

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 032**

51 Int. Cl.:

A61K 39/08 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2011 PCT/EP2011/065304**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12028741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2011 E 11769799 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2753352**

54 Título: **Polipéptido aislado de las proteínas toxina A y toxina B de C. difficile y sus usos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.08.2017

73 Titular/es:
VALNEVA AUSTRIA GMBH (50.0%)
Campus Vienna Biocenter 3
1030 Vienna, AT y
INTERCELL USA, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:
ELLINGSWORTH, LARRY;
FLYER, DAVID;
TIAN, JING-HUI;
FUHRMANN, STEVEN;
KLUEPFEL-STAH, STEFANIE;
GLENN, GREGORY y
WESTRITSCHNIG, KERSTIN

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

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

ES 2 631 032 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

Polipéptido aislado de las proteínas toxina A y toxina B de *C. difficile* y sus usos

Campo de la invención

5 En la presente memoria se describe un polipéptido aislado que contiene los dominios de unión al receptor de la toxina A y la toxina B de *Clostridium difficile* y su uso como vacuna. Este polipéptido aislado proporciona inmunidad antitoxina contra ambas toxinas.

Antecedentes de la invención

10 *Clostridium difficile* es la principal causa de diarrea intrahospitalaria asociada a antibióticos y se ha convertido en un problema sanitario considerable en hospitales, residencias de ancianos y otros centros de asistencia sanitaria. El costo para los hospitales se ha estimado en 2 mil millones de dólares en Europa y 3,2 mil millones de dólares en Estados Unidos.

15 El agente causal es una bacteria gram positiva anaerobia, formadora de esporas, que se encuentra comúnmente en el ambiente, pero que también está presente en el tubo intestinal del 2 al 3 % de la población adulta sana. La enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD) se induce por medio de la alteración de la flora normal del colon, generalmente como resultado de la administración de antibióticos. Tras la exposición a las esporas de *C. difficile* en el ambiente, el organismo puede colonizar la mucosa intestinal, donde la producción de toxinas que causan la enfermedad puede resultar en una EACD. La enfermedad puede presentarse como una diarrea leve, sin complicaciones, a una colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico graves.

20 La EACD se ha vuelto cada vez más problemática en entornos de asistencia sanitaria. Un estudio reciente informó que el 31 % de los pacientes hospitalizados que reciben antibióticos es colonizado por *C. difficile* y el 56 % de dichos pacientes colonizados desarrolla posteriormente una EACD. En general, *C. difficile* es responsable de 10 a 25 % de todas las diarreas asociadas a antibióticos, 50 a 75 % de las colitis relacionadas con antibióticos y 90 a 100% de las colitis pseudomembranosas relacionadas con antibióticos. El tratamiento de la EACD implica suspender el antibiótico causal y posteriormente tratar con metronidazol o vancomicina. La recurrencia tras la suspensión del tratamiento con el antibiótico se produce en aproximadamente 20 % de los pacientes, a menudo como resultado de la recolonización por *C. difficile*.

25 En 2003, un brote de *C. difficile* en Quebec, Canadá indicó la aparición de una cepa más virulenta de *C. difficile* conocida como North American Phenotype 1/027 (NAP1). NAP1 se ha asociado con una mayor virulencia, respuestas deficientes y tasas de morbilidad y mortalidad más altas en comparación con las cepas anteriores. La aparición de esta cepa se suma a los problemas ya encontrados para intentar detener la incidencia de la EACD.

30 La fidaxomicina (*Difcid*®) para la prevención de la enfermedad recurrente es el primero de una nueva clase de fármacos antibióticos macrocíclicos de espectro reducido (Revill, P.; Serradell, N.; Bolos, J. (2006). "Tiacumicin B: macrolide antibiotic treatment of *C. difficile*-associated diarrhea". *Drugs of the Future* 31 (6): 494-497). Es un producto de fermentación obtenido del actinomiceto *Dactylosporangium aurantiacum subespecie hamdenesis*. La fidaxomicina es no sistémica, es decir, que se absorbe mínimamente en el torrente sanguíneo, es bactericida y ha exhibido una erradicación selectiva de *Clostridium difficile* patógena con alteración mínima de las múltiples especies de bacterias que conforman la flora intestinal sana, normal. Mantener condiciones fisiológicas normales en el colon puede reducir la probabilidad de recurrencia de la infección por *Clostridium difficile* (Johnson, Stuart (2009-06). "Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes". *Journal of Infection* 58 (6): 403-410). Aunque se cree que la introducción de esta nueva clase de fármaco antibiótico mejorará el tratamiento de EACD, existe todavía la necesidad médica de un fármaco preventivo, en especial, para pacientes de alto riesgo tales como ancianos y pacientes inmunodeprimidos.

