxina A (aminoácidos 2461-2481 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 4 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1988-2007 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición VI de la toxina A (aminoácidos 2461-2481 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1968-1987 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición VI de la toxina A (aminoácidos 2461-2481 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1947-1967 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición VI de la toxina A (aminoácidos 2461-2481 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición I de la toxina B (aminoácidos 1855-1876 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición VI de la toxina A (aminoácidos 2461-2481 de SEQ ID N° 1 o sus equivalentes en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 1 de la porción de repetición I de la toxina B (aminoácidos 1834-1854 de SEQ ID N° 2 o sus equivalentes en una cepa diferente).

En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2690-2710 o 2695-2710 o 2700-2710 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1950-1980, 1955-1975 o 1960-1970 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2690-2710 o 2695-2710 o 2700-2710 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1978-2008, 1983-2003 o 1988-1998 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2690-2710 o 2695-2710 o 2700-2710 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1857-1887, 1862-1882, o 1867-1877 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2670-2700 o 2675-2695 o 2680-2690 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1950-1980, 1955-1975 o 1960-1970 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2670-2700 o 2675-2695 o 2680-2690 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1978-2008, 1983-2003 o 1988-1998 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente. En una realización, el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2670-2700 o 2675-2695 o 2680-2690 de SEQ ID N° 1 o su equivalente en una cepa diferente y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1857-1887, 1862-1882, 1860-1878 o 1867-1877 de SEQ ID N° 2 o su equivalente en una cepa diferente.

En una realización, el primer fragmento comprende al menos 100, 200, 300, 400 o 450 aminoácidos. En una realización, el segundo fragmento comprende al menos 100, 200, 300 o 400 aminoácidos.

En una realización, el polipéptido comprende además un enlazador. Este enlazador puede estar entre el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal, como alternativa el enlazador puede unir los extremos distales del primer fragmento y/o del segundo fragmento con una secuencia de aminoácidos adicional.

Se puede emplear una secuencia enlazadora peptídica para separar el primer fragmento y el segundo fragmento. Dicha secuencia enlazadora peptídica se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas convencionales muy conocidas en la técnica. Las secuencias enlazadoras peptídicas adecuadas pueden seleccionarse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación flexible extendida; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con epítomos funcionales sobre el primer fragmento y/o los segundos fragmentos; y (3) la falta de restos hidrófobos o cargados que pudieran reaccionar con los epítomos funcionales ToxA y/o ToxB. Las secuencias enlazadoras peptídicas pueden contener restos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala también pueden usarse en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadoras incluyen las descritas en Maratea y col., Gene 40:39-46 (1985); Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); y en las patentes de estados unidos No. 4.935.233 y No. 4.751.180.

En una realización, el enlazador comprende entre 1-19, 1-15, 1-10, 1-5, 1-2, 5-20, 5-15, 5-15, 10-20 o 10-15 aminoácidos. En una realización, el enlazador es un enlazador de glicina, el enlazador puede comprender múltiples restos de glicina contiguos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 o 19), o como alternativa el enlazador puede comprender algunos restos de glicina y algunos restos de otros aminoácidos tales como alanina. En una realización adicional, el enlazador comprende un solo resto de glicina.

En una realización, el polipéptido de la invención es parte de una proteína de fusión más grande. Las proteínas de Fusión pueden comprender además aminoácidos que codifican una porción inmunogénica de otro antígeno proteico.

Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender además una porción inmunogénica de un antígeno proteico obtenido o procedente de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E.coli*, *M. cattarhalis*, *C. tetani*, *C. diphtheriae*, *B. pertussis*, *S. epidermidis*, enterococos, *S.aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. En este caso, el enlazador puede estar entre el primer fragmento o el segundo fragmento y una porción inmunogénica adicional de un antígeno proteico.

La expresión "porción inmunogénica de la misma" o "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de un polipéptido en el que el fragmento comprende un epítipo que es reconocido por linfocitos T citotóxicos, linfocitos T auxiliares o células B. Convenientemente, la porción inmunogénica comprenderá al menos 30 %, adecuadamente al menos 50 %, especialmente al menos 75 % y en particular al menos 90 % (por ejemplo 95 % o 98 %) de los aminoácidos en la secuencia de referencia. La porción inmunogénica comprenderá adecuadamente todas las regiones de epítipo de la secuencia de referencia.

En una realización, el polipéptido comprende un fragmento inmunogénico de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 o SEQ ID N° 27. En una realización, los polipéptidos comprenden un fragmento inmunogénico de al menos 500, 550, 600, 650, 700, 750, 780, 800, 830, 850, 880, 900, 920 o 950 aminoácidos de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 o SEQ ID N° 27. En una realización adicional, el polipéptido comprende una variante de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 o SEQ ID N° 27, en una realización adicional, el polipéptido comprende una variante que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID N° 3 - SEQ ID N° 7.

En una realización, el polipéptido comprende más de 450, 475, 500, 525, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825 o 850 aminoácidos de la toxina A. En una realización el polipéptido comprende menos de 850, 825, 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625 o 600 aminoácidos de la toxina A. En una realización, el polipéptido comprende más de 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 525 aminoácidos de la toxina B. En una realización, el polipéptido comprende menos de 525, 500, 475 o 450 aminoácidos de la toxina B.

El término 'identidad' se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según sea el caso, determinada comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencias entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según el caso, determinado por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. La "identidad" se puede calcular fácilmente por procedimientos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of SEQUENCE Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Se han diseñado procedimientos para determinar la identidad para dar la coincidencia más grande entre las secuencias sometidas a ensayo. Además, los procedimientos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los procedimientos de programa informático para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el programa Needle BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. y col., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) y FASTA (Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448 (1988). La familia de programas BLAST está disponible públicamente en el NCBI y en otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El archiconocido algoritmo de Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

Los parámetros de comparación de secuencias polipeptídicas incluyen lo siguiente:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff y Henikoff,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

Penalización por hueco: 10

Penalización por extensión de hueco: 0,5

Un programa útil con estos parámetros está públicamente disponible como el programa 'needle' del paquete EMBOSS (Rice P. y col, Trends in Genetics 2000 col. 16(6):276-277). Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para establecer comparaciones de péptidos (así como ninguna penalización para los huecos finales).

Para determinar la identidad de una secuencia de referencia con SEQ ID N° 1, en una realización la identidad de secuencia se calcula sobre toda la longitud de la secuencia de referencia. En una realización adicional, la identidad de secuencia se calcula sobre toda la longitud de la secuencia en SEQ ID N° 1. Para determinar la identidad de una

secuencia de referencia con SEQ ID N° 2, en una realización la identidad de secuencia se calcula sobre toda la longitud de la secuencia de referencia. En una realización adicional, la identidad de secuencia se calcula sobre toda la longitud de la secuencia en SEQ ID N° 2.

5 En el presente documento también se describe un polipéptido que comprende (i) SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35 (ii) una variante que tiene al menos un 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 92 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID N° 10-19 o (iii) un fragmento de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos de SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35. En una realización adicional, el polipéptido comprende SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35, (ii) una variante que tiene al menos un 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 92 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35; o (iii) un fragmento de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos de SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35. En una realización adicional, el polipéptido comprende SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35, (ii) una variante que tiene al menos un 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 92 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35; o (iii) un fragmento de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos de SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 o SEQ ID N° 35.

En una realización, el polipéptido comprende más de 450, 475, 500, 525, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825 o 850 aminoácidos de la toxina A. En una realización el polipéptido comprende menos de 850, 825, 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625 o 600 aminoácidos de la toxina A. En una realización, el polipéptido comprende más de 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 525 aminoácidos de la toxina B. En una realización, el polipéptido comprende menos de 525, 500, 475 o 450 aminoácidos de la toxina B.

En una realización adicional, el polipéptido provoca anticuerpos neutralizantes que neutralizan la toxina A o la toxina B o ambas. En una realización adicional, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A. En una realización adicional, el polipéptido produce anticuerpos que neutralizan la toxina B. En una realización adicional, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A y la toxina B. El polipéptido de la invención provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A si el suero contra el polipéptido proporciona una lectura en el ensayo ELISA superior a 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más alta que la de la muestra de referencia.

En una realización adicional, el polipéptido de la invención provoca una respuesta inmunoprotectora en un huésped mamífero contra cepas de *C. difficile*. En una realización, el huésped mamífero se selecciona del grupo que consiste en ratón, conejo, cobaya, mono, primate no humano y ser humano. En una realización, el huésped mamífero es un ratón. En una realización adicional, el huésped mamífero es un ser humano.

La determinación de si un polipéptido provoca una respuesta inmunoprotectora en un huésped mamífero contra cepas de *C. difficile* puede realizarse usando un ensayo de exposición. En tal ensayo, el huésped mamífero se vacuna con el polipéptido y se expone a *C. difficile*, el tiempo que el mamífero sobrevive después de la exposición se compara con el tiempo que sobrevive un mamífero de referencia que no ha sido inmunizado con el polipéptido. Un polipéptido provoca una respuesta inmunoprotectora si un mamífero inmunizado con el polipéptido sobrevive al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más que un mamífero de referencia que no se ha inmunizado después de la exposición con *C. difficile*. En una realización, el polipéptido de la invención provoca una respuesta inmunoprotectora contra cepas de *C. difficile* en un mamífero seleccionado del grupo que consiste en ratón, cobaya, mono y ser humano. En una realización, el mamífero es un ratón, en una realización adicional el mamífero es un ser humano.

La estructura nativa de los dominios C terminal (repetición) de las toxinas A y B consisten en una estructura alargada de tipo solenoide β . Esta estructura consta principalmente de estructuras β laminares, con una minoría de estructuras α helicoidales, como se observa en Ho y col (PNAS 102:18373-18378 (2005)). Las estructuras secundarias presentes se pueden determinar usando difracción circular. Por ejemplo, midiendo la fuerza y la magnitud de espectros de DC en la región UV lejana (190-250 nm) y comparando los resultados con los de estructuras conocidas. Esto puede llevarse a cabo usando una trayectoria óptica de 0,01 cm de 178 a 250 nm, con

una resolución de 1 nm y ancho de banda en un espectropolarímetro Jasco J-720, por ejemplo como se observa más adelante en el ejemplo 5.

5 En una realización, el polipéptido comprende menos de 25 %, 23 %, 20 %, 28 %, 15 %, 10 %, o 7 % de estructura secundaria alfa helicoidal. En una realización adicional, el polipéptido comprende más de 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 33 %, 35 %, 38 %, 40 % o 42 % de estructura beta laminar.

POLINUCLEÓTIDOS

10 La invención proporciona además un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención. Para los fines de la invención, el término 'polinucleótido(s)' se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado incluyendo regiones/formas mono y bicatenarias.

15 La expresión "polinucleótido que codifica un péptido" tal como se utiliza en la presente invención abarca polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un péptido o polipéptido de la invención. El término también abarca polinucleótidos que incluyen una única región continua o regiones discontinuas que codifican el péptido o polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos por fagos integrados, una secuencia de inserción integrada, una secuencia de vector integrada, una secuencia de transposón integrada, o debido a la edición de ARN o a la reorganización de ADN genómico) junto con regiones adicionales, que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

20 Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una similitud mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo (es decir, de origen natural). Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en la presente invención, por ejemplo, polinucleótidos que se optimizan para la selección de codones de seres humanos y/o primates y/o *E. coli*.

25 Las secuencias que codifican un polipéptido deseado pueden sintetizarse, total o parcialmente, usando procedimientos químicos muy conocidos en la técnica (véase Caruthers, M. H. y col., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. págs. 215-223 (1980), Horn y col., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. págs. 225-232 (1980)). Como alternativa, la propia proteína puede producirse usando procedimientos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o una parte de la misma. Por ejemplo, la síntesis de péptidos se puede realizar usando diversas técnicas de fase sólida (Roberge y col., Science 269:202-204 (1995)) y la síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, utilizando el sintetizador peptídico ASI 431 A (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

35 Además, las secuencias polinucleotídicas de la presente invención pueden diseñarse usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias codificantes de polipéptidos por una diversidad de razones, incluyendo, pero sin limitarse a, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto génico. Por ejemplo, se puede usar el barajado de ADN por fragmentación aleatoria y el reensamblaje de fragmentos de genes y de oligonucleótidos sintéticos por PCR para diseñar secuencias de nucleótidos. Además, puede usarse mutagénesis dirigida para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme, o introducir mutaciones, y etcétera.

VECTORES

40 En un aspecto adicional de la invención, la presente invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido de la invención unido a un promotor inducible de tal manera que cuando se induce el promotor se expresa un polipéptido codificado por el polinucleótido.

45 Un aspecto adicional de la invención comprende dicho vector en el que el promotor inducible se activa por la adición de una cantidad suficiente de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) preferentemente al medio de crecimiento. Opcionalmente este está en una concentración entre 0,1 y 10 mM, 0,1 y 5 mM, 0,1 y 2,5 mM, 0,2 y 10 mM, 0,2 y 5 mM, 0,2 y 2,5 mM, 0,4 y 10 mM, 1 y 10 mM, 1 y 5 mM, 2,5 y 10 mM, 2,5 y 5 mM, 5 y 10 mM. Como alternativa, el promotor puede inducirse por un cambio de temperatura o de pH.

CÉLULAS HUÉSPED

50 Para la producción recombinante de los polipéptidos de la invención, las células huésped pueden modificarse genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos de la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula huésped puede verse afectada por los procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis, y col., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), tales como, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, conjugación, transducción, carga por raspado, introducción balística e infección.

Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados se incluyen células bacterianas gram negativas, tales como células de, *E. coli*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Franciscella*, *Helicobacter*, *hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia*. En una realización, la célula huésped es una célula de *Escherichia coli*. Como alternativa también se pueden usar células bacterianas gram positivas. Se puede usar una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. En una realización, el vector procede de plásmidos bacterianos. Generalmente, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o expresar un polipéptido en un huésped puede usarse para la expresión a este respecto. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas muy conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, las expuestas en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, (citado anteriormente).

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y VACUNAS

También se proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante. La elección de un adyuvante adecuado para mezclarse con toxinas bacterianas o con conjugados, fabricado usando los procedimientos de la invención, está dentro del conocimiento del experto en la técnica. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio, tal como gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alumbre, pero también pueden ser otras sales metálicas tales como las de calcio, magnesio, hierro o zinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, sacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente, o polifosfazenos.

En una realización, la composición inmunogénica comprende además antígenos adicionales. En una realización, los antígenos adicionales son antígenos procedentes de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E. coli*, *M. cattarhalis*, tétano, difteria, tosferina, *S. epidermidis*, enterococos, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. En una realización adicional, la composición inmunogénica de la invención puede comprender otros antígenos de *C. difficile*, por ejemplo, las proteínas de la capa S (WO01/73030).

Además se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica, pudiendo comprender esta vacuna además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención, pueden utilizarse para proteger a un mamífero susceptible a infección provocada por *C. difficile* o para tratar a un mamífero con una infección provocada por *C. difficile*, mediante la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por vía mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una dosis única, sus componentes también pueden coadministrarse conjuntamente al mismo tiempo o en tiempos diferentes (por ejemplo, los conjugados de sacáridos neumocócicos podrían administrarse por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para la coordinación de las respuestas inmunitarias entre sí). Además de una única vía de administración, se pueden utilizar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, los sacáridos o conjugados de sacáridos pueden administrarse por vía intramuscular (IM) o intradérmica (ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse por vía intranasal (IN) o intradérmica (ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse por vía IM para dosis de sensibilización y por vía IN para dosis de refuerzo.

El contenido de toxinas en la vacuna estará típicamente en el intervalo de 1 - 250 µg, preferiblemente 5 - 50 µg, más típicamente en el intervalo de 5 - 25 µg. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas. La preparación de la vacuna se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de los liposomas la describe Fullerton, patente US 4.235.877.

Una aplicación de la invención es un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende además un vial que contiene un adyuvante como se describe en el presente documento. Se contempla que en este aspecto de la invención, el adyuvante se usará para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Otra aplicación de la invención es un procedimiento para prevenir o tratar la infección por *C. difficile* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención. En una realización se proporciona un procedimiento para prevenir o tratar episodios primarios y/o recurrentes de infección provocada por *C. difficile*, que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención.

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

recurrentes de una enfermedad provocada por *C. difficile*.

Una aplicación adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad provocada por *C. difficile*. En una realización se proporciona una composición inmunogénica de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de episodios primarios y/o recurrentes de una enfermedad provocada por *C. difficile*.

"Alrededor de" o "aproximadamente" se definen como dentro de 10 % más o menos de la cifra dada para los fines de la invención.

Los autores de la invención pretenden que las expresiones "que comprende", "comprende" y "comprenden" de la presente memoria, puedan sustituirse opcionalmente con las expresiones "consistente en", "consiste en" y "consisten en", respectivamente, en cada caso. El término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprenden" y "comprendiendo", implican la inclusión de un compuesto o composición estipulados (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno), o etapa, o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro compuesto, composición, etapas o grupos de los mismos. La abreviatura "p. ej." procede del latín *exempli gratia*, y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por lo tanto, la abreviatura "p. ej." es sinónimo de la expresión "por ejemplo".

Las realizaciones del presente documento que se refieren a "composiciones de vacuna" de la invención también son aplicables a realizaciones relacionadas con "composiciones inmunogénicas" de la invención, y viceversa.

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

Los términos singulares "un(o)/una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Además, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximados y se proporcionan para su descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, pueden ser aproximadas.

Todas las referencias o solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva de patente se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

Para que la presente invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como que limitan el ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño de cinco fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile*

Se diseñaron proteínas de fusión que contenían fragmentos de los dominios de repetición C terminal de ToxA y ToxB. Estas fusiones contenían un fragmento del dominio de repetición C terminal de ToxA y un fragmento del dominio de repetición de C terminal de ToxB y una unión entre el extremo C terminal del fragmento ToxA y el extremo N terminal del fragmento ToxB. Se idearon dos estrategias, en la primera estrategia, la fusión se diseñó de tal manera que la estructura alargada de tipo solenoide se mantuvo en la unión entre los dos fragmentos. En la segunda estrategia, los dos fragmentos de las fusiones están separados por un enlazador para permitir su plegamiento correcto independiente.

La parte C terminal de ToxA y B se compone de secuencias repetidas: repeticiones cortas (RC) y repeticiones largas (RL) (PNAS 2005 vol 102: 18373-18378).

La estructura 3D parcial conocida para el dominio C terminal de ToxA (PNAS 2005 Greco y col., Vol. 102: 18373-18378; Nature Structural & Molecular biology 2006 vol 13(5): 460-461; PDB códigos: 2F6E, 2G7C y 2QJ6).

Los inventores predijeron que había dos tipos de interacciones importantes entre los restos de la parte C terminal de ToxA y de ToxB. La primera interacción se produce entre restos contenidos en una RL y su anterior RC y es importante para mantener la estructura de tipo solenoide. El segundo tipo de interacción se produce entre los restos

contenidos en una RL y la RC siguiente y esta interacción está mediando la función de unión a hidratos de carbono de la toxina.

Se definió una nueva repetición RC-RL-RC "estructural-funcional". La estructura de esta repetición se mantuvo intacta en las fusiones diseñadas por los autores de la presente invención.