35 La EACD es el resultado de las acciones de dos exotoxinas producidas por *C. difficile*, la toxina A y la toxina B (también denominadas CTA y CTB, respectivamente). Ambas toxinas son proteínas secretadas de alto peso molecular (~300 kDa) que poseen múltiples dominios funcionales (Voth DE y Ballard JD, *Clinical Microbiology Reviews* 18:247-263 (2005)). El dominio del extremo N de ambas toxinas contiene actividad de ADP-glucosiltransferasa que modifica las GTPases similares a Rho. Esta modificación provoca una pérdida de polimerización de actina y cambios citoesqueléticos que resultan en la alteración de las uniones estrechas epiteliales del colon. Esto conduce a una exudación excesiva de fluido hacia el colon y a la diarrea resultante. El dominio central contiene un dominio hidrófobo y se prevé que participe en el transporte a través de la membrana. El dominio en el extremo C de ambas toxinas contiene múltiples regiones homólogas denominadas unidades repetitivas (UR) que participan en la unión de la toxina a células objetivo (Ho *et al*, *PNAS* 102:18373-18378 (2005)). Las unidades repetitivas se clasifican en cortas (21-30 aminoácidos) o largas (~50 aminoácidos). Las unidades repetitivas se combinan para formar aglomeraciones, donde cada uno contiene generalmente una unidad repetitiva larga y de 3 a 45 5 cortas. La toxina A de longitud completa posee 39 unidades repetitivas (URA) organizadas en 8 aglomeraciones (Dove *et al*. *Infect. Immun.* 58:480-488 (1990), mientras que la toxina B de longitud completa contiene 24 unidades

repetitivas (URB) organizadas en 5 aglomeraciones (Barroso *et al.*, Nucleic Acids Res. 18:4004 (1990); Eichel-Streiber *et al.*, Gene 96:107-113 (1992)).

Diversos estudios, con modelos animales y en clínica, han indicado que un anticuerpo antitoxina participa en la protección contra la enfermedad asociada a *C. difficile*. Hámsteres inmunizados con toxina A y toxina B inactivada con formalina generaron niveles elevados de anticuerpo antitoxina y fueron protegidos contra una exposición letal a bacterias *C. difficile* (Giannasca PJ y Warny M, Vaccine 22:848-856 (2004)). Además, la transferencia pasiva de anticuerpo antitoxina de ratón protegió a los hámsteres de un modo dependiente de la dosis. Kyne L *et al.* (The Lancet 357:189-193 (2001)) informaron que el desarrollo de una respuesta de anticuerpo antitoxina A durante un episodio inicial de CDAD se correlacionó con la protección contra la recurrencia de la enfermedad.

Los determinantes reconocidos por los anticuerpos antitoxina protectores se localizaron en el dominio del extremo C que contenía las unidades repetitivas que funcionan como el dominio de unión al receptor. Inicialmente, Lyerly *et al.* (Current Microbiology 21:29-32 (1990)) revelaron que el dominio del extremo C de la toxina A que contiene 33 unidades repetitivas es capaz de inducir la producción de anticuerpo antitoxina neutralizante y puede proteger contra la infección por *C. difficile*. En este estudio, los hámsteres recibieron múltiples inyecciones subcutáneas con el polipéptido recombinante purificado antes de la exposición a las bacterias, sin embargo, solamente se logró una protección parcial. Otro estudio (Ryan *et al.*, Infect. Immun. 65:2941-49 (1997)) exhibió que el polipéptido aislado del extremo C de CTA que contiene 720 residuos de aminoácidos y la señal de secreción de hemolisina A de *E. coli* (expresada en *Vibrio cholerae*) indujeron inmunidad protectora sistémica y en la mucosa contra una dosis pequeña de CTA en el modelo de EACD en conejo.

También se informó que la respuesta de anticuerpo contra el dominio del extremo C de ambas toxinas A y B fue necesario para lograr una protección completa (Kink y Williams, Infect. Immun. 66:2018-25 (1998), patente estadounidense N. ° 5.736.139, 1998). Este estudio reveló que el dominio del extremo C de cada toxina era el más eficaz para generar anticuerpos neutralizantes de toxinas. Demostró la eficacia de los anticuerpos aviares administrados por vía oral (antitoxina) generados contra el dominio del extremo C de CTA y CTB en el modelo letal en hámster. Estos resultados también indican que la antitoxina puede ser eficaz para el tratamiento y la atención del paciente con EACD en humanos. En otro estudio, se informó que los anticuerpos monoclonales antitoxina A y B humanos confieren protección contra la mortalidad inducida por *C. difficile* en hámsteres (Babcock *et al.*, Infect. Immun. 74:6339-6347 (2006)). La protección solo se observó en anticuerpos dirigidos directamente contra el dominio de unión al receptor de cualquiera de las dos toxinas y se observó una protección potenciada tras el tratamiento con anticuerpos antitoxina para ambas A y B.

Por otro lado, Ward *et al.* (Infect. Immun. 67: 5124-32 (1999)) consideraron 14 unidades repetitivas de la toxina A de *C. difficile* (14 CTA) para el estudio de la actividad adyuvante. Se clonaron las unidades repetitivas y se expresaron con una etiqueta de polihistidina en el extremo N (14 CTA-HIS) o fusionadas al dominio de unión no tóxico de la toxina tetánica (14 CTA-TETC). Ambas proteínas de fusión administradas por vía intranasal generaron anticuerpos antitoxina A en suero, pero no hubo respuesta en la superficie de las mucosas en ratones. Se observaron respuestas antitoxina A sistémicas y en las mucosas tras la coadministración con la toxina termolábil (TL) de *E. coli* o su forma mutada LTR72. En función de estos datos, Ward *et al.* sugirieron el uso de la fusión 14 CTA-TETC no tóxica como adyuvante mucosal para la vacuna humana dirigida contra patógenos clostridiales.

Los estudios bioquímicos recientes sobre los dominios de unidades repetitivas de las toxinas de *C. difficile* han examinado los requisitos de secuencia mínimos para la formación de una estructura terciaria estable (Demarest SJ *et al.*, J. Mol. Bio. 346:1197-1206 (2005)). Se halló un péptido de 11 unidades repetitivas derivado de la toxina A que presentaba una estructura terciaria correcta, pero 6 y 7 unidades repetitivas de las toxinas A y B no la presentaban. Se halló que el segmento de 11 unidades repetitivas correctamente plegado conservaba la propiedad de unión al receptor. Un segundo estudio examinó las propiedades funcionales de los fragmentos de toxina A que contenían 6, 11 o 15 unidades repetitivas (Dingle T, Glycobiology 18:698-706 (2008)). Solo las 11 y 15 unidades repetitivas fueron capaces de inhibir de forma competitiva la capacidad de neutralización de toxina del anticuerpo antitoxina A. Aunque se halló que los 3 fragmentos presentaban actividad hemoaglutinante, los fragmentos más largos exhibieron actividad hemoaglutinante más elevada que los fragmentos más cortos. Los datos indican que la estructura de dominio de unión al receptor y la inmunogenicidad de la toxina se conservan en los fragmentos de dominio que contienen más de 11 a 14 repeticiones.

Thomas *et al.* (WO97/02836, patente estadounidense N. ° 5.919.463 (1999)) también describieron la toxina A y toxina B de *C. difficile* y determinados fragmentos de las mismas (p. ej., el dominio del extremo C que contiene algunas o todas las unidades repetitivas) como adyuvantes mucosales. Mostraron que la administración intranasal de CTA o CTB potenció de forma significativa la respuesta inmunitaria en las mucosas a un antígeno heterólogo tal como ureasa de *Helicobacter pylori*, ovalbúmina o hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) en múltiples compartimentos de ratón y se asoció con la protección contra la exposición a *Helicobacter*. Además, se evaluó la actividad adyuvante de una proteína de fusión de toxina A: se fusionaron 794 residuos de aminoácidos del extremo C de CTA que comprendían URA (unidades repetitivas de toxina A) con glutatión-S-transferasa (GST) y el polipéptido GST-URA resultante se expresó en *E. coli*. Este estudio demostró una mejora significativa en la respuesta inmunitaria mediante GST-URA a antígenos coadministrados en suero y secreciones mucosales.

Todos estos estudios sugieren el uso potencial de una proteína recombinante no tóxica que comprende la toxina A o la toxina B de *C. difficile*, o fragmentos de las mismas, o sus combinaciones para producir una vacuna activa contra EACD. Actualmente, no existe en el mercado una vacuna contra *C. difficile*, aunque se ha evaluado una vacuna candidata que consiste en toxinas A y B enteras destoxificadas con formalina en estudios en fase I y IIa con humanos. Se ha informado que la inmunización por vía parenteral con esta vacuna induce respuestas de IgG antitoxina y anticuerpo neutralizante de toxina (Kotloff KL *et al.*, Infect. Immun. 69:988-995 (2001); Aboudola S *et al.*, Infect. Immun. 71:1608-1610(2003)).

La bibliografía además indica que la construcción de una proteína de fusión recombinante que contiene dominios de unión al receptor de las toxinas A y B de *C. difficile*, ya sean completas o con fragmentos de las mismas, sería una estrategia eficaz y comercialmente viable para el desarrollo de una vacuna. Varfolomeeva *et al.* intentaron aplicar esta estrategia como una proteína de fusión de dos partes con un fragmento de 700 pares de bases de la toxina A y un fragmento de 1.300 pares de bases de la toxina B (Mol. Genetics, Microb. and Virol. 3:6-10 (2003)). Esta estrategia también ha sido descrita por Belyi y Varfolomeeva (FEMS Letters 225:325-9 (2003)) quienes demostraron la construcción de la proteína de fusión recombinante que consistía en tres partes: dos dominios de extremo C compuestos por unidades repetitivas de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* y a continuación el fragmento de la enterotoxina Cpe de *Clostridium perfringens*. La proteína de fusión se expresó en *E. coli* pero el producto se acumuló en cuerpos de inclusión y no era estable. Además, se consideró bajo el rendimiento de producto puro logrado en este estudio (50 µg por 100 ml de cultivo).