- 5 La Figura 2 representa los dominios C terminal de ToxA y de ToxB y la definida casilla "RC-RL-RC".

Las posiciones de las repeticiones cortas (RC) y largas (RL) de las repeticiones de ToxA y ToxB se presentan en la tabla 1.

En la Tabla 2 se presenta una lista de las casillas "RC-RL-RC" contenidas en el dominio C terminal de ToxA y ToxB.

Tabla 2

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

10

Finalmente, el número de RC entre dos RL se mantendrá en las fusiones diseñadas para conservar la estructura alargada de tipo solenoide.

- 15 Antes del diseño de las uniones de las fusiones, se definieron dos hipótesis de trabajo: primera hipótesis, cuanto más cortas fueran las fusiones, mejor sería la probabilidad de que las fusiones fueran a expresarse de manera estable; segunda hipótesis, de acuerdo con el concepto de casillas "RC-RL-RC", la posición de inicio tiene que seleccionarse con el fin de garantizar un plegamiento correcto de la primera RC de esta casilla RC-RL-RC previamente definida. Por lo tanto, las fusiones comienzan al principio de la RC que precede la casilla RC-RL-RC. Utilizando estas dos hipótesis, se analizaron tres posiciones iniciales: resto 2370, 2234 y 2121 de ToxA.

- 20 Se excluyó la posición inicial 2370. La posición inicial 2234 también se excluyó porque no se conservaba uno de los restos implicados en interacciones importantes para la estabilidad estructural de la proteína. Por lo tanto, se decidió que toda la fusión diseñada comenzara en el resto 2121 de ToxA.

Todas las fusiones terminarán en el último resto de ToxB.

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

- 25 Las fusiones 1 (F1) y 2 (F2) se diseñaron utilizando la misma hipótesis. Todas las secuencias de proteína RC de ToxA y de ToxB se habían comparado utilizando un programa informático de alineamiento múltiple (ClustalW - Thompson JD y col. (1994) Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680). Las secuencias más similares fueron la tercera RC VIII de ToxA y la tercera RC II de ToxB y la tercera RC III de ToxB. Para hacer una elección entre estas dos RC de ToxB, se realizó un modelo de homología estructural (usando la interfaz SwissModel - Arnold K y col. (2006) Bioinformatics, 22, 195-201) en la parte C terminal de ToxB utilizando la estructura 3D conocida del dominio C terminal parcial de ToxA (código PDB: 2QJ6). Utilizando la tercera RC VIII de ToxA, se obtuvo la mejor superposición estructural local (realizada usando SwissPDBViewer - Guex N y col. (1997), Electrophoresis 18, 2714-2723) con la tercera RC II de ToxB. Por lo tanto, se diseñaron dos uniones: la primera se encontraba entre la tercera RC VI de ToxA y la cuarta RC II de ToxB (F1) y la segunda entre la segunda RC VIII de ToxA y la tercera RC II de ToxB (F2). Estas uniones se presentan en las figuras 3 y 4, respectivamente.
- 30
- 35

Para diseñar la Fusión 3 (F3), se realizó una superposición estructural global entre la estructura conocida del dominio C terminal parcial de ToxA y la estructura predicha del dominio C terminal de ToxB (utilizando los programas

informáticos SwissModel y SwissPDBViewer). La mejor superposición se encontró entre la RL VII de ToxA y la RL II de ToxB. Por lo tanto, se decidió hacer una unión en esta RL similar. La unión se realizó en primer lugar en una región en la que la secuencia se conservaba entre ToxA y ToxB, después de esto para mantener en la parte ToxA de la fusión, los restos en interacción con la anterior RC y finalmente, para mantener en la parte ToxB, los restos en interacción con la siguiente RC. Esta unión se muestra en la figura 5.

Para el diseño de la Fusión 4 (F4), el dominio C terminal de ToxB se dividió en 4 fragmentos y se realizó un modelo de homología más preciso (SwissModel). La división se realizó para mantener intactas las casillas "RC-RL-RC" (cada dominio finaliza al final de la RC que sigue a una RL). Se realizó una superposición estructural entre las estructuras predichas de estos fragmentos y la estructura 3D conocida de ToxA y se obtuvo la mejor superposición estructural para la tercera RC de ToxB (RC I) y la última RC de ToxA (tercera RC VIII). Por lo tanto, la unión se realizó entre la segunda RC VIII de ToxA y la tercera RC I de ToxB. Este diseño se presenta en la figura 6.

La última Fusión (F5) se diseñó para permitir un plegamiento independiente, correcto de los dos fragmentos de fusión. El enlazador se añadió entre el último resto de la secuencia de la proteína ToxA y el comienzo de la cuarta RC II de ToxB (teniendo siempre en cuenta la importancia de una casilla "RC-RL-RC" intacta). Sólo se añadió un resto exógeno (Glicina) como enlazador y se localizó entre dos Glicinas existentes. Por lo tanto, el enlazador también se puede describir como compuesto por 3 glicinas que rodean a la cadena beta conocida (para ToxA) y predicha (para ToxB). Este último diseño se muestra en la figura 7.

Ejemplo 2: Clonación, expresión y purificación de las proteínas de fusión

Plásmido de expresión y cepa recombinante

Los genes que codificaban las proteínas de fusión de los dominios C terminal parcial de ToxA y ToxB (SEQ ID N° 3, 4, 5, 6 y 7) y una etiqueta His se clonaron en el vector de expresión pET24b(+) (Novagen) usando los sitios de restricción NdeI/XhoI mediante procedimientos convencionales. La construcción final se generó por la transformación de la cepa BLR (DE3) de *E. coli*, con el vector de expresión recombinante de acuerdo con el procedimiento estándar con células tratadas con CaCl (Hanahan D. «Plasmid transformation by Simanis.» In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.).

Cepa huésped:

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

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

Expresión de las proteínas recombinantes:

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

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

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

Después de inducción durante una noche (alrededor de 16 horas), se evaluó la D.O._{600nm} después de la inducción y el cultivo se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos y los sedimentos se congelaron a -20 °C por separado.

Purificación:

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

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

Las fracciones que contenían las proteínas de fusión se seleccionaron basándose en la pureza por SDS-PAGE y se dializaron frente a un tampón de bicina (Bicina 20 mM, NaCl 150 mM, con o sin EDTA 5 mM, pH 8,0). La concentración de proteína se determinó usando el Ensayo de Proteínas DC de BioRad. Las proteínas se agruparon así, se filtraron estériles en un filtro de 0,22 mm, se conservaron a -80 ° C.

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

Ejemplo 3 – Clonación, expresión y purificación de los fragmentos de *C. difficile* Tox A y Tox B separados

Plásmido de expresión y cepa recombinante:

- 10 Los genes que codificaban los fragmentos de proteína de ToxA y ToxB (SEQ ID N° 8 y SEQ ID N° 9) y una etiqueta de His se clonaron en el vector de expresión pET24b (+) utilizando los sitios de restricción NdeI/XhoI utilizando procedimientos convencionales. La construcción final se generó mediante la transformación de la cepa BLR (DE3) de *E. coli* con el vector de expresión recombinante de acuerdo con el procedimiento estándar con células tratadas con CaCl₂ (Hanahan D. «Plasmid transformation by Simanis. » In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.).
- 15

Cepa huésped:

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

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

Expresión de las proteínas recombinantes:

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

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

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

- 30 Después de la inducción durante la noche (alrededor de 16 horas), la D.O. a 600 nm se evaluó después de la inducción y el cultivo se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos y los sedimentos se congelaron a -20 °C por separado.

Purificación:

- 35 El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón de bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM complementado con una mezcla de inhibidor de proteasa (Completa sin EDTA, Roche cat 11873580001) y benzonasa. (Roche cat 1.01695.0001). Las bacterias se lisaron usando un sistema de prensa francesa 2 x 20 000 PSI. Los componentes solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimento) se separaron por centrifugación a 34 000 g o a 48 000 g durante 25-30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se filtró en un filtro de 0,22 mm.

- 40 La proteína etiquetada con 6 His se purificó en condiciones nativas en IMAC. Los componentes solubles se cargaron en una columna GE (por ejemplo 15 ml) (cargados en Ni) preequilibrada con el mismo tampón usado para la resuspensión bacteriana. Después de cargar, la columna se lavó con el mismo tampón.

Para ToxA:

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

Para ToxB:

- 50 Se realizó un segundo lavado con tampón de bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM y desoxicolato 0,5 % o el mismo tampón con NaCl 150 mM. La elución se realizó usando un tampón de bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM y diferentes concentraciones de imidazol (10-500 mM). Después del análisis en gel, se

seleccionaron más fracciones puras, se complementaron con EDTA 5 mM y se cargaron en cromatografía SEC (SUPERDEX™ 200) para una etapa de purificación adicional en el mismo tampón con EDTA 5 mM.

5 Las fracciones que contenían fragmentos ToxA o ToxB se seleccionaron basándose en la pureza por SDS-PAGE y se dializaron contra tampón de bicina (Bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), la concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteínas RCDC de BioRad. Las proteínas se agruparon así, se filtraron estériles en un filtro de 0,22 mm, se conservaron a -80 °C.

Ejemplo 4 – Evaluación del peso molecular de las cinco fusiones ToxA ToxB de *C. difficile*

10 La ultracentrifugación analítica se utiliza para determinar la homogeneidad y distribución por tamaño en solución de las diferentes especies dentro de una muestra de proteína midiendo la velocidad a la cual las moléculas se desplazan en respuesta a una fuerza centrífuga. Esto se basa en el cálculo de los coeficientes de sedimentación de las diferentes especies que se obtienen mediante el experimento de velocidad de sedimentación, que depende de su forma y masa moleculares.

1. Las muestras de proteína se centrifugan en una ultracentrífuga analítica Beckman-Coulter PROTEOMELAB™ XL-1 a 42.000 rpm después de haber equilibrado el rotor AN-60Ti a 15 °C.

- 15
- a. proteína de fusión F1, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH8,0
 - b. proteína de fusión F2, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH8,0
 - c. proteína de fusión F3, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH8,0
 - d. proteína de fusión F4, 500 µg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH8,0
 - e. proteína de fusión F5, 500 mg/ml, bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH8,0

20 2. Para la recogida de datos, se registraron 160 escáneres a 280 nm cada 5 minutos.

3. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa SEDFIT para la determinación de la distribución C(S). La determinación del volumen específico parcial de las proteínas se realizó con el programa informático SEDNTERP desde su secuencia de aminoácidos. También se usó SEDNTERP para determinar la viscosidad y la densidad del tampón.

25 4. El peso molecular de las diferentes especies se determinó a partir del gráfico de distribución C(S) (concentración frente a coeficiente de sedimentación), considerando que es una mejor representación de los datos sin procesar que la distribución C(M) (concentración frente a peso molecular) para caracterizar la distribución por tamaño de una mezcla.

30 La Figura 8 describe la distribución de las fusiones ToxA-ToxB según se determina por ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación.

El peso molecular de las principales especies detectadas a partir de la distribución C(S) de las cinco proteínas de Fusión ToxA-ToxB, corresponde a su forma monomérica. Las relaciones de fricción mejor ajustadas determinadas para las cinco fusiones están entre 2 y 2,2. Esto puede indicar que las proteínas están presentes en la solución como una forma alargada, lo que sería coherente con la estructura de la proteína.

35 Ejemplo 5 - Evaluación de las estructuras secundarias y terciarias de fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile* por dicroísmo circular y espectroscopia de fluorescencia

40 El dicroísmo circular se utiliza para determinar la composición de la estructura secundaria de una proteína midiendo la diferencia en la absorción de la luz polarizada a la izquierda frente a la luz polarizada a la derecha, que se debe a la asimetría estructural. La forma y la magnitud del espectro de DC en la región UV lejana (190-250 nm) son diferentes si una proteína presenta una estructura beta laminar, alfa helicoidal o espiral aleatoria. La abundancia relativa de cada tipo de estructura secundaria en una muestra de proteína dada se puede calcular por comparación con espectros de referencia.

45 La estructura terciaria de una muestra de proteína puede estimarse evaluando la inmovilización de los aminoácidos aromáticos. La observación de una señal de DC en la región UV cercana (250-50 nm) puede atribuirse a la polarización de restos de fenilalanina, tirosina y triptófano y es una buena indicación de que la proteína se pliega en una estructura bien definida.

Se utilizó el siguiente protocolo:

50 1. Los espectros en la región UV lejana se miden usando una trayectoria óptica de 0,01 cm de 178 a 250 nm, con una resolución de 1 nm y ancho de banda en un espectropolarímetro Jasco J-720. La temperatura de la célula se mantiene a 23 °C mediante un bloque de células RTE-111 regulado con un termostato Peltier. Durante las

mediciones se mantiene un flujo de nitrógeno de 10 l/min.

2. Los espectros en la región UV cercana se miden usando una trayectoria óptica de 0,01 cm de 250 a 300 nm, con una resolución de 1 nm y ancho de banda en un espectropolarímetro Jasco J-720. La temperatura de la célula se mantiene a 23 °C mediante un bloque de células RTE-111 regulado con un termostato Peltier. Durante las mediciones se mantiene un flujo de nitrógeno de 6 l/min.

La observación de los espectros de UV lejana (figura 9) para las cinco proteínas de Fusión ToxA-ToxB sugiere un contenido débil de estructuras alfa helicoidales y un alto contenido de estructuras beta laminares. Además, todas las proteínas presentaban un máximo a 230 nm, lo que es inusual para las proteínas globulares solubles. Esta particularidad se ha caracterizado bien en la bibliografía y está asociada a un pequeño grupo de proteínas conocidas por su ausencia de hélices alfa y su alto contenido en láminas beta y aminoácidos aromáticos (Zsila, Analytical Biochemistry, 391(2009) 154-156). Esas particularidades son coherentes con la estructura que se espera para las proteínas de Fusión ToxA-ToxB. Se compararon las estructuras cristalinas de 13 proteínas que presentaban los espectros de DC característicos con una señal positiva a 230 nm (Protein Data Bank). El contenido medio de estructura secundaria de esas proteínas es 42 % en láminas beta ± 9 % y 7 % en hélices alfa ± 6 %. Esto indica contundentemente que la firma espectral de las proteínas de fusión ToxA-ToxB es el diagnóstico de una proteína que contiene una lámina beta alta y una hélice alfa baja.

La observación de la forma del espectro de UV cercana (figura 10) para las cinco proteínas de fusión indica que al menos algunos de los aminoácidos aromáticos están inmovilizados, lo que es una fuerte indicación de una estructura terciaria compacta y específica. Además, el tratamiento de la proteína con una concentración desnaturante de urea causó la desaparición de la señal UV cercana, lo cual es una indicación adicional de que este espectro característico se debió al plegamiento de las proteínas.

Ejemplo 6 - Inmunización de ratones con fragmentos ToxA o ToxB y fusiones ToxA-ToxB

Se inmunizaron ratones Balb/C con las construcciones descritas en los ejemplos 2 y 3.

Inmunización de ratones

Se inmunizaron por vía IM grupos de 15 ratones hembra Balb/c los días 0, 14 y 28 con 3 μg o 10 μg de los fragmentos de toxA y toxB distintos (véase el ejemplo 2) así como con proteínas de fusiones ToxA-ToxB (ver ejemplo 3) con adyuvante AS03B. Se vacunó un grupo control de 10 ratones solo con AS03B.

Los títulos de ensayo ELISA anti-ToxA y anti-ToxB se determinaron en sueros individuales recogidos al día 42 (post III).

Los títulos de inhibición de la hemaglutinación se determinaron en sueros Post III agrupados.

Respuesta Elisa anti-ToxA y anti-ToxB: Protocolo

Se recubrieron muestras de los fragmentos toxA o toxB a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en placas de microtitulación de alta unión (Nunc MAXISORP™), durante una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con PBS-BSA al 1 % durante 30 min a TA con agitación. Los sueros anti ratón se diluyeron previamente a 1/500 en PBS-BSA 0,2 % - TWEEN™ 0,05 % y después, se realizaron dos diluciones adicionales en microplacas y se incubaron a TA durante 30 min con agitación. Después de lavar, se detectó el anticuerpo murino unido usando anti IgG de ratón (H+L) de cabra affiniPure conjugado con peroxidasa, Jackson ImmunoLaboratories Inc. (ref: 115-035-003) diluido a 1:5000 en PBS-BSA 0,2 % - Tween 0,05 %. Los anticuerpos de detección se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente (TA) con agitación. El color se reveló usando 4 mg de O-fenilendiamina (OPD) + 5 μl de H₂O₂ por 10 ml a un pH 4,5 de tampón de citrato 0,1 M durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 μl de HCl, y se leyó la densidad óptica (DO) a 490 nm con respecto a 620 nm.

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

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación: Protocolo

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

A continuación se añadieron 25 μl de Toxina A nativa (0,2 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

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

Las placas se analizaron visualmente, presentándose la hemaglutinación como eritrocitos difusos en el pocillo y la inhibición de la hemaglutinación se observó como punto rojo sedimentado en el pocillo.

Los títulos de inhibición se definieron como el recíproco de la dilución más alta del suero que inhibía la hemaglutinación.

Ensayo de citotoxicidad:

5 Se cultivaron células de fibroblastos IMR90 a 37 °C con CO₂ al 5 %, en EMEM + suero bovino fetal 10 % + glutamina 1 % + antibióticos 1 % (penicilina-estreptomicina-anfotericina) y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con una densidad de 5.10⁴ células/pocillo.

Después de 24 horas, los medios celulares se retiraron de los pocillos.

Se realizaron dos diluciones en serie de antisueros agrupados de ratones (50 µl) en medio celular.

10 A continuación se añadieron 50 µl de toxina B nativa (0,5 ng/ml) y las placas se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 24 horas.

Las células se observaron después de 24 horas, y se determinó la proporción de células redondeadas.

Los títulos de inhibición se definieron como el recíproco de la dilución más alta del suero que inhibía un 50 % el redondeo celular.

Resultados:

15 En la figura 11 se describen los resultados del Elisa, usando los anticuerpos Tox A. Los anticuerpos anti Tox A se indujeron después de la inmunización solo con ToxA, pero también con cada una de las 5 fusiones.

Las propiedades funcionales de estos anticuerpos se analizaron en el ensayo de hemaglutinación. Este ensayo se adapta solo para la evaluación de Tox A, ya que no se observa hemaglutinación con ToxB.

20 En la figura 12 se describen los títulos de la inhibición de la hemaglutinación. La inhibición de la hemaglutinación se observó con los sueros de los fragmentos de anti Tox A o con sueros dirigidos contra cada una de las fusiones ToxA-ToxB.

También se realizó un ensayo ELISA usando anticuerpos ToxB; los resultados de este ensayo se ilustran en la Figura 13. Se indujeron anticuerpos anti Tox B después de la inmunización solo con el fragmento ToxB, pero también con las fusiones F2, F3 y F4.

25 En la figura 14 se describen los títulos de la inhibición de la citotoxicidad. Los títulos de inhibición obtenidos utilizando sueros de ratones inmunizados con el fragmento ToxB o con las fusiones ToxA-ToxB fueron mayores que los obtenidos usando sueros de control.