Wilkins *et al.* (WO 00/61762, patente estadounidense N.º 6.733.760 (2004)) también describieron el uso de unidades repetitivas de la toxina A y B de *C. difficile* recombinantes (URA recombinante y URB recombinante) y sus conjugados de polisacáridos para la preparación de una vacuna contra EACD. La proteína URA recombinante resultante comprendía 867 residuos de aminoácidos mientras que la proteína URB recombinante contenía 622 aminoácidos de longitud. A diferencia de los estudios mencionados anteriormente, este trabajo demostró una expresión de nivel elevado de las proteínas solubles URA y URB recombinantes en *E. coli*. Los ratones vacunados con URA recombinante y con URA recombinante conjugada con polisacárido exhibieron un nivel elevado de anticuerpos antitoxina A neutralizantes en ambos casos y exhibieron una protección elevada contra la exposición letal a la toxina A de *C. difficile*. Adicionalmente, Wilkins *et al.* sugirieron el uso de una proteína de fusión recombinante que consiste en URA y URB para la preparación de una vacuna.

Existe interés en el desarrollo de una vacuna contra EACD. Una proteína de fusión recombinante que consiste en URA y URB puede ser potencialmente útil como vacuna.

Telfer *et al.* (WO 2010/017383) propusieron el uso de microorganismos atenuados, tales como *Salmonella*; que expresan en su superficie un polipéptido inmunógeno que comprende unidades repetitivas del extremo C de la toxina A y/o unidades repetitivas del extremo C de la toxina B de *C. difficile* para la vacunación contra EACD por medio de administración oral a un sujeto humano. El polipéptido recombinante incluía al menos 20 repeticiones de la toxina A y/o 15 repeticiones de la toxina B y además incluía una señal de secreción, p. ej., la etiqueta ClyA de *S. typhimurium*.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una composición inmunógena o para vacuna, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. En la presente memoria se describen nuevas herramientas y métodos para el diseño, producción y uso de la toxina A y la toxina B de *C. difficile*. En la presente memoria se describe un polipéptido aislado C-TAB que comprende la SEQ ID N.º:2 (C-TAB.G5) o un derivado de la misma, SEQ ID N.º: 4 (C-TAB.G5.1). C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 comprende 19 unidades repetitivas del dominio del extremo C de la toxina A fusionadas con 23 unidades repetitivas del dominio del extremo C de la toxina B. En la presente memoria se describen composiciones y formulaciones que comprenden el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Las composiciones o formulaciones pueden contener el polipéptido aislado, un antígeno adicional, un adyuvante y/o un excipiente. Alternativamente, las composiciones o formulaciones pueden consistir esencialmente en el polipéptido aislado sin un adyuvante ni otros ingredientes activos (pero opcionalmente comprenden un excipiente tal como un vehículo, tampón y/o estabilizante). Además, las composiciones o formulaciones de la invención se pueden administrar simultáneamente con otros fármacos tales como un antibiótico en particular, p. ej., en sujetos con EACD recurrente o en sujetos que requieren un uso de antibiótico frecuente y/o prolongado.

En la presente memoria se describe una vacuna que comprende el polipéptido aislado descrito en la presente. La vacuna puede comprender además un adyuvante, tal como alumbre, un adyuvante derivado de una exotoxina ADP-ribosilante u otros. La vacuna se puede administrar en un régimen de una dosis, un régimen de dos dosis (administradas, p. ej., dentro de 3 a 20 días, p. ej., de 10 a 15 días después de la primera dosis), un régimen de tres dosis (administradas, p. ej., alrededor de 7 días y alrededor de 21 días después de la primera dosis) o más extenso que un régimen de tres dosis, preferiblemente en un régimen de dos a tres dosis, en el que la dosis comprende una cantidad de 20 µg a 200 µg del polipéptido de la invención.

En la presente memoria se describe un método para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad, tal como EACD, mediante la administración del polipéptido aislado descrito en la presente memoria a

un sujeto que lo necesita. El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede administrarse al sujeto por vía intramuscular o por otras vías de administración.

5 En la presente memoria se describe un método para prevenir una enfermedad, tal como EACD, mediante la administración del polipéptido aislado descrito en la presente memoria o una composición que comprende dicho polipéptido a un sujeto en riesgo de padecer una EACD, tal como, p. ej., un sujeto con el siguiente perfil: i) un sujeto con un sistema inmunitario más débil, tal como, p. ej., un sujeto anciano (p. ej., un sujeto con más de 65 años de edad) o un sujeto con menos de 2 años de edad; ii) un sujeto inmunodeprimido, tal como, p. ej., un sujeto con SIDA; iii) un sujeto que toma o planea tomar fármacos inmunosupresores; iv) un sujeto con una hospitalización planeada o un sujeto que está en un hospital; v) un sujeto que está o se espera que vaya a una unidad de cuidados intensivos (UCI); vi) un sujeto que se está sometiendo o planea someterse a cirugía gastrointestinal; vii) un sujeto que está o planea ir a un centro de asistencia para una estancia prologada, tal como, una residencia de ancianos; viii) un sujeto con comorbilidades que requiere un uso frecuente y/o prolongado de antibióticos; ix) un sujeto que es un sujeto con dos o más de los perfiles mencionados anteriormente, tal como, p. ej., un sujeto anciano que planea someterse a una cirugía gastrointestinal; x) un sujeto con enfermedad inflamatoria intestinal; y/o xi) un sujeto con EACD recurrente, tal como, p. ej., un sujeto que ha sufrido uno o más episodios de EACD.