Ejemplo 7 - Diseño, clonación, expresión y purificación de 4 proteínas de fusión adicionales

30 Utilizando los principios de diseño descritos en el ejemplo 1 se diseñaron cuatro proteínas de fusión adicionales que se denominaron F54 Gly (SEQ ID N° 21), F54 New (SEQ ID N° 23), F5 ToxB y F52 New (SEQ ID N° 27).

Estas proteínas de Fusión se expresaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Ejemplo 8 - Evaluación del peso molecular de las fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile* descritas en SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 27

35 El peso molecular de las fusiones descritas en SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25, y SEQ ID N° 27 se determinó como se describe en el ejemplo 4.

La Figura 15 describe la distribución de estas cuatro proteínas de fusión adicionales determinada por ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación.

40 El peso molecular de la especie principal, determinado a partir de la distribución C(S) de las cuatro fusiones de proteínas descritas en SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 27 corresponde a su forma monomérica y todas las proteínas exhiben propiedades de sedimentación similares a las de las fusiones F1 a F5.

Ejemplo 9 - Evaluación de las estructuras secundaria y terciaria de las fusiones ToxA - ToxB de *C. difficile* descritas en SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 27

45 Las estructuras secundaria y terciaria de las fusiones descritas en la SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 27 se evaluaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. El DC de la región UV lejana para estas proteínas de fusión se puede encontrar en la figura 16, y los espectros de UV cercana de estas fusiones se pueden encontrar en la figura 17.

5 El análisis de los espectros de DC de la UV cercana y UV lejana de las proteínas descritas en SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 27 muestra que las cuatro tienen la misma estructura beta laminar alta que las fusiones F1 a F5. Además, la observación de los espectros de UV cercana no muestra ninguna diferencia significativa en la posición de los aminoácidos aromáticos en la estructura terciaria en comparación con las fusiones F1 a F5.

Ejemplo 10 - Inmunización de ratones con fusiones ToxA-Tox B

Se inmunizaron ratones Balb/c con las cuatro construcciones de proteína de fusión F54 Gly (SEQ ID N° 21), F54 New (SEQ ID N° 23), F5 ToxB (SEQ ID N° 25) y F52 New (SEQ ID N° 27), como se describe en el ejemplo 6.

10 Se realizó un ELISA usando el protocolo de respuesta ELISA anti-ToxA y anti-ToxB descrito en el ejemplo 6, excepto que en este caso las muestras de los fragmentos toxA o toxB se recubrieron a 2 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato en placas de microtitulación de alta unión. Se realizó un ensayo de inhibición de la hemaglutinación como se describe en el ejemplo 6. Se realizó un ensayo de citotoxicidad de toxB como se describe en el ejemplo 6. Se realizó otro ensayo de citotoxicidad de toxA como se describe a continuación.

Ensayo de citotoxicidad de ToxA:

15 Se cultivaron células HT29 a 37 °C con CO₂ al 5 % en DMEM + suero bovino fetal 10 % + glutamina 1% + antibióticos (penicilina-estreptomicina-anfotericina) 1% y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de 5.10⁴ células/pocillo.

Después de 24 horas, el medio celular se retiró de los pocillos.

Se realizaron dos diluciones en serie de antiseros agrupados de ratones (50 µl) en medio celular.

20 A continuación se añadieron 50 µl de toxina B nativa (0,15 ng/ml) y las placas se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 48 horas.

Las células se observaron después de 48 horas y se determinó la proporción de células redondeadas.

Los resultados de los ensayos ELISA anti-toxA, Elisa anti-toxB, de inhibición de la hemaglutinación y de citotoxicidad se describen en las Figuras 18, 19, 20, 21 y 22, respectivamente.

25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en el que
- 5 (i) el primer fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina A;
(ii) el segundo fragmento es un fragmento de dominio de repetición de toxina B;
(iii) el primer fragmento tiene un primer extremo proximal;
(iv) el segundo fragmento tiene un segundo extremo proximal; y
- en el que el primer fragmento y el segundo fragmento están separados por menos de, o exactamente, 5 aminoácidos en la estructura primaria, en el que el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan tanto la toxina A como la toxina B, en el que el primer extremo proximal está dentro de una repetición corta, el segundo extremo proximal está dentro de una repetición corta y el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal no interrumpen las porciones de repetición corta - repetición larga - repetición corta.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido provoca una respuesta inmunoprotectora en un huésped mamífero contra cepas de *C. difficile*.
3. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en el que el primer fragmento y/o el segundo fragmento comprenden una estructura alfa helicoidal inferior al 25 %, 20 %, 18 % o 15 %.
- 15 4. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer fragmento y/o el segundo fragmento comprenden una estructura beta laminar superior al 25 %, 30 %, 35 %, 38 % o 40 %.
5. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer extremo proximal no está dentro de los aminoácidos 1878-1940, 2012-2074, 2146-2208, 2258-2322, 2394-2456, 2507-2569 o 2598-2660 de la toxina A.
- 20 6. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el segundo extremo proximal no está dentro de los aminoácidos 1881-1942, 2012-2074, 2144-2208 o 2278-2339 de la toxina B.
7. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer fragmento comprende al menos 100, 250, 400 o 450 aminoácidos.
8. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el segundo fragmento comprende al menos 100, 200, 300 o 400 aminoácidos.
- 25 9. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710) de la toxina A.
10. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en el que el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2700 - 2710 o 2680 - 2690 de la toxina A.
- 30 11. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834 - 1926) de la toxina B.
12. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1860-1878 o 1854-1876 de la toxina B.
- 35 13. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, en el que el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927 - 2057) de la toxina B.
14. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o 13, en el que el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1960-1970, 1988-1998 o 1867-1877 de la toxina B.
- 40 15. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 11 o 12, en el que el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710) de la toxina A y en el que el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición I (aminoácidos 1834 - 1926) de la toxina B.
16. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 13 o 14, en el que el primer extremo proximal está dentro de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2645-2710) de la toxina A y en el que el segundo extremo proximal está dentro de la porción de repetición II (aminoácidos 1927 - 2057) de la toxina B.
- 45 17. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 13 o 14, en el que el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición VIII de la toxina A (aminoácidos 2687-2710) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 4 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1988-2007).
18. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 13 o 14, en el que el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición VIII (aminoácidos 2665-2686) de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1968-
- 50

1987).

19. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 11 o 12, en el que el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 2 de la porción de repetición VIII de la toxina A (aminoácidos 2665-2686) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición I de la toxina B (1877-1896).
- 5 20. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, 9, 10, 11, 12 y 15, en el que el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición VIII de la toxina A (aminoácidos 2645 - 2668) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 1 de la porción de repetición I de la toxina B (aminoácidos 1834-1854).
- 10 21. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 13 o 14, en el que el primer extremo proximal está dentro de la repetición corta 3 de la porción de repetición VIII de la toxina A (aminoácidos 2687-2710) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición corta 4 de la porción de repetición II de la toxina B (aminoácidos 1988-2007).
22. El polipéptido de la reivindicación 16, en el que el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2700 - 2710 de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1960-1970 de la toxina B.
- 15 23. El polipéptido de la reivindicación 16, en el que el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2680-2690 de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1960-1970 de la toxina B.
24. El polipéptido de la reivindicación 16, en el que el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2700-2710 de la toxina A y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1988-1998 de la toxina B.
- 20 25. El polipéptido de la reivindicación 16, en el que el primer extremo proximal está dentro de los aminoácidos 2680-2690 y el segundo extremo proximal está dentro de los aminoácidos 1860-1878.
26. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido es parte de una proteína de fusión más grande.
27. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido comprende un fragmento inmunogénico de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 o SEQ ID N° 27.
- 25 28. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido comprende un fragmento inmunogénico de al menos 500, 600, 700, 750, 800, 850 o 900 aminoácidos de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 25 o SEQ ID N° 27.
- 30 29. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido comprende más de 450, 475, 500, 525, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825 o 850 aminoácidos de la toxina A.
30. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido comprende menos de 850, 825, 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625 o 600 aminoácidos de la toxina A.
31. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido comprende más de 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 525 aminoácidos de la toxina B.
- 35 32. El polipéptido de cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido comprende menos de 525, 500, 475 o 450 aminoácidos de la toxina B.
33. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32.
34. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 33 unido a un promotor inducible.
- 40 35. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 32 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
36. La composición inmunogénica de la reivindicación 35, que comprende además un adyuvante.
37. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 35 - 36 que comprende además antígenos adicionales.
- 45 38. La composición inmunogénica de la reivindicación 37, en la que los antígenos adicionales son antígenos procedentes de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E. coli*, *M. cattarhalis*, tétano, difteria, tosferina, *S. epidermidis*, enterococos y *S. aureus*.
39. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 35 - 38.

40. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 35-38 o la vacuna de la reivindicación 39 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad provocada por *C. difficile*.

FIGURA 1

SEQ ID NO:1 - secuencia de toxina A

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKKNLNEIDVFMN
 KYKTSSRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADI
 NAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAI VESSSTTEALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYD
 RQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIR
 ANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFLFTI
 SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS
 KLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESD
 NNFTDPTTKIFHDSLFNSATAENSMFLTKIAPYLQVGMPEARSTISLSGPGAYASAYYDF
 INLQENTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGG
 SLSEDNQVDFNKNTALDKNYLLNKKIPSNVVEEAGSKNYVHYIIQLQGGDISYEATCNLF
 SKNPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRI PERLKNKEKVKVTFIGHGKDEF
 NTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVENVLLGCNMFSDYDFNVEETYPGKLLLS
 IMDKITSTLPDVNKNSTITIGANQYEVRLINSEGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSKEYI
 FFDSIDNKLKAKSKNIPGLASISEDIKTLLLDASVSPDTKFI LNKLKLNIESSIGDYIYY
 EKLEFVKNI IHNSIDDLIDEFNLENVSEDELYELKKNLNDKEYLISFEDISKNNSTYSV
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNIQLDHTSQVNT
 LNAEFFIQSLIDYSSNKDVLNLDLSTSVKQVLYAQLFSTGLNTIYDSIQLVNLISNAVNDT
 INVLPITITEGPIVSTILDGINLGAAIKELLDEHDP LLKKELEAKVGVLA INMSLSIAAT
 VASIVGIGAEVTIFLLPIAGISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKT
 EDDKILVPIDDLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP
 SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGTRLLDSIRDLY
 PGKFWREYAFEDYAITTLKPVYEDTNIKIKLKDTRNEIMPTITTNEIRNKLSYSFDGA
 GGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNIDNEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINK
 NKLIIGNQTIDFSGDIDNKDRYIFLTCELDKISLIIENLVAKSYSLLLSGDKNYLISN
 LSNTIEKINTLGLDSKNIAAYNTDESNNKYFGAISKTSQKSI IHYKKDSKNILEFYNDST
 LEFNSKDFIAEDINVEFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYLNE
 VYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFLDNISFWKLFGEFENINFDKYFTLVGKTNLGYVE
 FICDNKNIDIYEGEWKTSKSTIFSGNGRNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYPELYG
 IDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKWS
 TEGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNLVTGWQTINGK
 KYFDINTGAALTSYKIIINGKHFFYNNDGVMQLGVFKGPDGFYFAPANTQNNNIEGQAI
 VYQSKFLTTLNGKKYYFDNNSKAVTGWRI INNEKYFNPNAIAAVGLQVIDNNKYFNPD
 TAILSKGWQTVNGSRYYFDTDTAIAFNGYKTIDGKHFFYFSDCVVKIGVFNSTNGFEYFA
 PANTYNNNIEGQAI VYQSKFLTTLNGKKYYFDNNSKAVTGLQTDISKKYYFNTNTAEAAATG
 WQTDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQ
 IGVFKGPNGEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRI INNK
 KYFNPNAIAAIIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKG
 PNGFEYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTTLNGKKYYFDNNSKAVTGWQTDGKKYYFNL
 NTAEAAATGWQTDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFF
 FNTDGMQIGVFKGPNGEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTTLNGKKYYFGSDSKAVT
 GLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFFYFNTDGM
 QIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYFNGNNSKAATGWVTIDG
 NRYFEPNTAMGANGYKTI DNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAI
 RYQNRFLHLLGKIYYFNGNNSKAVTGWQTINGKYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV
 DGVKAPGIYG

SEQ ID NO:2 - secuencia de toxina B

MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAI LDAL EYHNMSSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI
 DTYKKSGRNKALKKFKYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD
 VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNDRFDYKFFRKRMEIYY
 DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKIQNSGNDV
 RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMPLGIQPDLFES

IEKPSVTVDFWEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSSEHFDMLDEEVQSSFESVVLASKSDKSEIF
 SSLGDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIIVKQIENRYKILNNSLNPAISE
 DNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFPPDVKTITINLSGPEAYAAAYQD
 LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEYKRNIFE
 GSLGEDDNLDFSQNIIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEACNLFAK
 TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT
 DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFYSYSINVEETYPGKLLLVK
 DKISELMPISQDSIIVSANQYEVIRINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF
 NPKENKITVKSKNLPELSTLLQEI RNNSNSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER
 IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIESI DALCDLKQONELEDSHFISFEDISETDEGFSIRF
 INKETGESIFVETEKTIFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTVNGKLVKKNLDTTHEVNTLN
 AAFFIQSLIEYNSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID
 LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIT
 SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD
 DKIMMPQDDLVISEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDIDHFFSAPSITYREPHL
 SIYDVLEVQKEELDLSKDLMLVLPNAPNRVFAWETGWTPGLRSLNDGTKLLDRIRDNYEG
 EFWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRS FIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG
 GTYALSLSQYNMGINIELSES DVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDIEGILSTLSIEN
 KIIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS
 NHIQQKIDYIGFNSLQKNIPYSFVDSSEKENG FINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMD
 DSKPSFGYYSNLLKDVKITKDNVNILTYLKD DDIKISLSLTLQDEKTIKLSNVHDES
 GVAEILKFMNRKGMTNTSDSLMSFLES MNIKSIFVNFLOSNIKFILDANFIISGTTISGQ
 FEFICDENDNIQPYFIKFNLTNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY
 LYGIDSCVNKVVISPNIYTDENITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY
 VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNFSKQDQVPVSEIILSFT
 PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFIYINNFMMVSGLIYINDSLYFKPPVNNLITGFVTVG
 DDKYFNPINGGAASIGETIIDDKNYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG
 EAI DFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYFYN
 SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA
 HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKKIYFDDSF TAVVWGKLDLEDGSKYFDEDTAEAYIG
 LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYIDDNGIVQIG
 VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD
 KYFNPETKKACKGINLIDDIKYFDEKIMRTGLISFENNNYFNENGENMQFGYINIED
 KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYI
 AATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:3 - secuencia de fusión 1

MGWQTDGKKYFNTNTAIASTGYTINGKH FYFNTDGIMQIGVFKGPNGF EYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKKYFSGSDSKAVTGWRIINNKYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNGF EYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTLNGKKYFDNDSKAVTGWQTDGKKYFNLNTAE
 AATGWQTDGKKYFNLNTAE AATGWQTDGKKYFNTNTFIASTGYTSINGKH FYFNTDGIMQIGVFKGPNGF E
 YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFSGSDSKAVTGLRTIDGKKYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYFN
 TNSIASTGYTII SGGKH FYFNTDGIMQIGVFKGPDGF EYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLDNIYFNGNS
 KAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGPNGF EYFAPANTDANNIEGQAIRYQ
 RFLHLLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVGVKAPGFVSINDNKHYFD
 DSGVMKVGYTEIDGKH FYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKKIYFDDSF T
 VVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNI DDNYFY
 IDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFN
 PETKKACKGINLIDDIKYFDEKIMRTGLISFENNNYFNENGENMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPD
 GFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:4 - secuencia de fusión 2

MGWQTDGKKYFNTNTAIASTGYTINGKH FYFNTDGIMQIGVFKGPNGF EYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKKYFSGSDSKAVTGWRIINNKYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNGF EYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTLNGKKYFDNDSKAVTGWQTDGKKYFNLNTAE

AATGWQTDGKKYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFSGSDSKAVTGLRTIDGKKYFNTNTAVAVTGWQTINGKKKYFN
 TNSIASSTGYTIIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNS
 KAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNR
 RFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYFMPDTAMAAAGGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFD
 DSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDEGPKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYFDDSF
 TAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNI
 DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSBGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFN
 PETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNNYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPD
 GFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:5 - secuencia de fusión 3

MGWQTDGKKYFNTNTAIASTGYTIIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKKYFSGSDSKAVTGWRIINNKKYFNPNAIAAHLCTINNDKYYFSYDGIHQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFDNDSKAVTGWQTDGKKYFNLNTAE
 AATGWQTDGKKYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFSGSDSKAVTGLRTIDGKKYFNTNTAVAVTGWQTINGKKKYFN
 TNSIASSTGYTIIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNS
 KAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAHHNEDLGNEEGEEISYSG
 ILNFNKIIYFDDSF
 TAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSD
 SGIIESGVQNI
 DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSBGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIET
 GWIYDMENESDKYFN
 PETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNNYFNENGEMQFGYINIEDKMF
 YFGEDGVMQIGVFNTPD
 GFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:6 - secuencia de fusión 4

MGWQTDGKKYFNTNTAIASTGYTIIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKKYFSGSDSKAVTGWRIINNKKYFNPNAIAAHLCTINNDKYYFSYDGIHQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFDNDSKAVTGWQTDGKKYFNLNTAE
 AATGWQTDGKKYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFSGSDSKAVTGLRTIDGKKYFNTNTAVAVTGWQTINGKKKYFN
 TNSIASSTGYTIIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNS
 KAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNR
 RFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYFMPDTAMAAAGGETIIDDKNYFNQSGVLQTVFSTEDGFKYFA
 PANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGM
 QKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDEGPKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
 LNFNKIIYFDDSF
 TAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDS
 GIIESGVQNI
 DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSBGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIET
 GWIYDMENESDKYFN
 PETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNNYFNENGEMQFGYINIEDKMF
 YFGEDGVMQIGVFNTPD
 GFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIDGEEYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:7 - secuencia de fusión 5

MGWQTDGKKYFNTNTAIASTGYTIIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKKYFSGSDSKAVTGWRIINNKKYFNPNAIAAHLCTINNDKYYFSYDGIHQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFDNDSKAVTGWQTDGKKYFNLNTAE
 AATGWQTDGKKYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFE
 YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFSGSDSKAVTGLRTIDGKKYFNTNTAVAVTGWQTINGKKKYFN
 TNSIASSTGYTIIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNS
 KAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNR
 RFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAPGIYGGGFVSINDN

KHYFDSDGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFD
 DSFTAVVGWGDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNI
 DNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENES
 KYFFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGI MRTGLISFENNNYFNENGENM QFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGV
 FNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

MASTGYTSINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVT
 GLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFA
 PANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYFNGNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGL
 PQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAA
 GGLFEIDGVIYFFGVDGKAP

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

MILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNFSKQDVPVSEIILSFTPSYEDGLIGYDLGLVSLYNEKF
 YINNFMMVSGLIYINDSLYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDKNYFNGSGVLQTV
 FSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIG
 DYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
 EEEIISYSGILNFNNKIYYFDSDFTAVVGWGDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVT
 INDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVVRVGEDV
 YFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGI MRTGLISFENNNYFNENGENM QF
 GYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVI
 DGEEYFDPDTA

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

MGWQTIIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNAIAAIAHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFDNDSKAVTGWQTIIDGKYYFNLNTAE
 AATGWQTIIDGKYYFNLNTAEEAATGWQTIIDGKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGF
 YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFN
 TNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYFNGNS
 KAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQ
 RFLHLLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAP

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

MGWQTIIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNAIAAIAHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFDNDSKAVTGWQTIIDGKYYFNLNTAE
 AATGWQTIIDGKYYFNLNTAEEAATGWQTIIDGKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGF
 YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFN
 TNTSIASTGYTIIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYFNGNS
 KAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQ
 RFLHLLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAAG

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

MGWQTIIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
 LTLNGKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNAIAAIAHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANN
 ESKMVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFDNDSKAVTGWQTIIDGKYYFNLNTAE
 AATGWQTIIDGKYYFNLNTAEEAATGWQTIIDGKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPNGF
 YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFN

TNTSIASTGYTIIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNS
KAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTI DNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEY

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

MGWQTI DGKKYYFNTNTAIASTGYTI INKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
LTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRI INNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANN
ESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTI DGKKYYFNLNTAE
AATGWQTI DGKKYYFNLNTAEAAATGWQTI DGKKYYFNTNTFIASTGYTS INKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFE
YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFN
TNTSIASTGYTIIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNS
KAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTI DNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNR
FLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAAG

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

MGWQTI DGKKYYFNTNTAIASTGYTI INKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEF
LTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRI INNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANN
ESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTI DGKKYYFNLNTAE
AATGWQTI DGKKYYFNLNTAEAAATGWQTI DGKKYYFNTNTFIASTGYTS INKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFE
YFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFN
TNTSIASTGYTIIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNS
KAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTI DNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNR
FLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAPGIYG

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

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNEDLGNEEGEEISYSGILNLF
NKKIYYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGII
ESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLV RVGEDVYFGETYTIETGWI
YDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYFDEK GIMRTGLISFENNNYFNENGENMQFGYINIEDKMFYFGE
DGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQL
VISE

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

GLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHH
NEDLGNEEGEEISYSGILNLFNKKIYYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIM
QVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLV
RVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYFDEK GIMRTGLISFENNNYFNE
NGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAA
TGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

FAHNEDLGNEEGEEISYSGILNLFNKKIYYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFND
DGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANTVNDNIYQAVEY
SGLV RVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYFDEK GIMRTGLISFENNNY
YFNENGENMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDE
YIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

GETIIDDKNYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKEL
DGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQ

IGVFNTEDEGFKYFAHNNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYFFDDSF TAVVWGKDLDEGSKYFFDEDTAEAYIGL
SLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANT
VNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYFFGETYTIETGWIYDMENESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGM
RTGLISFENNNYYFNENGENMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYFFTDEYIAATGSVIIDGEEYFFDPDTAQLVISE

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

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYAENGENMQIGVFNTEDEGFKYFAHNNEDLGNEEGEEISYSGILNFN
NKNIIYFFDDSF TAVVWGKDLDEGSKYFFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGI
ESGVQNIIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYFFGETYTIETGWI
YDMENESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNNYYFNENGENMQFGYINIEDKMFYFG
DGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFFTDEYIAATGSVIIDGEEYFFDPDTAQL
VISE

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAACGGCA
AACACTTTTATTTTAAACCCGACCGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCGGAACCGCTTGAATACCTTTGCACCCGCAAAATACCGATGC
CAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCTGAACCGCAAAAATACTACTTTGGCAGCGATAGCAAAAGCAGTT
ACCGGTTGGCCGATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACCATTAACAACGACAAAT
ATTATTTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAAGCGCAAACTTTTATTTCGATGCCAACACGAAAGCAAAATGGT
GACCCGCTGTTTCAAAAGGCCCTAATGGTTTTGGATTTTCGCTCCGGCAACACCCATAATAACAACATTTGAAGGTCAGCGGATCGTTTATCAG
AACAAATTCCTGCACGCTGAATGTAAGAAATACATTTTCGATAATGACAGCAAAAGCGCTGCACCGCTGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATT
ACTTTAATCTGAATACCGCAGAACGACCAACCGGTTGGCAACGATCGACGGTAAAAAGTACTACTTCAACCTGAACACAGCCGAGCAGCCAC
AGGATGGCAGACTATTGATGGAATAAATACTATTTCACACCAACACCTTTATTGCATCTACCCGTTATACCAGCATTAAACGGTAAACATTTTC
TACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGCGCTTTTCAAAAGGTCCAAATGGTTCGAATACTTTGCCCTGCCAATACAGATGCAAAATAACA
TCGAGGCTCAGGCAATCTGTACCAAAACAATTTCTGACCCTGAATGGGAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAGCCGTTACCGCTCT
CCGTACCATTTGATGTAATAAATACTACTTTAATACGAATACAGCCGTTCCGCTTACAGGCTGGCAGACCAATTAAACCGCAAAAATACTATTTT
AACACAATACCCAGCATTGCCTCAACCGGTTATACCATTATTTCCGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGTTATTATGCAAAATCCGGAGTCT
TTAAAGGACTTGATGGTTGCAATATTTTGGCCCTGGCAACTGATGCGAACAATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAAATCCGTTCT
GTATCTGCACGACCAACATCTATTATTTTGGCAACAATTCAAAAGCAGCCACCCGCTGGTTACAATGATGGCAACCCGCTACTATTTCGAAACCG
AATACCGCAATGGGTGCAAAATGGCTACAAAACCATCGATAATAAAATTTCTATTTTCGCAACGGCTGCGCCGAGATCGGGTATTTAAAGGTA
GCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCAGCGAATACGGACGCAACAATTTGAGGGTCAAGCGATTCTGTTATCAAAACCGTTTCTGTCATCTGCT
GGGCAAAATCTACTACTTTGGCAATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTATGCGCGATACCGCC
ATGGCAGCAGCCGGTGTCTGTTTGAATTTGATGGCTGATCTATTTTGGTGTGGATGGTGTAAAGCACCAGGAAATACCGGTTACCGGTTACCG
GCTTTGTGACCGGTGGTGAATGATAAATACTATTTCATCCGATTAACCGTGGTGCAGCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGCAAAAACCTA
TTATTTCAACCAGACCGGCTGTCTGCAGACCGGCTGTTTAGCACCGAAGATGGCTTTAAATATTTTCGCCACCGAACACCCCTGGATGAAAC
CTGGAAGGCGAAGCGATTGATTTTACCGGCAACTGATCATCGATGAAACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTGGGCGGAATGGA
AAGAACTGGATGGCGAAATGCAATTTTCTCCGAAACCGGTAAGCGTTTAAAGCCCTGAACCGATCGCGGATTACAATACTACTTCAA
CAGCGATGGCGTATGCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGCTATACCGAA
ATTGATGGCAAAACTTTCTACTTCCGCGGAAACCGCGAAATGCAGATTGGCGTGTTCATACCGAAGATGGTTTCAAAATCTTCCGCAACCAT
ACGAAGATCTGGTAAACGAAGAAGGCGAAGAAATFAGCTATAGCGGATCCTGAACTTCAACAACAATACTACTACTTTGATGATAGCTTTAC
CGCGGTGGTGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAAATATTTCGATGAAAGATACCGCGAAGCGTATATTGGCCCTGAGCCTGATTAAC
GATGGCCAGTACTATTTTAAACGATGATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAAATGATAAAGTGTCTATTTCAGCGATAGCGGCATTA
TTGAAAGCCGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTGCAGATCGGCGTTTGTGATACCAGCGATGGCTA
CAAAATATTTCGACCCGCAATACCCCTGAACCATAACTTTATGCCCCAGCGCTGGAATATAGCGCTCTGGTGGCTGTGGCCCAAGATGCTGAT
TATTTCCGCGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATATGGAACGAAAGCGATAAATATTACTTTAATCCGGAACGAAAAAG
CGTGCAAAGGCATTAACCTGATCGATGATCAATACTATTTTATGAAAGGCATTATGCGTACCGCTGATTAGCTTCGAAACAAACAA
CTATTACTTCAACGAAACCGGTGAATGCACTTCGGCTACATCAACATCGAAGATAAATGTTCTACTTCGGCGAAGATGGTGTATGCAGATT
GGTGTTTTAAACCCCGGATGGCTCAAAATCTTTCCTCATCAGAAATCCCTGGATGAAAATTTGGAAGGTGAAGCATTAACTATACCGGCT
CGCTGCATCTGGATGAAAAACCGCTACTACTTCAACCGATCAATACATTCGCGCCAGCCGACCGCTGATTATTGATGGCGAAGAAATACTACTTCCA
TCCGATACCGCGCAGCTGGTATTAGCGAACATCATCATCACCAT

SEQ ID NO :21 - secuencia de aminoácidos de F54Gly

MATGWQITIDGKRYFNNTAIASGTIINGKHFFYFNTDGMQIGVFKPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLN
GKRYFSGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNNIAAHLCTINNDKYYFSYDGI LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVF
KPNPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKYYFDNDSKAVTGWQITIDGKRYFNLNTAEAAATGWQITIDGKRY
FNLNTAEAAATGWQITIDGKRYFNNTFIASGTYSINGKHFFYFNTDGMQIGVFKPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILY

QNKFLTLNGKYYFGSDSKAVTGLRITDCKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYFNGNSKAATGWVITDGNRYFEPNTAMGANGYKT
 IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKYYFMP
 DTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAPGIYGGTGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYFNFQSGVLQTVFVS
 TEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKELDGMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
 SDGVMQKGFVSINDKNHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGENQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEISYSGLI
 NFNKNIYFDDSFYAVVWVKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYFNDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESG
 VQNIIDNRYFIDDNGIYQIGVFDTSDCYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETCWIYDMENESD
 KYYFNPETKACKGINLIDDIKYFDEKIMRTGLISFENNYYFNENGENMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPD
 GFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISEHHHHH

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCATACCATATTCAACGGCA
 AACACTTTTATTTTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGTCCGAAACCGGCTTTGAATACTTGCACCGGCAAAATACCGATGC
 CAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCCTGAACGGCAAAAAATACACTTTGGCAGCGATAGCAAAAGCAGTT
 ACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACCATTAAACACGCAAAAT
 ATTATTCAGCTATGACGGTATCTGCAGAAATGGCTACATTACCATCGAAGCAACAACCTTTTATTTCGATGCCAACACGAAAGCAAAATGGT
 GACCGGTGTTTCAAAGGCCATAATGGTTTTGGATATTTGCTCCGGCAACCCATAATAACAACATTGAAGGTCAGGCGATCGTTTATCAG
 AACAAATTCCTGACCGTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAGCCGTCACCGGCTGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATT
 ACTTAAATCTGAATACCGCAGAACGAGCAACCGGTTGGCAAAACGATCGACGGTAAAGGACTACTTCAACCTGAACACAGCCGAAAGCAGCCAC
 AGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAATACTATTTCACACCAACACCTTTATTGCATCTACCGGTTATACCCAGCATTAAACGGTAAACATTTCT
 TACTTCAACACCGGATATCATCAGATCGCGGTTTCAAAGTCCAAATGGTTTCGAATACCTTTGCCCTGCCAATACAGATGCAAAATAACA
 TCGAGGGTTCAGGCAATCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCCTGAATGGGAAAAAATACTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGCT
 GCGTACCATTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACACCGGTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAAACGGGAAAAAATACTATTTT
 AACCAAAATACAGCATTGCTCTAACCGGTTATACCATTTATTCGGGTAACACTTCTACTTTAATACCGATGCTTATTGCAAAATCGGAGTCT
 TTAAGGACCTGATGGTTGCAATATTTTGGCCCTGCAACACTGATGCGAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAAATCGCTTTCT
 GTATCTGCACGCAACACTTATTATTTGGCAACAATTCAAAAGTCCAAATGGTTTCGAATACCTTTGCCCTGCCAATACAGATGCAAAATAACA
 AATCCGCAATGGGTCAAATGGCTACAAAACCATCGATAAATAAAATTTCTATTTTCGCAACCGGCTGCCGACAGATCGGGGATTTAAAGGTA
 GCAACCGGCTTCGAATACTTCGCTCCAGGCAATACGGACCGCAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCTGTTATCAAAACCGTTTTCTGCATCTGCT
 GGGCAAAATCTACTACTTTGGCAATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCGGATACCGCC
 ATGGCAGCAGCCGGTGTCTGTTTGAATATGATGGCGTATCTATTTTGGTGTGGATGGTGTAAAGCAGTTACCGGCTTTGTGACCGTGG
 GTGATGATAAATACTATTCAATCCGATTAACCGTGGTGCAGCGAGCATTTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAAACTATTATTCAACCCAGG
 CGGTGCTGCAGACCGTGTCTTTAGCACCGAAGATGGCTTTAATATTTTGGCCGACGCAACCCCTGGATGAAAACTTGAAGCGGAAGCG
 ATTGATTTTACCGCAAACTGATCATCGATGAAAACATCTATTACTTCGATGATACTAFCGTGCTGCGGTGCAATGCAAGAACTGGATGGCG
 AAATGCATTTATTTCTCCGAAACCGGTAAGCGGTTAAAGGCTGAACAGATCGCGGATTACAAATACACTTCAACAGCGATGGCGTAT
 GCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGGCTATACCGAAATGATGGCAACAT
 TTCTACTTCGCGGAAACCGCGAAATGCAGATTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGTTTCAAACTTTCGCGCACCATTAACGAAGATCTGGGTA
 ACGAAGAAAGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGCATCTGAACTTCAACAAACAAATCTACTACTTTGATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGGCTG
 GAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAAATATTATTTCGATGAAAGATAACCGGAAAGCGTATATTGGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTAT
 TTTAACGATGATGGCATTATGACAGGTGGGTTTCGTGACCATTAATGATAAAGTGTCTATTTACAGGATAGCGGCATTATTGAAAGCGCGGTGC
 AGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACCGCATTTGTGCAGATCGCGGTTTTTGTATACCAGCGATGGCTACAAATATTTCCGACC
 GGCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAATATAGCGGCTGCTGCTGCTGCTGGGCGAAGATGTGATTTATTTCCGCGAAACC
 TATACCATCGAAACCGGCTGATTTATGATATGAAAAACGAAAGCGATAAATATTACTTTAATCCGAAACGAAAAAGCGTCAAAAGGCATTA
 ACCTGATCGATGATATCAAAATACTATTTGATGAAAAAGGCATTATGCGTACCGGCTGATTAGCTTCGAAAAACAACACTATTACTTCAACGA
 AAACGGTGAATGCACTTCGCTACATCAACATCGAAGATAAATGTTCTACTTCGCGGAAAGATGGTGTATGACAGATTGGTGTTTTAAACACC
 CCGGATGGCTTCAAAATCTTTGCCATCAGAAATACCCCTGGATGAAATTTGCAAGGTGAAAGCATTAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATG
 AAAAAACCTACTACTTCCAGGATGAATACATTGGCCGACCGGCGAGCGTATTATTGATGGCGAAGAAATACTACTTCCATCCGGATACCGCGCA
 GCTGGTGAATAGCGAACATCATCATCAACCAT

SEQ ID NO :23 secuencia de aminoácidos de F54 New

MATGWQITDCKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNDFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
 EFLTLNGKYYFGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSDGILQNGYITIERNNFYFDANNESK
 MVTGVFKGPNDFEYFAPANTHNNNIEGQAIYVQNKFLTLNGKYYFNDNSKAVTGWQITDCKKYYFNLNTAEAAATGWQTI

DGKKYYFNLNTAEAAATGWQITIDGKKYYFNTNTP IASTGYTSSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIE
 GQAILYQNKFLTLNKKYYFGSDSKAVTGLRITIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQITINGKYYFNTNTS IASTGYTIIISGKHF
 YFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMG
 ANGYRTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQITINGK
 VYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIIYFVGVDGKAVTGFVTVGDDKIYFNFINGGAASIGETLIDDKNYYFNQSGVLQTVGF
 STEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVENKELDGEHMYFSPETGKAFKLNQIGDYKYFF
 NSDGMVQKGFVSIINDNKHYPDDSGVMKVCYTEIDGKHFYFAENGEMQICVFNTEDEGFKYFAHNEDLGNEEGEEIISYSGI
 LNFNKKIYYFDDSFYAVVGMKLEDDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGMQVGFVTINDKVFYFSDSGLIES
 GVQNIIDNYYFIDNIGVIGVDFDSDGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYFGEYTYTETGWIYDMENES
 DKYFNPETKACKGINLIDDIKYFDEKGMIRGLISFENNYYFNENGMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTP
 DGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISEHHHHHH

SEQ ID NO :24 secuencia de nucleótidos de F5 ToxB

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAACGGCA
 AACACTTTTATTTTAAACACCGACCGCATTATGCGAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCGCAACCGGCTTTGAATACCTTTCACCCGCAAAATACCGATGC
 CAATAATATGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCGCAACCGCAAAAAATACTACTTTGGCAGCGATAGCAAAGCAGTT
 ACGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGCAATATGCAATTCGAGCAATTGATCTGTGCACCATTAACAACGACAAAT
 ATTATTTGAGCTATGACGGTATTCTGCAGAAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTTCGATGCCAACAAAGCAAAATGTT
 GACCGGTGTTTTCAAGGCCCTTAATGGTTTTGAGTATTTGCTCCGGCAACACCCATAATAACAACATGAAGGTCAGGCGATCGTTTTATCAG
 AACAAATTCCTGACCGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAAGCCGTCACCGGCTGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATT
 ACTTAACTGTAATACCGCAGAACGACGCAACCGGTTGGCAACGATCGACGGTAAAAAGTACTACTTCAACCTGAACACAGCCGAAGCAGCCAC
 AGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAATACTATTTCACACCAACCAACCTTTATTGCACTTACCGGTTATACCAGCATTAAOCCGTAACCATTTT
 TACTTCAACCCGATGGTATATGCGAGATCGGGTTTTTCAAGGTCGCAATGTTTTGGAATACTTTGCCCCGCAATACAGATGCAAAATTAACA
 TCGAGGCTCAGGCAATCCGTGACCAAAACAATTTCTGACCCGTAATGGGAAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGCT
 GCGTACCATTTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCCGTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGGAAAAAATACTATTTT
 AACACAAATACCGCATTGCTCAACCGGTTATACCATTATTTCGGGTAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAAATCGGAGTCT
 TTAAGGACCTGATGGGTTGCAATTTTTCGGCTGCGAACACTBATGCGAACAAATGCGAAGGACAGGCAATCGGCTATCAGAAATCGCTTTCT
 GTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAACAATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATGATGGCAACCCGCTACTATTTCGAAACCG
 AATACCGCAATGGGTGCAATGGCTACAAAACCATCGATAATAAAAAATTTCTATTTTCGCAACCGGCTGCGCGCAGATCGGGTATTTAAAGGTA
 GCAACCGCTTCGAAATCTTGGCTCCAGCGAATACGGACCGCAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCTGTTATCAAAACCGTTTCTCCATCTGCT
 GGGCAAAATCTACTACTTTGGCAATAACAGTAAAGCAGTTACTGATGACGACCAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGATACCGCC
 ATGGCAGCAGCGGTTGCTGTTTTGAAATGATGGCTGATCTATTTTTTGGTGGATGGTGTAAAGCAGTGAGCGGCTGATTTTATATTA
 ACGATAGCCTGTATTACTTTAAACCCCGGTGAATAACCTGATTACCGGCTTTGTTGACCGTGGGTGATGATAAATACTATTTCARTCCGATTAA
 CGGTGGTGCAGCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAAACTATTATTTCAACCCAGAGCGGTGTGCTGCAGACCGGTTGTTTTAGCACC
 GAAGATGGCTTTAAATATTTCGCGCAGCGAACCCCTGGATGAAAACCTGGAAGGGGGAAGCGATTGATTTTACCGGCAAACTGATCATCGATG
 AAAACATCTATTACTTCGATGATACTATCGTGGTGGGTGGAATGGAAGAACGATGATGGCGAAATGCATTATTTTCTCCGGAAACCGGTA
 AGGTTTTAAAGGCTGAACCGATCGGGGATTACAATACTACTTCAACAGCGATGGCGTATGCGAAAGGCTTTGAGGATCAACGATAAC
 AAACACTATTTTCGATGATAGCGGTGATGAAAGTGGGCTATACCGAAATTSATGGCAAAACTTTCTACTTCCGGAAAAACCGGCAAAATGCAGA
 TTGGCGTGTTCATACCGAAGATGGTTCAAAATCTTCGCGCACDACAACGAGATCTGGGTAAACGAAAGCGGAAAGAAATAGCTATAGCGG
 CATCCTGAACTTCAACAACAAAATCTACTACTTTGATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGGCTGGAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAAATATTAT
 TTGATGAAAGATACCGCGAAGCGTATATTGGGCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAAAGATGATGGCATTATGCAAGTGGGTT
 TCGTGACCATTAATGATAAAGTGTCTATTTTCAGCGATAGCGGCATTATTGAAAGCGGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGA
 TGATAACCGCATTTGTGCAGATCGGCTTTTTGATACCGCGATGCTACAAATAATTTCCGACCGGCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGC
 CAGCGGTGGAATATACCGCTGCTGGCTGTTGGCGAAGATGTGTATTATTTTCGCGCAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATA
 TGGAAACGAAAGCGATAAATAATTACTTTAATCCGAAACGAAAAAGCGTGCAAAGGCATTAACTGATCGATGATATCAAAATCTATTTTGA
 TGAAAAAGGCATTATGGTACCGGCTGATTAGCTTGGAAAAACAACAATATTACTTCAAAGAAAAACGGTGAATGCAAGTTCGGCTACATCAAC
 ATCGAAGATAAATGTTCTACTTCCGCGAAGATGGTGTATGAGATTTGGTGTTTTTAACACCCCGGATGGCTTCAAAATCTTTGCCATCAGA
 ATACCTTGGATGAAAATTTGAAAGGTGAAAGCATTAACTATAACCCGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCCCGATGAAATACAT
 TGGCGGACCGGCGAGCGTATTATTGATGGCGAAGAACTACTTTCGATCCGATAACCGCGAGCTGGTATTAGCGAACATCATCATCATC
 CAT

SEQ ID NO: 25 secuencia de aminoácidos de F5 ToxB

MATGWQITIDGKKYYFNTNTA IASTGYTIIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQ

EFLTLNGKYYFSGSDSKAVTGWRIINNKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGLQNGYITIERNNFYFDANNESK
MVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAIYVQNKFLTLNGKYYFDNDSKAVTGWOTIDGRKYYFNLNTAEAAATGWQTI
DGKYYFNLNTAEAAATGWQTIIDGKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFRKNGFEYFAPANTDANNIE
GQAILYQNKFLTLNGKYYFSGSDSKAVTGLRTIDGKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASTGYTIIISGKHF
YFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMG
ANGYKTIIDKNFYFRNGLFQIGVFKGNGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGK
VYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVGVKAVSGLIYINDSLYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGE
TIIDDKNYFFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYF
SPETGKAFKGLNIGDYKYFNSDGVMDQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIYYFDDSFYAVVGVKDLLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQ
VGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDNYFIDDNGIVQIGVFDTSDCYKYFAPANTVNDNIYQQAWEYSGLVRVGEDV
YYPGETYTIETGWYDMENESDKYYFNPETKKAOKGINLIDDIKYFDEKIMRTGLISFENNNYFENNGEMQFGYINI
EDKMFYFGEIDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIIDGEEYFDDP
TAQLVISEHHHHH

SEQ ID NO :26 - secuencia de nucleótidos de F52 New

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAAATACCAACACCGCAATGCAAGCACCGGCTATACCATATTCAACGGCA
AACACTTTTATTTTAAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACITTTGCACCGGCAAAATACCGATGC
CAATAATATTGAAGGCCAGGCCATCTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCCTGAACGGCAAAAAATACACTACTTTGGCAGCGATAGCAAAAGCAGTT
ACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAAATATGCAATGTCAGCAATTCATCTGTGCACCATTAACAACGACAAAT
ATTATTTACAGCTATGACCGTATTTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACCTTTTATTTTCGATGCCAACACGAAAGCAAAATGTT
GACCGGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTTGAGTATTTCTGCTCCGGCAAAACACCATAAACAACATTGAAGGTCAGGCGATCGTTTTATCAG
AACAAATCTCTGACCGTGAATGGTAAGAAATACTATTTTCGATAATGACAGCAAGCCGTTGACCGGCTGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATT
ACTTTAATCTGAATACCCGAGAACGAGCAACCGGTTGGCAAAACGATCGACGGTAAAGGACTACTTCTCAACCTGAACACAGCCGAGCAGCCAC
AGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAATACTATTTCAACACCAACACCTTTATTGCATCTACCGGTTATAACAGCATTAAACGGTAAACATTTTC
TACTTCAACACCGGATGGTATCATGCAGATCGCGGTTTTCAAAGGTCGCAATGGTTTCGAATACITTTGCCCTTGCATCAGATGCAAAATAACA
TCGAGGGTTCAGGCAATCGCTACCAAAAACAAATTTCTGACCCCTGAATGGGAAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGCTCT
GCGTACCATTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCCGTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAAACGGGAAAAAATACTATTTT
AACACAAATACAGCATTGCCTCAACGGGTTATACCATTTATTCGGGTAACACTTCTACTTTAATACCGATGCTATTATGCAAAATCGGACTCT
TTAAAGGACCTGATGGTTCGAATATTTTGGCCCTGCGAACACTGATCGCAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCT
GTATCTGCAGCAACACTATTTATTTTGGCAACAATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATGATGGCAACCCGCTACTATTTGCAACCG
AATACCGCAATGGGTCAAAATGGCTACAAAACCATCGATAATAAAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCCGAGATCGGGGTTATTTAAAGGTA
GCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCAGGCAATACGGACCGCAACAATATGAGGGTCAAGCGATTCTGTTATCAAACCGTTTTCTGCATCTGCT
GGGCAAAATCTACTACTTTGCAATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCGGATACCGCC
ATGGCAGCAGCCGGTGTCTGTTTTGAAATGATGGCGTATCTATTTTTTGGTGTGGATGGTGTAAAGCAGTAAAGCCCTGAACAGATCG
CGATTACAATACTACTTCAACAGCGATGGCGTATGCAAGAAAGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAACAACACTATTTTCGATGATAGCGGTGT
GATGAAAGTGGGCTATACCGAAATGATGGCAAAACATTTCTACTTTCGCGGAAAAACCGGCAAAATGCAGATTGGCGTGTCAATACCGAAGATGGT
TTCAAATCTTCGCGCACCAATAACGAAGATCTGGGTAACGAAGAGGCGAAGAAATAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAACAAATCT
ACTACTTTGATGATACCTTTACCGCGCTGGCTGGCTGCAAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAAATATTTTCGATGAAGATACCGCGAAGCGTA
TATTGGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAAACGATGATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAATGATAAAGTGTTC
TATTTACGCGATAGCGGCATTATGAAAAGCGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTGCAGATCGCGG
TTTTTGATACCAGCGATGGCTACAAATATTTGCAACCGGCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGCGGTGGAATATAGCGGCTGGT
GCCTGTGGCCGAAAGATGTGATTTATTTGCGCGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATATGGAAAACGAAAGCGGATAAATATTAC
TTTAAATCCGAAACGAAAAAGCGTGCAAAAGCATTAAACCTGATCGATGATATCAAATACTATTTTTCGATGAAAAGCCATTATGCGTACCGGTC
TGATTAGCTTCGAAAACAACAATATTACTTCAACGAAAACCGTGAATGCAGTTCCGGCTACATCAACATCGAAGATAAAATGTTCTACTTCCGG
CGAAGATGGTGTATGCGATTTGGTGTTTTTAAACCCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCCCCATCGAATACCCCTGGATGAAAATTTGCAAGGT
GAAAGCATTAACTATACCGGCTGGCTGGATGAAAACCGCTACTACTTTCACCGATGAAATACATTTGCGGCGACCGGCGAGCGTATTATTG
ATGGCGAAGATACTACTTCGATCCGATACCGCGCAGCTGGTATTGCGAACATCATCATCAACCAT

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

MATGWQTIIDGKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLN

GKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGIHQNGYITIERNNFYFDANNESKMTGVF
 KGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYY
 FNLNTAEAAATGWQTDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILY
 QNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASSTGYTIIISCKHFYFNTDG
 IMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKT
 IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMP
 DTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAVKGLNQGIDYKYYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFY
 FAENGEMQIGVFNTEDGKRYFAHNNEDLGNNEEGEEISYSGILNFNKIIYFDDSPFAVVGWKLDEGSKYYFDEDTAEAY
 IGLSLINDGQYFNDGIMQVGFVTINDKVPYFSDSGIIESGVQNIIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSBGYKYFAPANTVN
 DNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISF
 ENNNYFENGEMQGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGKRYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDE
 YIAATGSVIDGEYYFDPDTAQLVISEHHHHH

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

MATGWQTDGKKYYFNTNTAIASSTGYTIIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
 EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGIHQNGYITIERNNFYFDA
 NNESKMTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTDGKKYYFNLNT
 AEAATGWQTDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNG
 FEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYY
 FNTNTSIASSTGYTIIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLYLHDNIYYFGN
 NSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
 QNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAPGIYG

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

MATGWQTDGKKYYFNTNTAIASSTGYTIIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
 EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGIHQNGYITIERNNFYFDA
 NNESKMTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTDGKKYYFNLNT
 AEAATGWQTDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNG
 FEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYY
 FNTNTSIASSTGYTIIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLYLHDNIYYFGN
 NSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
 QNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAV

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

MATGWQTDGKKYYFNTNTAIASSTGYTIIINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
 EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGIHQNGYITIERNNFYFDA
 NNESKMTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTDGKKYYFNLNT
 AEAATGWQTDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPNNG
 FEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYY
 FNTNTSIASSTGYTIIISGKHFYFNTDGMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRYQNRFLYLHDNIYYFGN
 NSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDNGFEYFAPANTDANNIEGQAIIRY
 QNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGKAV

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

MATGWQTI DGKKYFNTNTA IASTGYT IINGKHFFNTD GIMQIGVFKGPNGF EYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGKKYFSGSDSKAVTGWRIINNKKYFNPNAIAA IHLCTINNDKYFSDGILQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGF EYFAPANTHNNNIEGQAI VYQNKFLTLNGKKYFDNDSKAVTGWQTI DGKKYFNLNTAEAATGWQTI DGKKYFNTNTF IASTGYTSINGKHFFNTD GIMQIGVFKGPNGF EYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYFSGSDSKAVTGLRTIDGKKYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYFNTNTS IASTGYT IISGKHFFNTD GIMQIGVFKGPDGF EYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLYLHDNIYFNGNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSDGF EYFAPANTDANNIEGQAI RYQNRFLHLLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVGDGVKAV

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

TGFVTVGDDKYYFNPI NGGAAS IGETI IIDDKNYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLI IDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKNIYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNNYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

TGFVTVGDDKYYFNPI NGGAAS IGETI IIDDKNYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLI IDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKNIYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNNYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

SGLIYINDSLYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPI NGGAAS IGETI IIDDKNYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLI IDENIYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKNIYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNNYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

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

KGLNQIGDYKYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKNIYFDDSF TAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNNYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