15 En la presente memoria se describen métodos para producir el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se puede producir a partir de un ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 utilizando un sistema de expresión bacteriano, tal como un sistema de expresión en *E. coli*.

20 En la presente memoria se describe el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en el que las 19 unidades repetitivas de la toxina A están conectadas a las 23 unidades repetitivas de la toxina B a través de un enlazador que consiste en al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos. A modo de ejemplo, el enlazador de la presente invención puede comprender la secuencia RSMH (Arg-Ser-Met-His) (aminoácidos 439-442 de la SEQ ID N. °:2 o la SEQ ID N. °:4).

25 En la presente memoria se describe una variante del polipéptido aislado que comprende al menos una mutación (por ejemplo, inserción, sustitución o supresión), por ejemplo, en URA y/o URB. La secuencia de la variante puede tener 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la SEQ ID N. °:2.

30 En la presente memoria se describen métodos para producir el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 o variantes del mismo a través de ingeniería de ADN recombinante, fermentación bacteriana y purificación proteica. En la presente memoria se describen métodos para construir el ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En la presente memoria se describen métodos para producir el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 utilizando un sistema de expresión bacteriano, tal como un sistema de expresión en *E. coli*.

35 En la presente memoria se describen métodos para prevenir y tratar un EACD en sujetos que lo necesitan, tales como humanos. En este método el C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se administra a un sujeto ya sea solo o coadministrado con uno o más adyuvantes tales como alumbre u otros. Los sujetos pueden ser individuos sanos que están en riesgo de exposición a *C. difficile*, sujetos humanos que han sido tratados y se recuperaron de una infección por *C. difficile* y que están en riesgo de volver a infectarse con *C. difficile*, o sujetos humanos que están actualmente infectados con *C. difficile* y cuya condición se puede mejorar mediante la inducción de un anticuerpo neutralizante de la toxina de *C. difficile*.

40 En la presente memoria se describe una composición inmunógena que comprende C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. La composición inmunógena puede incluir además un adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria específico para el antígeno y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otros componentes en una formulación adecuada para aplicación en un sujeto que la necesita. La composición inmunógena puede administrarse por medio de administración intramuscular (IM), administración intradérmica (ID), administración subcutánea (SC), administración intraperitoneal (IP), administración oral, administración, nasal, administración bucal o administración rectal.

45 En la presente memoria se describe una composición inmunógena que desencadena la producción de anticuerpos que se unen a las toxinas de *C. difficile* naturales y neutralizan su actividad citotóxica, proporcionado así una protección activa y/o tratamiento a largo plazo contra la enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD).

50 En la presente memoria se describen composiciones inmunógenas útiles para la prevención o tratamiento de una enfermedad asociada a *C. difficile* en sujetos que lo necesitan.

En la presente memoria se describen ácidos nucleicos y fragmentos o variantes de los mismos que codifican para C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En la presente memoria se describen vectores de expresión que comprenden el ácido nucleico que codifica para C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1.

55 En la presente memoria se describen anticuerpos y fragmentos de los mismos, tales como anticuerpos neutralizantes, humanizados, monoclonales, quiméricos y policlonales específicos para C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden reconocer la toxina A y/o la toxina B.

En la presente memoria se describe una vacuna que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N. °:2 o SEQ ID N. °:4.

En la presente memoria se describen kits de diagnóstico que comprenden los ácidos nucleicos, polipéptidos y/o anticuerpos descritos en la presente memoria.

- 5 Otras realizaciones y ventajas de la invención se presentan en parte en la descripción a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 A muestra el ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 (SEQ ID N. °: 1). La Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido aislado C-TAB.G5 (SEQ ID N. °: 2). El enlazador de aminoácidos entre el dominio de toxina A y el dominio de toxina B está subrayado.

- 10 La Figura 2A muestra el ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5.1 (SEQ ID N. °: 3). La Figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido aislado C-TAB.G5.1 (SEQ ID N. °: 4). El enlazador de aminoácidos entre el dominio de toxina A y el dominio de toxina B está subrayado.

- 15 La Figura 3 muestra la mejora de la producción de anticuerpos en ratones vacunados con C-TAB.G5 con dosis en aumento de C-TAB.G5 y coadministración con el adyuvante alumbre. Los ratones recibieron dos vacunaciones por medio de inyección IM. Los títulos de IgG para los anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B se evaluaron mediante ELISA dos semanas después de la primera y segunda inyección.

La Figura 4 muestra una representación gráfica de la inducción de IgG anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B en ratones que recibieron dosis en aumento de C-TAB.G5 con y sin alumbre por medio de dos inyecciones IM.

- 20 La Figura 5 muestra los títulos de anticuerpo en un intervalo de logaritmo de dosis en ratones inmunizados con C-TAB.G5 en presencia o ausencia de alumbre. Los títulos de IgG se evaluaron mediante ELISA dos semanas después de la segunda inmunización. Los datos demuestran que el alumbre aumente de forma significativa la producción de anticuerpos en ratones vacunados.