FIGURA 2

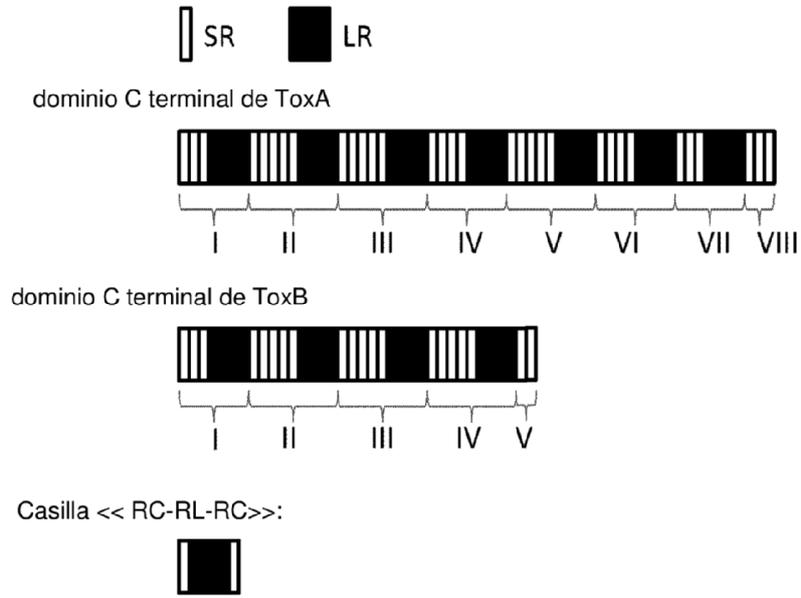


FIGURA 3

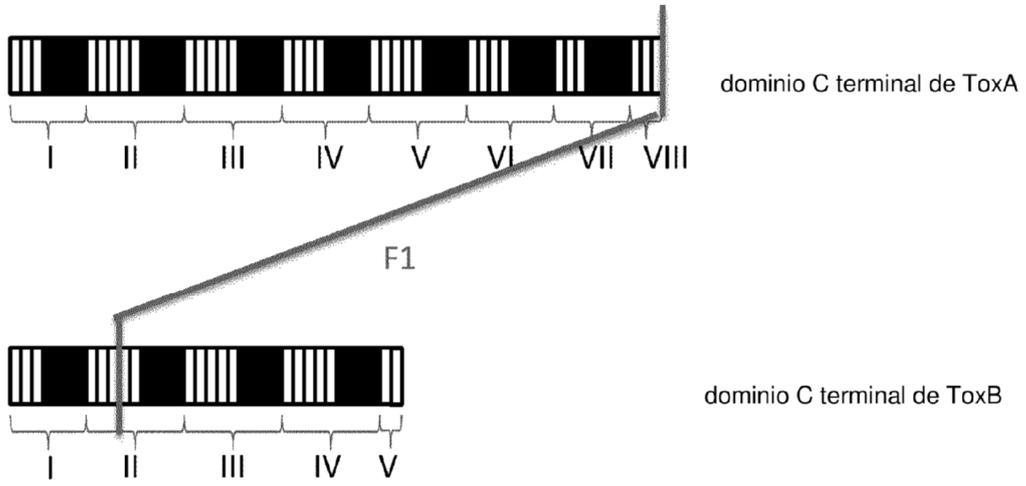


FIGURA 4

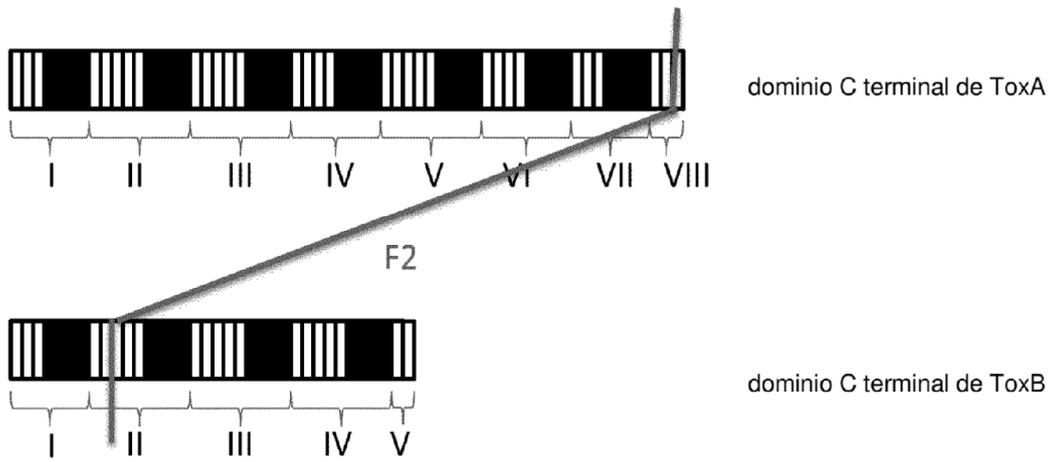


FIGURA 5

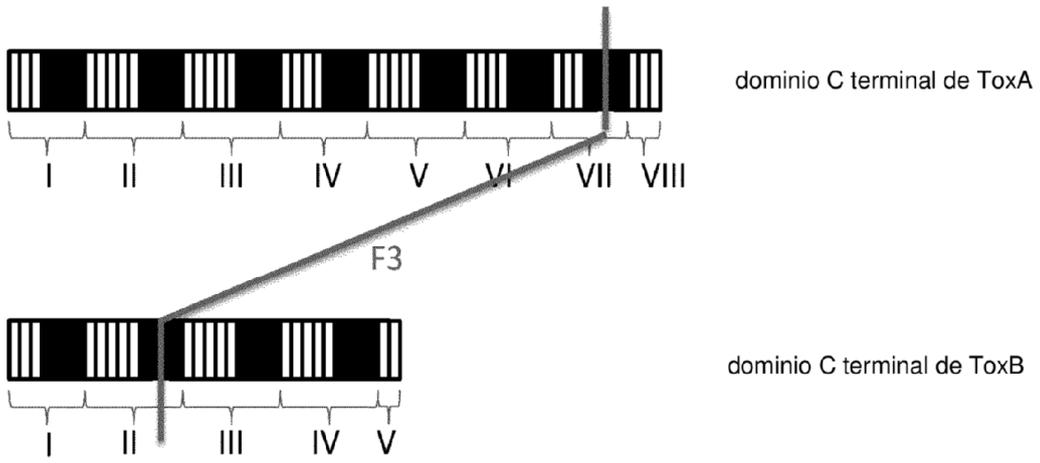


FIGURA 6

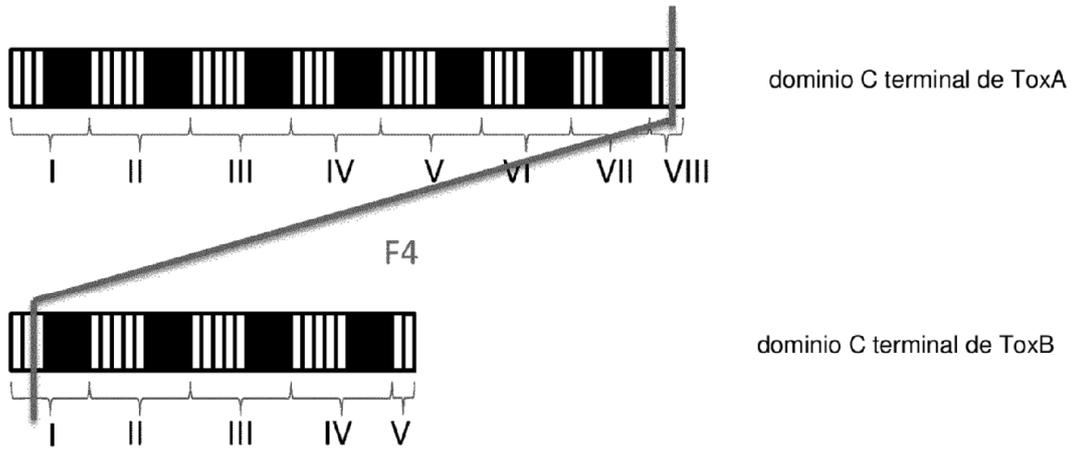


FIGURA 7

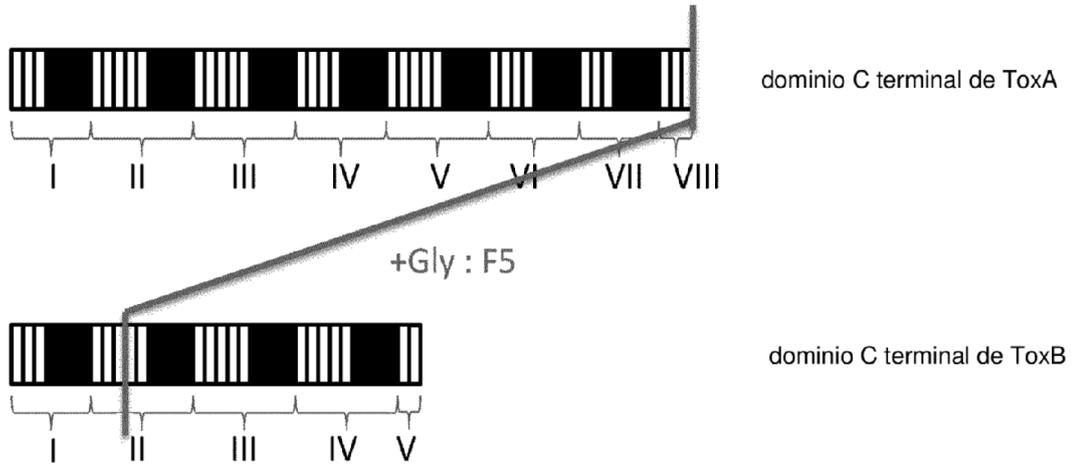
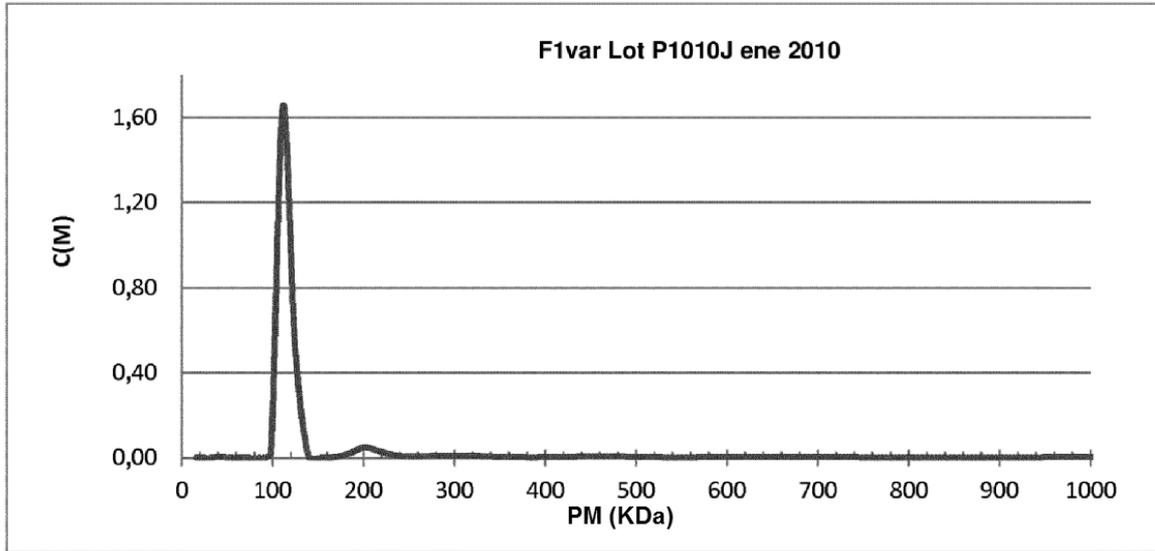
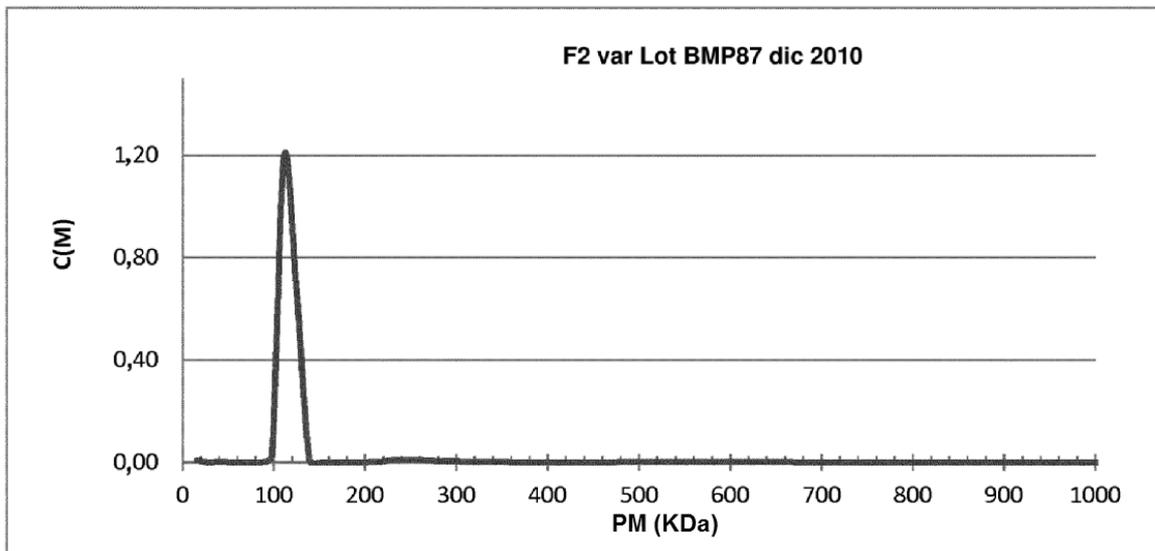


FIGURA 8

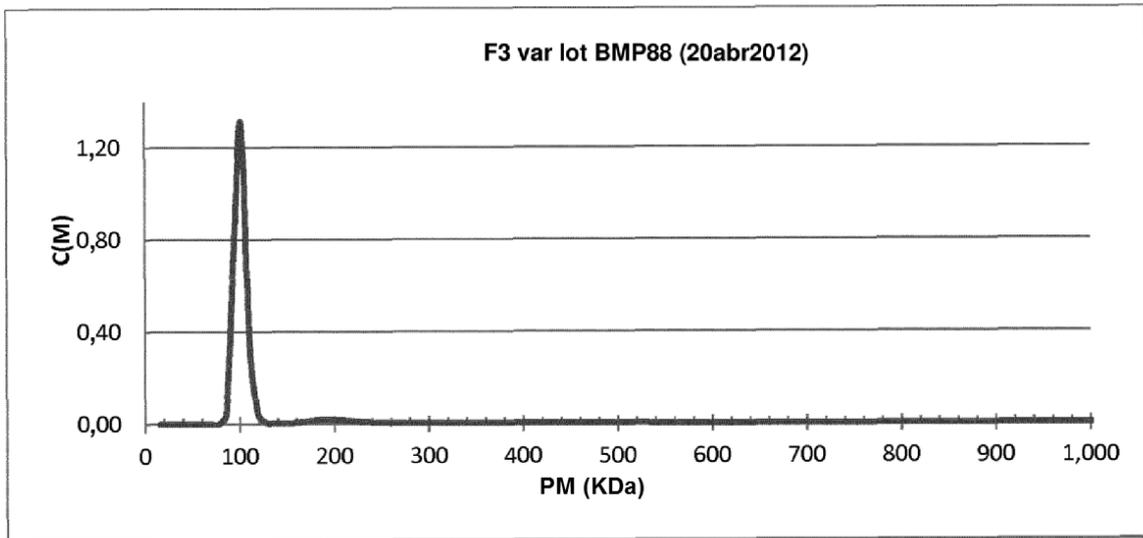
a)



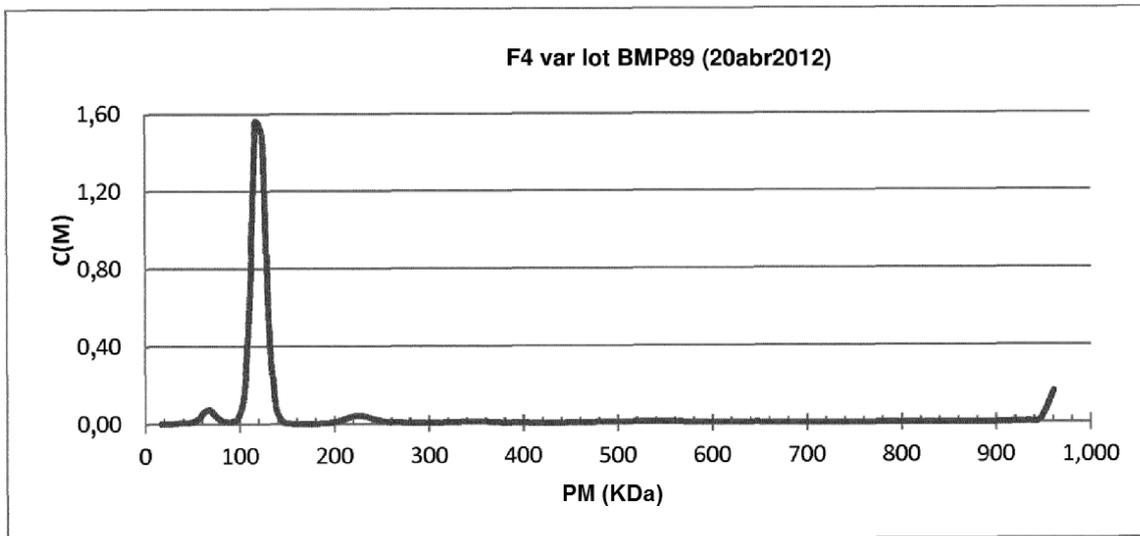
b)



c)



d)



e)