- 25 La Figura 6 muestra el efecto protector en ratones vacunados con C-TAB.G5 (con y sin alumbre) y después expuestos a una dosis letal de toxina A o toxina B. Los ratones que recibieron dos vacunaciones (IM) en un intervalo de dos semanas se expusieron (IP) tres semanas después. Los anticuerpos neutralizantes de la toxina A y toxina B (ANT) se evaluaron dos semanas después de la segunda inyección y se determinó el porcentaje de animales que sobrevivieron a la exposición letal. Las dosis incrementadas de C-TAB.G5 confirieron una producción mayor de ANT, así como también una protección mayor contra la exposición letal. La presencia de alumbre aumentó adicionalmente la producción de ANT y también confirió una supervivencia más elevada con dosis más bajas.

- 30 La Figura 7 muestra una comparación de la respuesta de anticuerpo y la eficacia de la protección de C-TAB.G5 en ratones vacunados jóvenes (6 a 7 semanas) y adultos (18 meses). Los ratones que recibieron dos vacunaciones (IM) en un intervalo de dos semanas se expusieron (IP) tres semanas después. Se evaluaron los títulos de IgG determinados por ELISA para los anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B, la producción de ANT así como también la supervivencia general. Los ratones jóvenes demostraron una respuesta de anticuerpo más elevada incluso sin alumbre y ambos grupos exhibieron una supervivencia mejorada cuando se vacunaron en presencia de alumbre.

La Figura 8 muestra una comparación de la cinética del desarrollo de anticuerpos IgG anti-C-TAB en ratones vacunados jóvenes y adultos. Los ratones jóvenes demostraron tasas mayores y una producción de IgG más temprana y ambos grupos exhibieron respuestas mejoradas cuando se vacunaron en presencia de alumbre.

- 40 La Figura 9 muestra una comparación entre la producción de anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B en ratones inmunizados con C-TAB.G5.1 o mezcla de anatoxina A y B (1:1). Los ratones recibieron dos vacunaciones por medio de inyección IM. Los títulos de IgG para los anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B se evaluaron mediante ELISA dos semanas después de la segunda inyección. La inmunización con anatoxina induce anticuerpos para la porción del extremo N de la molécula de toxina mientras que la inmunización con C-TAB induce anticuerpos para la porción del extremo C de la molécula de toxina.

La Figura 10 muestra una comparación entre la producción de ANT y la protección contra la exposición a la toxina A o B en ratones inmunizados con C-TAB.G5.1 o mezcla de anatoxina A y B. Los ratones que recibieron dos vacunaciones (IM) en un intervalo de dos semanas se expusieron (IP) tres semanas después a una dosis letal de toxina A o toxina B.

- 50 La Figura 11 muestra la producción de IgG anti-C-TAB (A), antitoxina A (B) y antitoxina B (C) en hámsteres inmunizados con C-TAB.G5.1 con y sin alumbre. Los hámsteres recibieron tres vacunaciones por medio de inyección IM el día 0 y el día 14. Los títulos de IgG para los anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B se evaluaron mediante ELISA a los 14, 28 y 35 días.

La Figura 12 muestra una representación gráfica del desarrollo de anticuerpo IgG anti-C-TAB en hámsteres inmunizados con C-TAB.G5.1 con o sin alumbre.

La Figura 13 muestra una comparación de ANT y la protección en hámsteres inmunizados con C-TAB.G5.1 con o sin alumbre. Dos semanas después de la tercera vacunación, los hámsteres recibieron una dosis letal de toxina A o toxina B por medio de inyección IP.

La Figura 14 muestra la supervivencia de hámsteres vacunados con C-TAB.G5.1 tras la administración intragástrica de una dosis letal de esporas de *C. difficile*. Los datos de supervivencia se graficaron como curvas de Kaplan-Meier ajustadas a la supervivencia y se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando un análisis logarítmico-ordinal. En todas las dosis de esporas (10^2 , 10^3 y 10^4), se observó un 100 % de supervivencia de hámsteres en el grupo vacunado y las supervivencia mejoró de forma significativa cuando se comparó con el grupo con placebo.

La Figura 15 muestra la producción de anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B en monos cangrejeros inmunizados con C-TAB.G5.1 en presencia o ausencia de alumbre. Dos grupos de monos (tres por grupos, 4 a 6 años) recibieron 200 µg de C-TAB.G5.1 con o sin 250 µg de alumbre. Se tomaron muestras de sangre en los días 0, 14, 28 y 42 del estudio. Se utilizó el método ELISA para evaluar los títulos de IgG anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B.

La Figura 16 muestra una comparación de la inmunogenicidad de C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1 administrados en un intervalo de dosis de 1 µg a 30 µg en PBS o tampón de histidina. Los ratones recibieron dos vacunaciones (IM) en un intervalo de dos semanas. Los títulos de IgG para los anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B se evaluaron mediante ELISA dos semanas después de la segunda inyección. Los tres títulos de anticuerpo no fueron significativamente diferentes (análisis de prueba de la T) entre C-TAB.G5 administrado en PBS o tampón de histidina y C-TAB.G5.1 administrado en tampón de histidina.

La Figura 17 muestra una comparación de la inmunogenicidad de C-TAB.G5, C-TABNCTB y C-TADCTB en ratones. Los ratones recibieron dos vacunaciones de cada proteína recombinante en un intervalo de dos semanas por medio de inyección IM. Todas las inmunizaciones se llevaron a cabo en ausencia del adyuvante alumbre. Los títulos de IgG para los anticuerpos anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B se evaluaron mediante ELISA dos semanas después de la segunda inyección. Las tres proteínas de fusión demostraron inmunogenicidad elevada.

La Figura 18 muestra la protección contra la exposición a toxina B natural en ratones. Los ratones se inmunizaron tal como se indicó para la Figura 17 y tres semanas después se expusieron mediante inyección IP a una dosis letal de toxina B natural.

La Figura 19 muestra una comparación de ANT y la protección en hámsteres vacunados con C-TAB.G5.1 o C-TADCTB en ausencia o presencia de alumbre. Dos semanas después de la tercera vacunación, los hámsteres recibieron una dosis letal de toxina A o toxina B por medio de inyección IP.

La Figura 20 muestra la producción de ANT y la protección contra la exposición a la toxina A o a la toxina B en ratones inmunizados con C-TAB.G5.1 en diferentes regímenes. Comparación de la producción de ANT y la protección entre grupos de ratones vacunados por medio de inyección IM tres veces en los días 0, 3 y 14, o en los días 0, 7 y 21, o en los días 0, 14 y 28. Tres semanas después de la última inyección, los ratones se expusieron a una dosis letal de toxina A o toxina B (el panel A está en forma de tabla y el panel B está en forma de gráfica).

La Figura 21 muestra la protección (supervivencia) contra la exposición a la toxina A de *C. difficile* (55 ng/mouse) en ratones inmunizados con una única inyección de 10 µg de C-TAB.G5.1 y 12,5 µg de alumbre (en 100 µl). Dicha exposición se llevó a cabo a los 21 días, 35 días o 49 días tras la inmunización.

Descripción detallada

Descripción general

En la presente memoria se describe una composición inmunógena para inducir respuestas inmunitarias protectoras y/o terapéuticas a las toxinas A y B de *C. difficile* que comprende el uso de un polipéptido aislado C-TAB.G5 (SEQ ID N.º: 2) o a un derivado del mismo, C-TAB.G5.1 (SEQ ID N.º: 4), que comprende 19 unidades repetitivas (UR) de la toxina A y 23 unidades repetitivas (UR) de la toxina B o fragmentos peptídicos, o variantes de las mismas.

En la presente memoria se describen métodos para producir el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y el método para preparar la composición (p. ej., una vacuna) útil para la prevención y/o el tratamiento de una EACD en mamíferos. La siguiente descripción proporciona más detalles y ejemplos para la construcción, expresión y purificación de los polipéptidos aislados recombinantes, su uso como antígenos para inducir una respuesta inmunitaria específica, así como también para la evaluación de la protección en sujetos. Los sujetos pueden ser animales o humanos.

Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 para uso en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria se pueden preparar utilizando cualquiera de diversos métodos estándares. Por ejemplo, se puede

producir C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 utilizando técnicas de ADN recombinante estándares, en las que una célula hospedante adecuada se transforma con un vector de expresión apropiado que contiene una parte de un fragmento de ácido nucleico que codifica para la toxina (véase, p. ej., Dove *et al.*, Infect. Immun. 58:480-8 (1990) y Barroso *et al.*, Nucleic Acids Research 18:4004 (1990)). Se puede utilizar cualquiera de una amplia variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos recombinantes. Se puede producir C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en un hospedante procarionte (p. ej., una bacteria, tal como *E.coli* o *Bacillus*) o en un hospedante eucarionte (p. ej., células de levadura, células de mamífero (p. ej., células COS1, NIH3T3 o JEG3) o células de insectos (p. ej., células de *Spodoptera frugiperda* (SF9))). Dichas células están disponibles, por ejemplo, en la Colección estadounidense de cultivos tipos (ATCC, por sus siglas en inglés). El método de transformación y transfección y la elección del vector de expresión dependerán del sistema hospedante seleccionado. Los métodos de transformación y transfección se describen, p. ej., en Ausubel *et al.* ISBN: 047132938X C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, en particular los fragmentos cortos, se pueden producir también mediante síntesis química, p. ej., mediante métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 1984, 2ª ed., Stewart and Young, Eds., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill, o mediante métodos de traducción in vitro estándares.

Además de las secuencias de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, en la presente memoria se describen variantes de las mismas que son funcionalmente activas e inmunógenas. Las variantes pueden tener el mismo nivel de inmunogenicidad que C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. La variante puede tener sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácido en comparación con la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 4. Los genes que codifican para C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 o una variantes de los mismos pueden producirse utilizando métodos estándares (véase más adelante; véase también, p. ej., Ausubel *et al.*, supra).