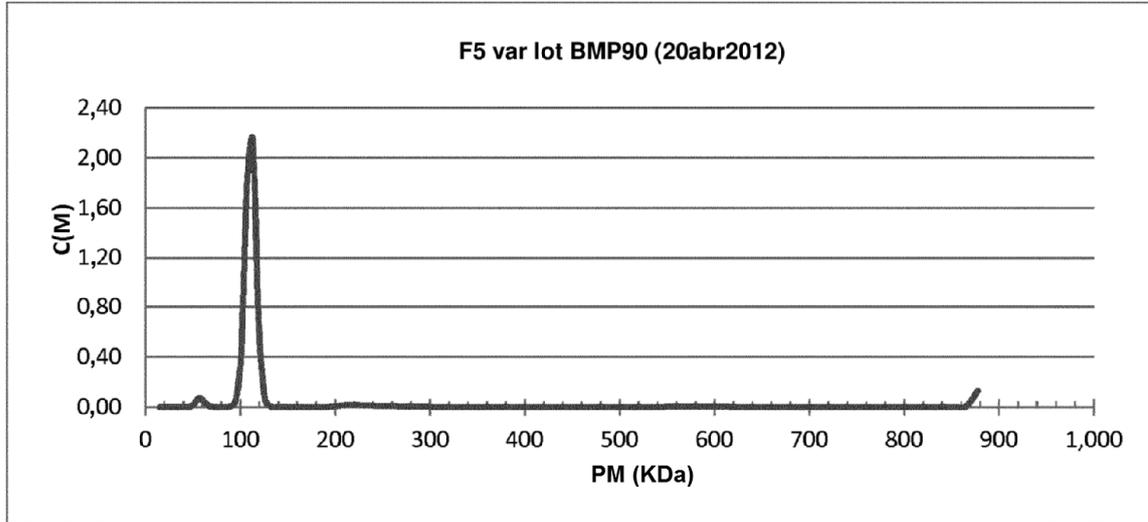


FIGURA 9

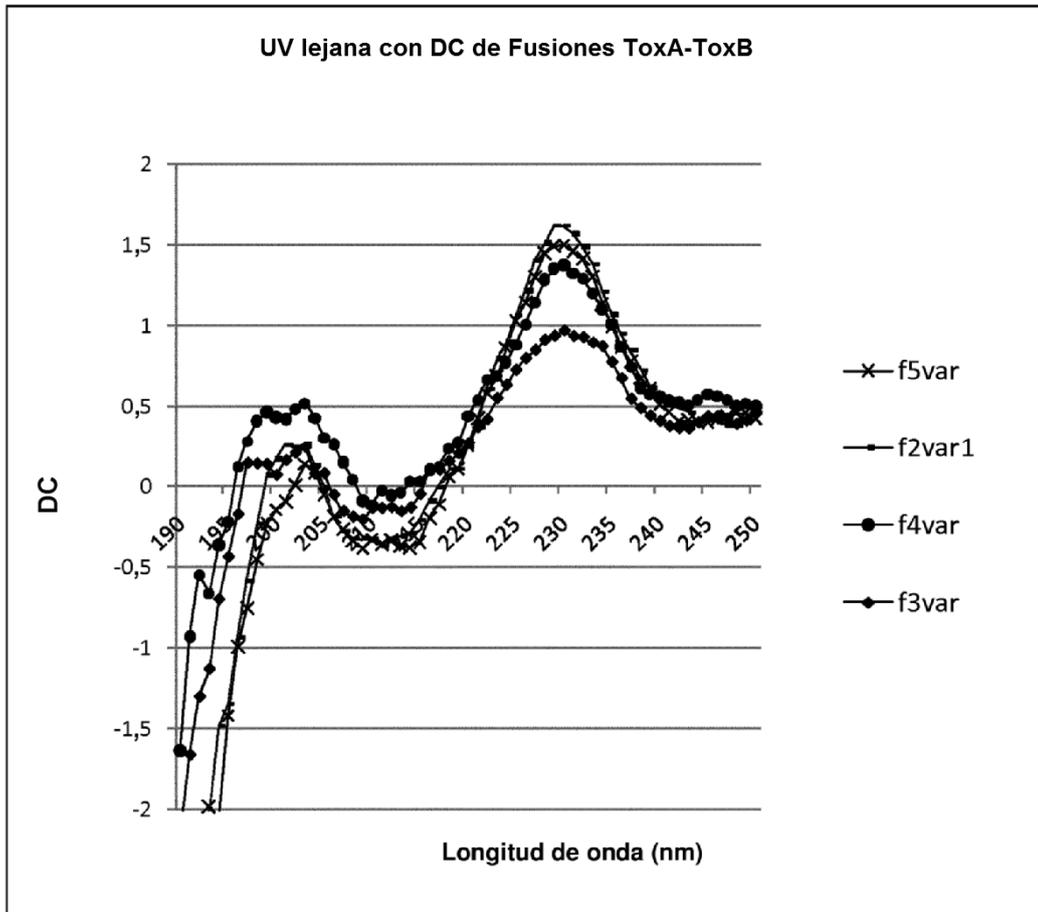


FIGURA 10

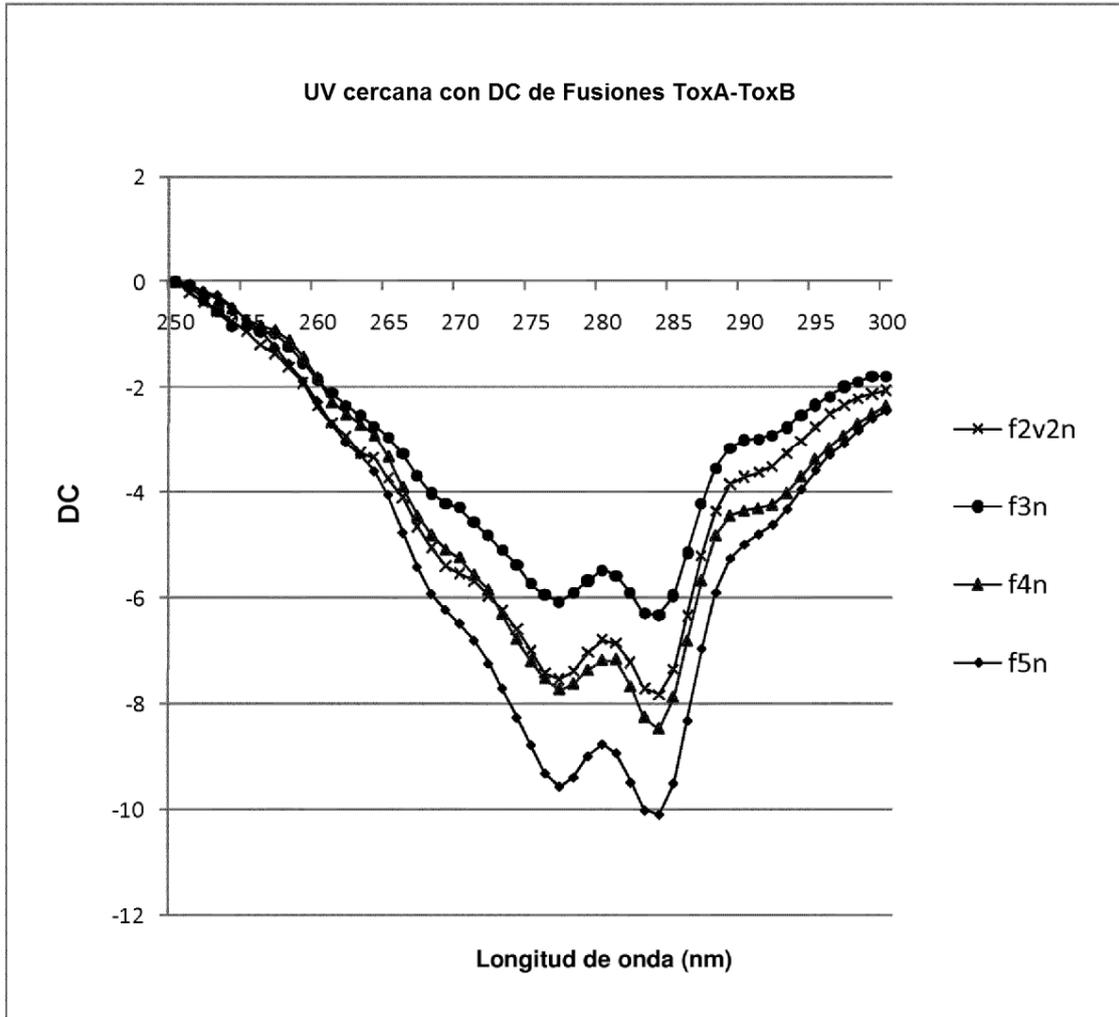


FIGURA 11

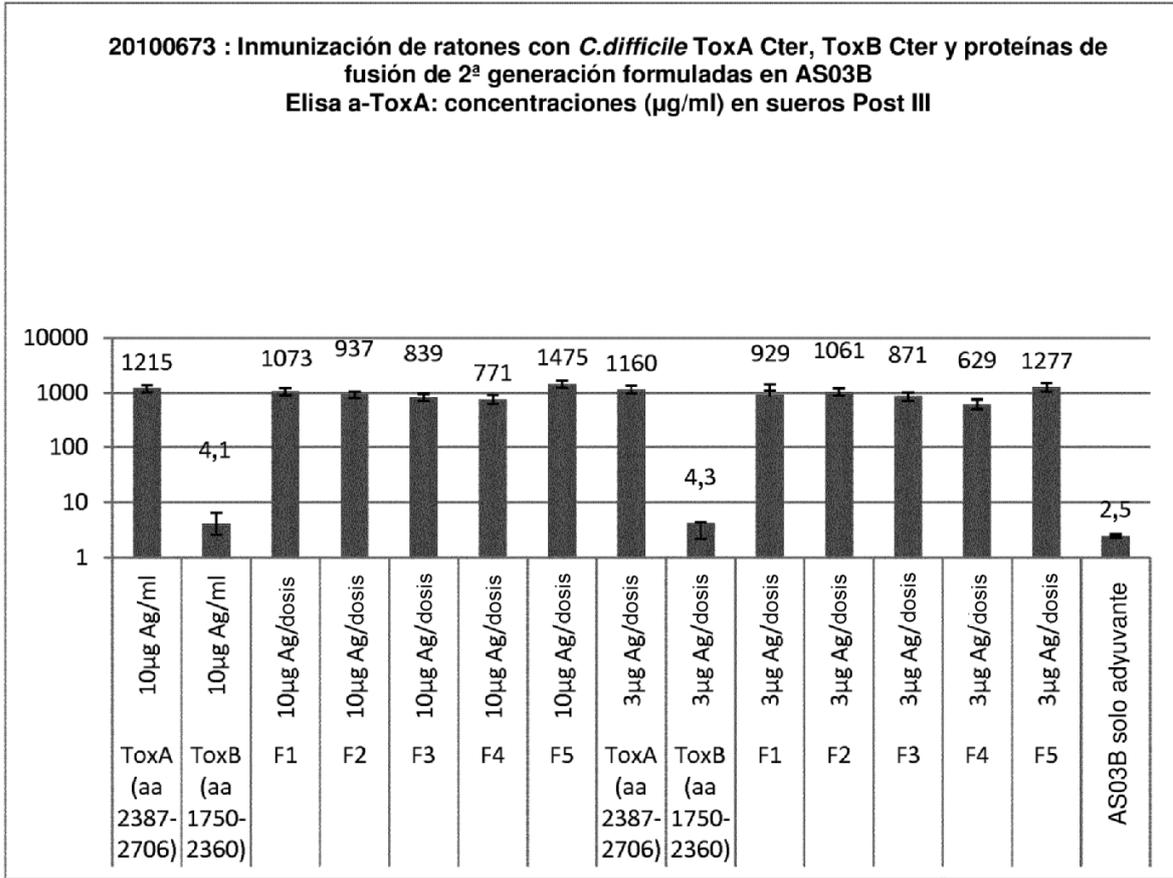


FIGURA 12

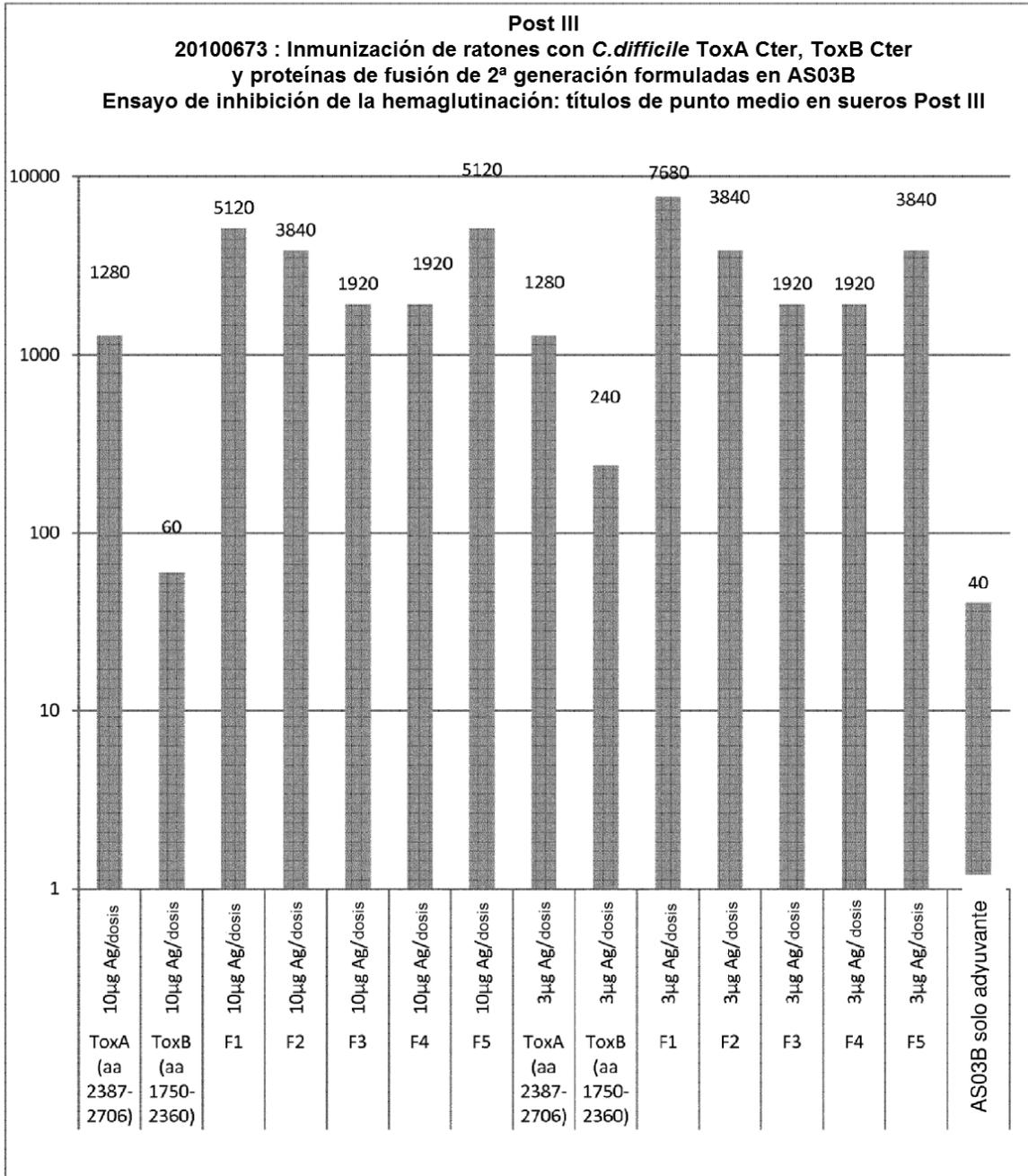


FIGURA 13

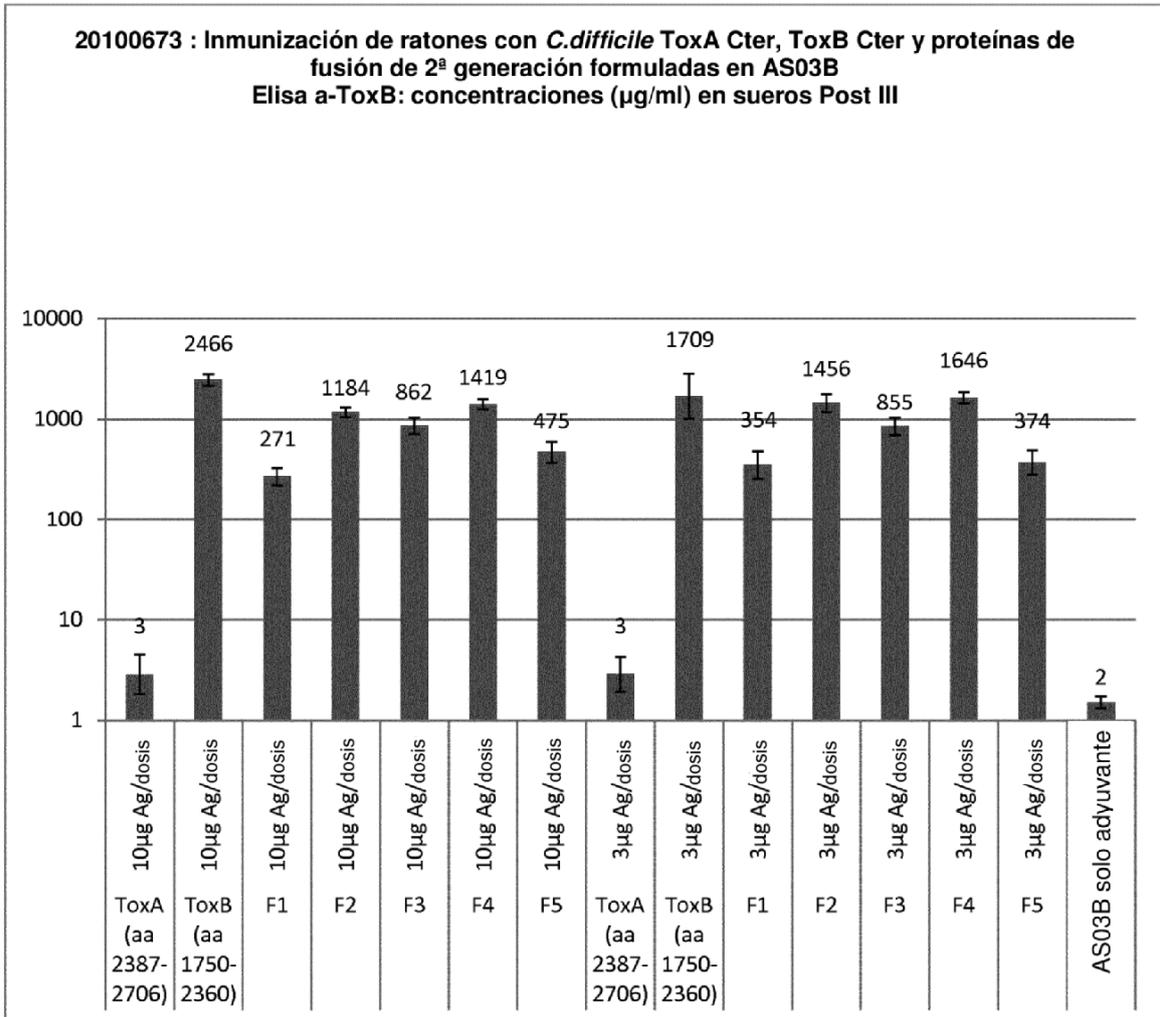


FIGURA 14

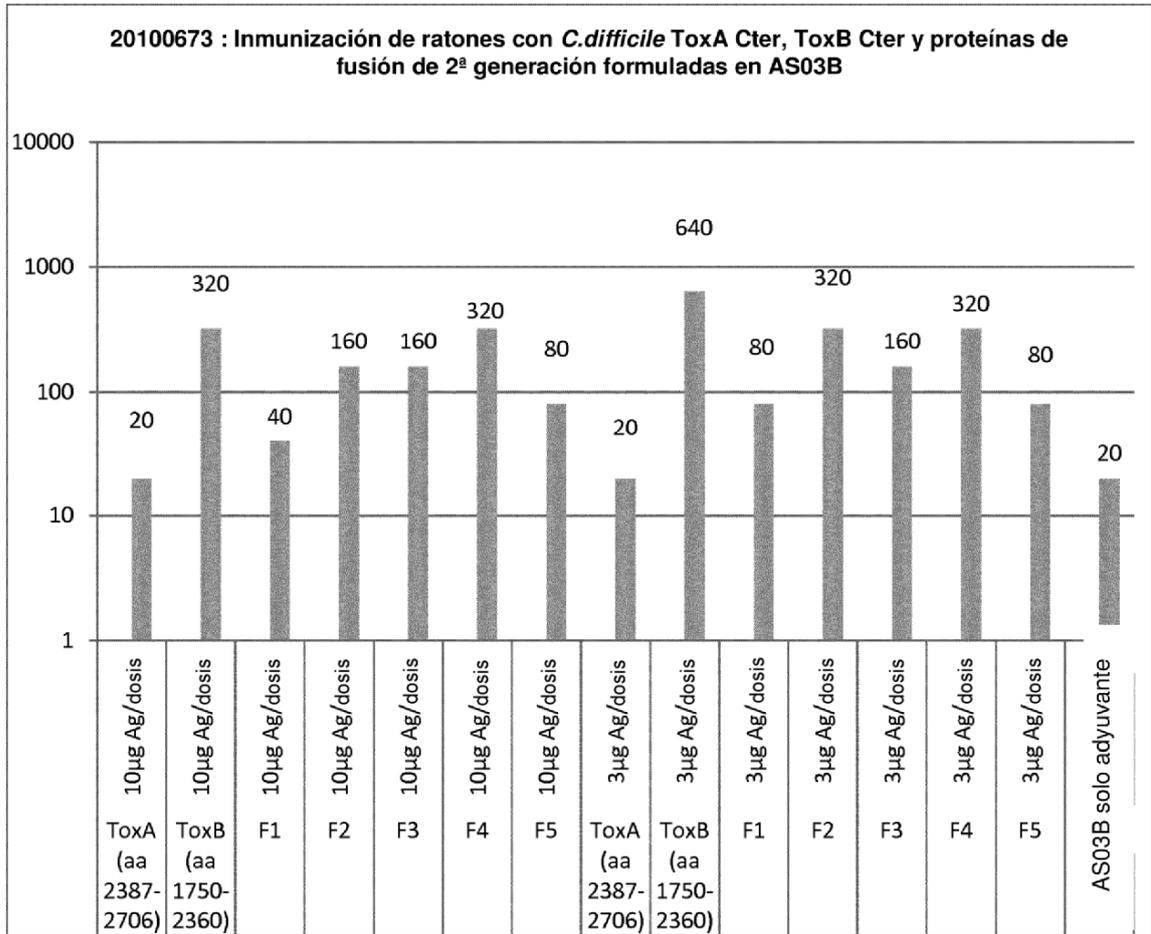
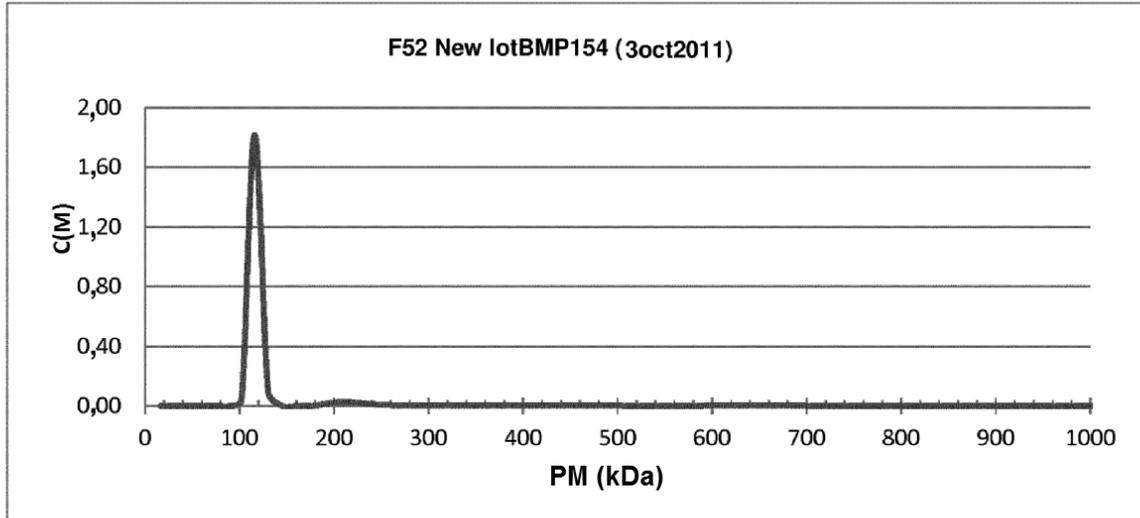
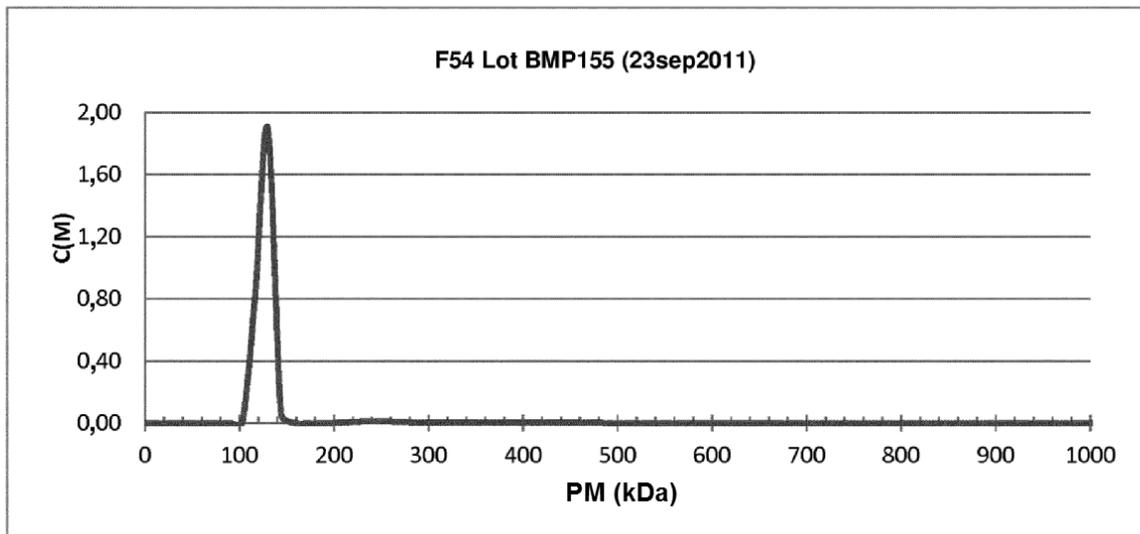


FIGURA 15

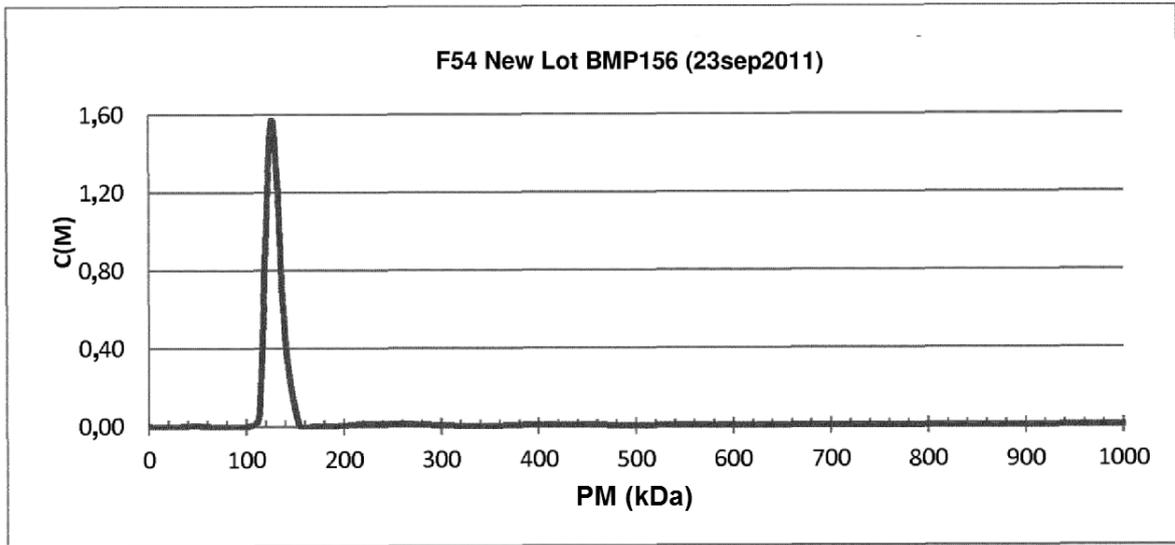
a)



b)



c)



d)

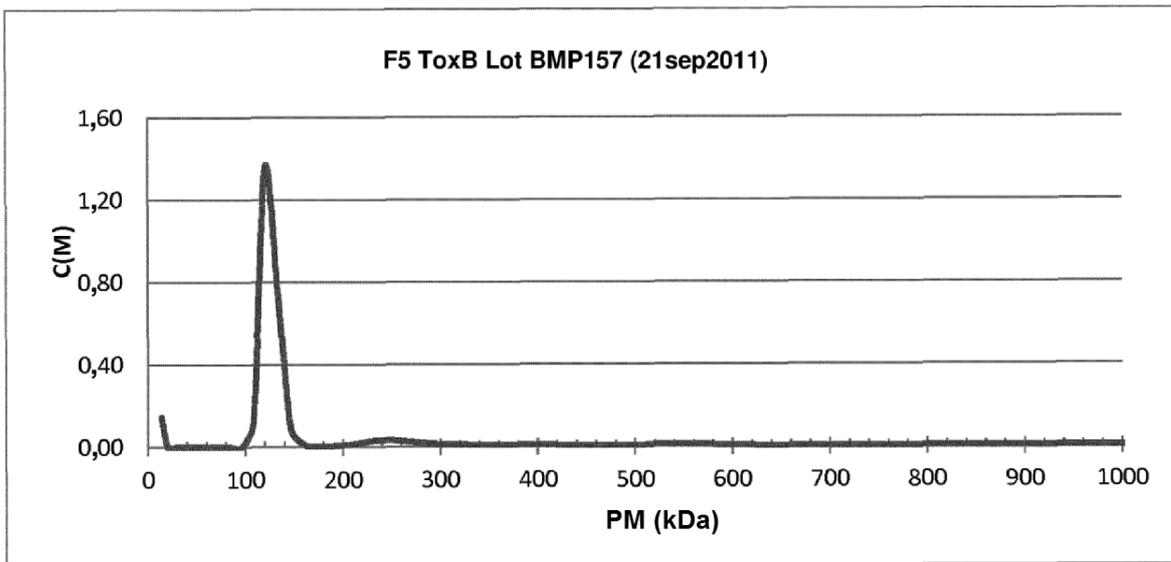


FIGURA 16

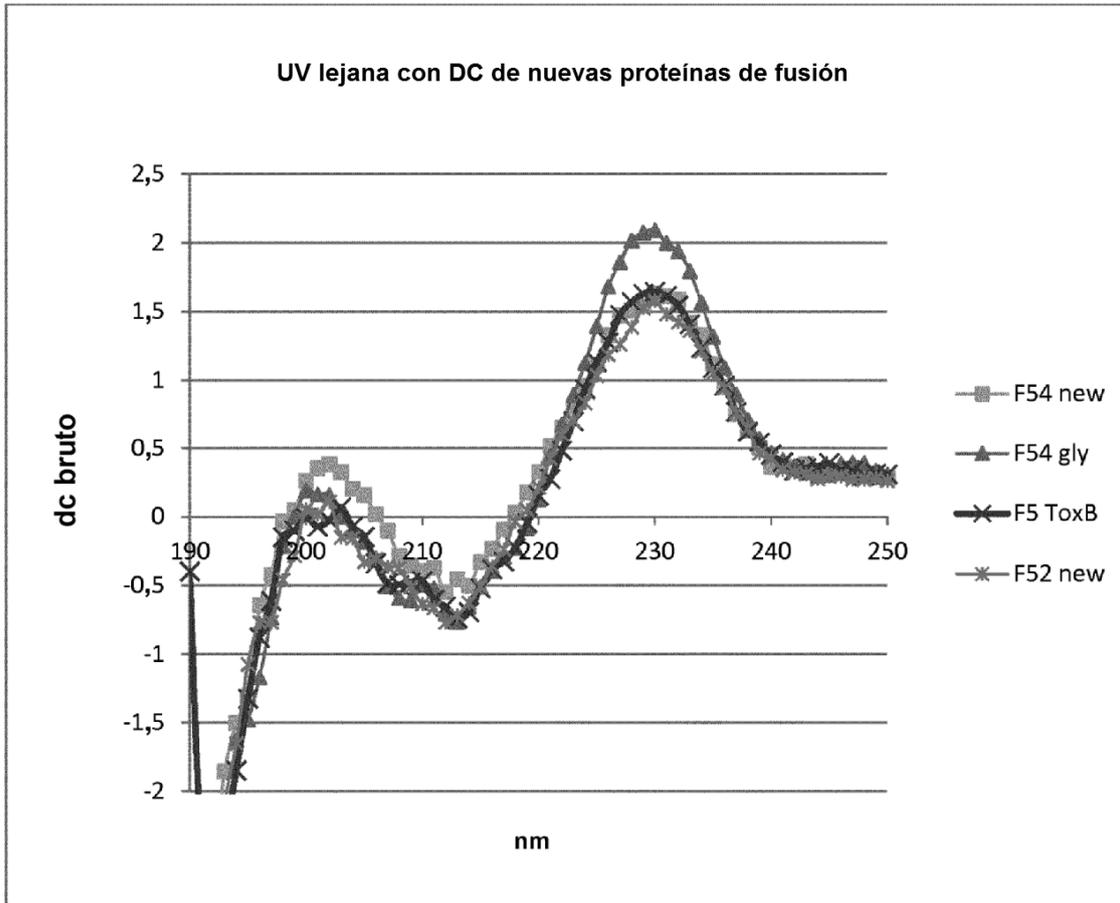


FIGURA 17

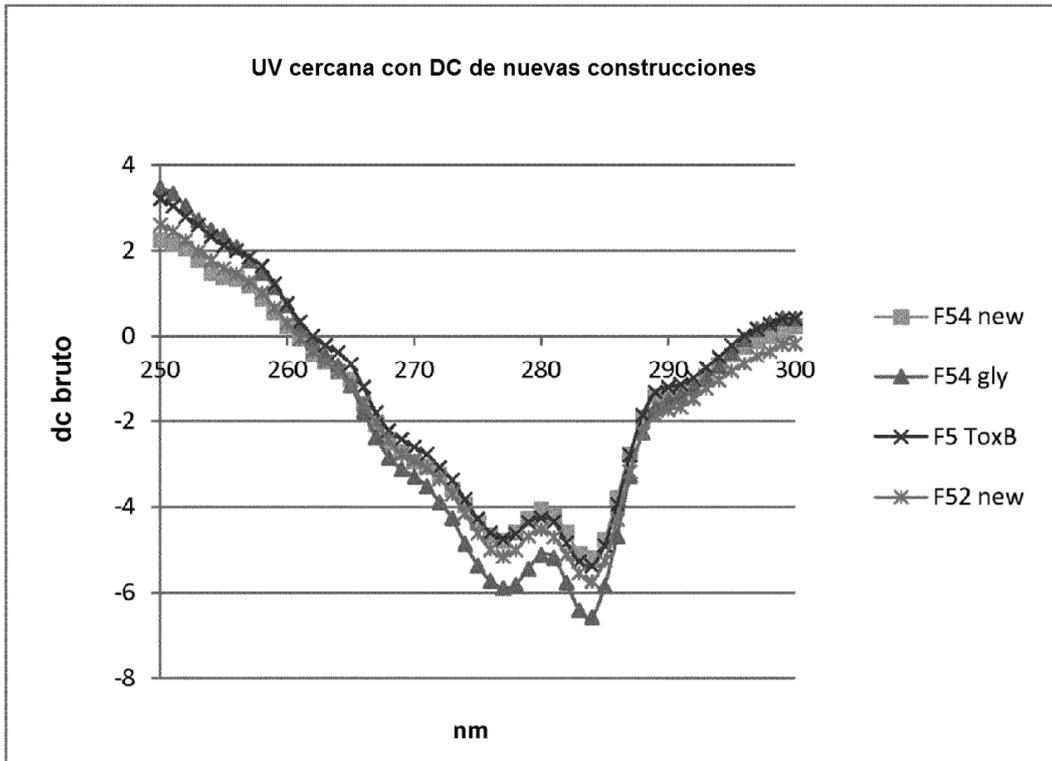


FIGURA 18

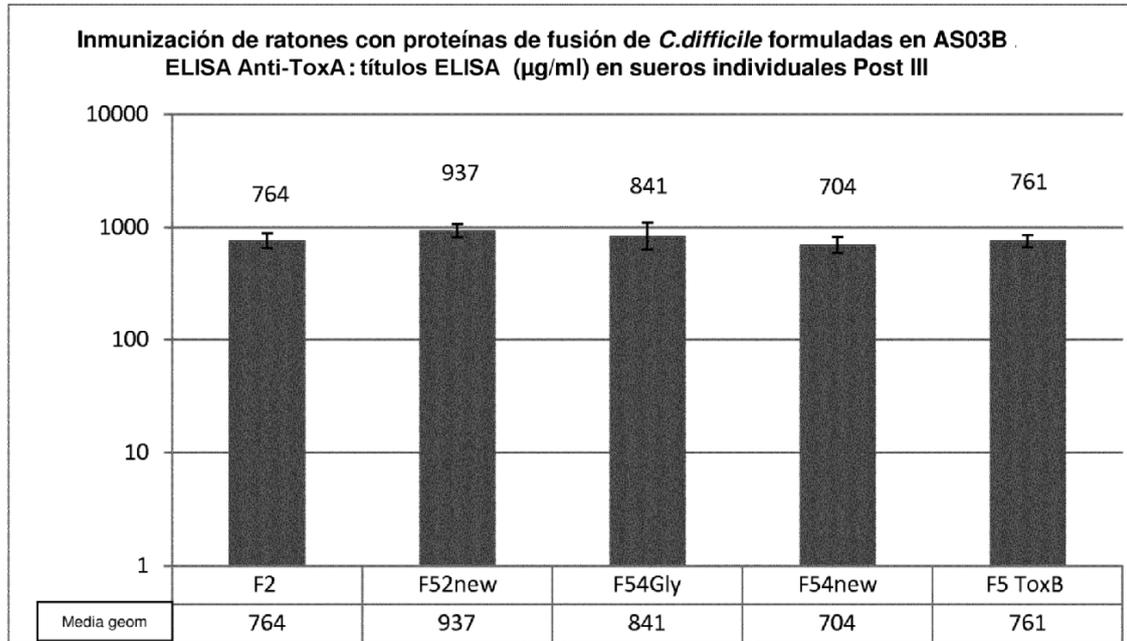


FIGURA 19

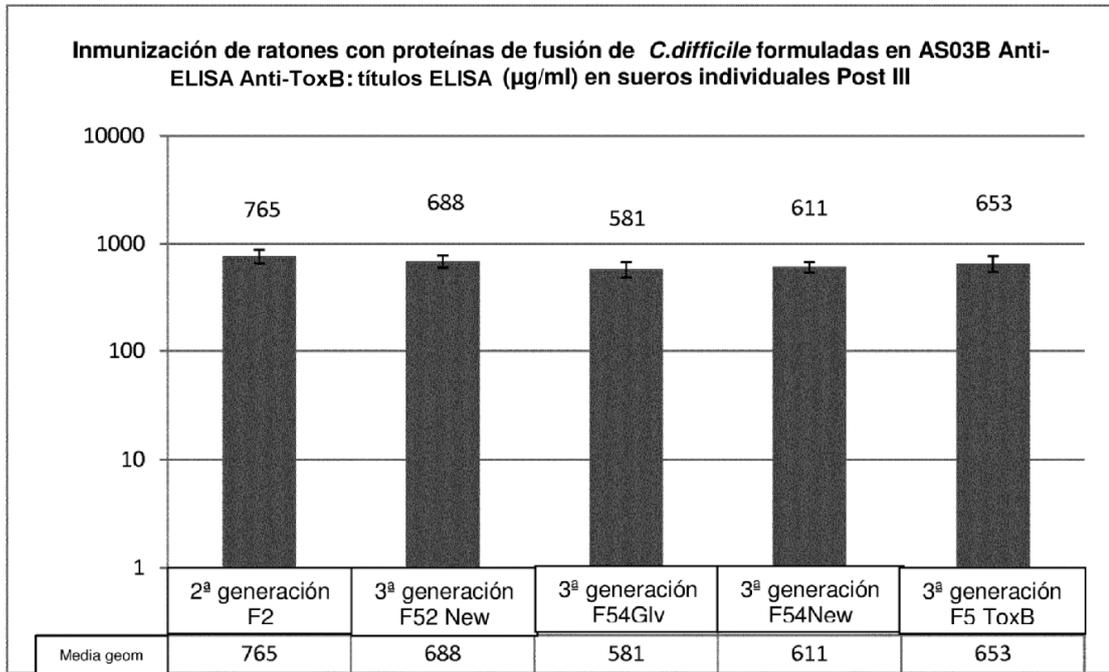


FIGURA 20

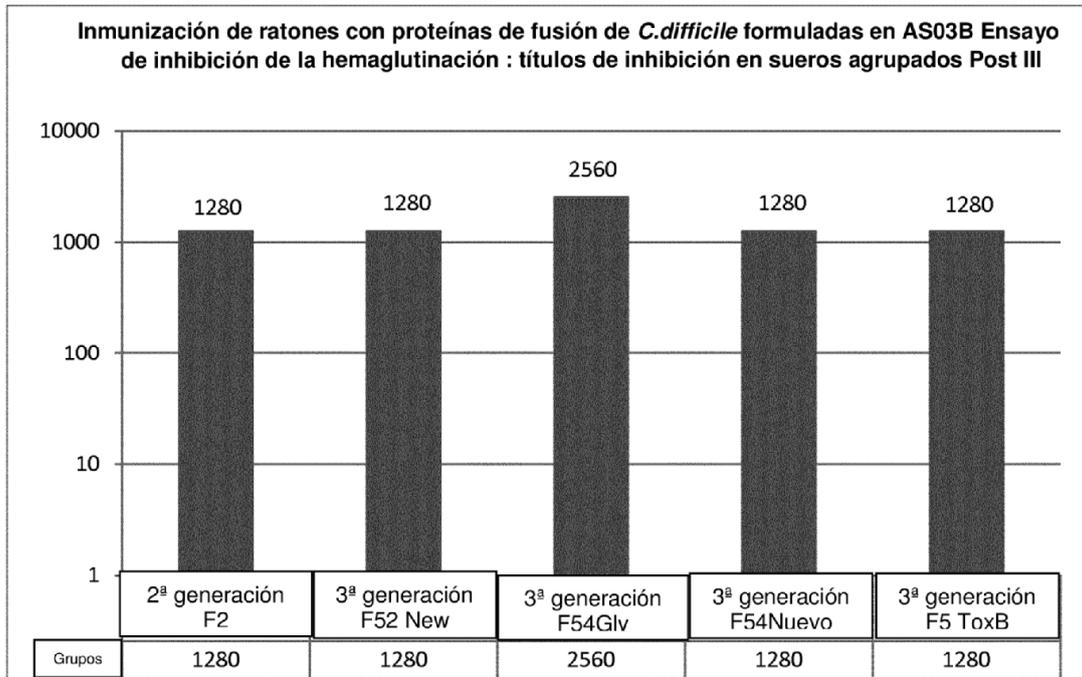


FIGURA 21

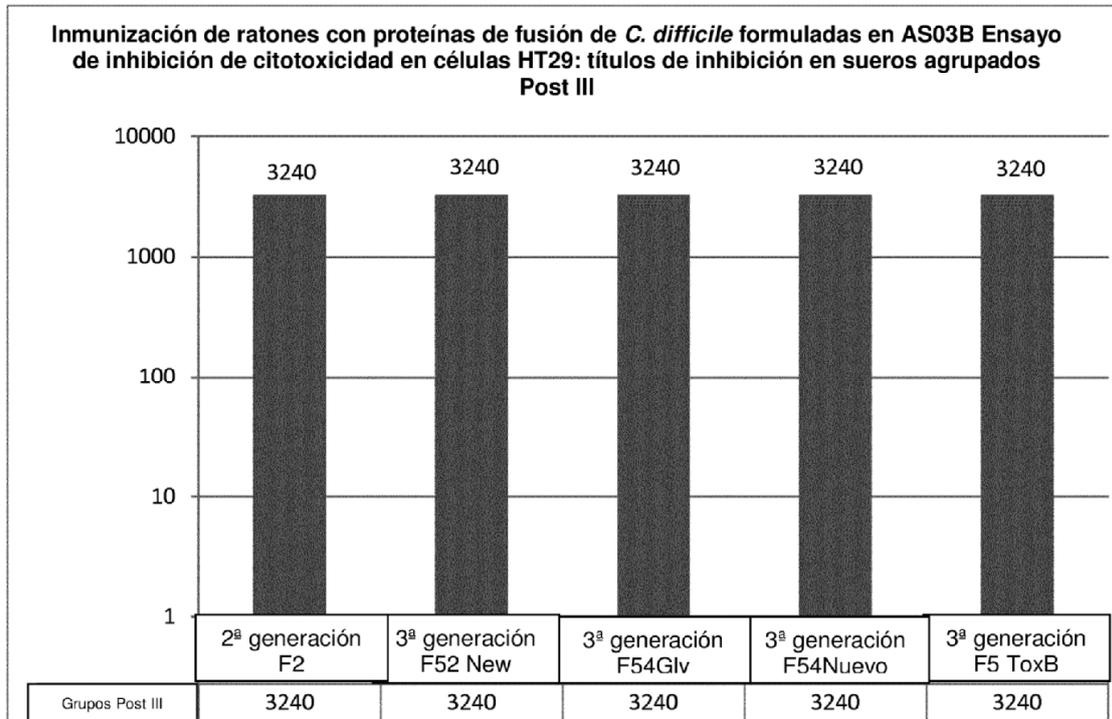


FIGURA 22