Además de las secuencias de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, en la presente memoria se describen más derivados de C-TAB.G5 que comprenden repeticiones adicionales. A modo de ejemplo, una proteína de fusión, C-TABNCTB (SEQ ID N.º: 18, codificada por SEQ ID N.º: 17), comprende, al igual que C-TAB.G5, 19 unidades repetitivas de CTA (aminoácidos 2272-2710), 23 unidades repetitivas de CTB (aminoácidos 1850-2366) y 10 repeticiones más adicionales de CTB (aminoácidos 1834-2057) fusionadas con el extremo C de CTB. Una variante adicional, la proteína de fusión C-TADCTB (SEQ ID N.º: 20, codificada por SEQ ID N.º: 19) comprende C-TAB.G5 (19 repeticiones de CTA y 23 repeticiones de CTB) más 24 unidades repetitivas adicionales de CTB (aminoácidos 1834-2366) fusionadas con el extremo C de C-TAB.G5. Una variante también puede comprender copias adicionales de C-TAB.G5 o porciones del mismo. Por ejemplo, C-TADCTB comprende una porción doble de las unidades repetitivas de CTB presentes en C-TAB.G5.

En la presente memoria se describen métodos para la expresión elevada de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en un sistema bacteriano tal como *E. coli* que comprenden introducir un ácido nucleico que codifica para C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en una célula hospedante bacteriana y expresar C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1.

Además, el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente memoria se puede acoplar covalentemente o reticular con adyuvantes (véase, por ejemplo, Cryz *et al.*, Vaccine 13:67-71(1994); Liang *et al.*, J. Immunology 141:1495-501 (1988) y Czerkinsky *et al.*, Infect. Immun. 57:1072-77(1989)).

En la presente memoria se describe una vacuna que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 que puede proteger y proporcionar terapia contra EACD. La vacuna descrita en la presente memoria comprende un antígeno nuevo que puede administrarse por vía intramuscular (IM), intradérmica (ID), subcutánea (SC), oral, nasal, bucal o rectal. La vacuna puede proporcionar protección inmunitaria o inducir anticuerpos para inmunización pasiva.

El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente memoria proporciona una vacuna para inmunizar contra EACD. El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente memoria o variantes del mismo, es un candidato de vacuna combinada orientado a ampliar la cobertura protectora contra enfermedades asociadas a *C. difficile*, tal como EACD, hasta un nivel desconocido o no publicado hasta ahora. Este concepto de una única vacuna que ofrece protección o una disminución de la gravedad de enfermedades asociadas a *C. difficile* representa un paso único hacia la gestión de la salud pública a nivel mundial y especialmente hacia la reducción de la gravedad de las epidemias (p. ej., residencias de ancianos, cruceros).

Tal como se emplea en la presente memoria, «proteína toxina A» o «proteína toxina B» hace referencia a proteínas tóxicas de *C. difficile* que son las principales responsables de EACD. La toxina A y la toxina B comprenden múltiples unidades repetitivas responsables de la inmunogenicidad en dominios de unión en el extremo C.

Tal como se emplea en la presente memoria, «natural» hace referencia a una proteína de longitud completa que consta de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos tal como se encontraría endógenamente en una célula hospedante.

Tal como se emplean en la presente memoria, los términos «enfermedad asociada a *Clostridium difficile*», «enfermedad relacionada con *Clostridium difficile*», «enfermedad medida por toxina de *Clostridium difficile*», «infección por *Clostridium difficile*» y «EACD» hacen referencia a enfermedades causadas, de forma directa o indirecta, por infección con *Clostridium difficile*.

«Antígeno» hace referencia a una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica cuando se presenta a células inmunitarias de un organismo. Por ejemplo, un antígeno puede ser un ácido nucleico, una proteína, un polipéptido, un péptido, una glicoproteína, un carbohidrato, un lípido, un glicolípido, una lipoproteína, una proteína de fusión, un fosfolípido o un conjugado de una combinación de los mismos. Un antígeno puede comprender un único epítipo inmunógeno, o una multiplicidad de epítopos inmunógenos reconocidos por un receptor de linfocito B (es decir, anticuerpo sobre la membrana del linfocito B) o un receptor de linfocito T. El antígeno puede proporcionarse como una partícula similar a virus (VLP, por sus siglas en inglés) o un microbio o microorganismo entero tal como, por ejemplo, una bacteria o virión. El antígeno puede ser un virus vivo desactivado o atenuado. El antígeno puede obtenerse de un extracto o lisado, de células enteras o de la membrana sola; o el antígeno puede sintetizarse químicamente o producirse por medios recombinantes. Un antígeno se puede administrar solo o con un adyuvante. Una molécula de antígeno simple puede tener propiedades de antígeno y adyuvante.

«Adyuvante» significa cualquier sustancia que se emplea para potenciar de forma específica o no específica una respuesta inmunitaria específica para un antígeno, tal vez a través de la activación de células que presentan antígeno. Los ejemplos de adyuvantes incluyen una emulsión oleosa (p. ej., adyuvante de Freund completo o incompleto), adyuvante Montanide incompleto de Seppic tal como ISA, adyuvantes de emulsión de aceite en agua tales como el sistema adyuvante Ribi, formulación adyuvante syntax que contiene dipéptido de muramilo, adyuvante de sal de aluminio (ALUM), polímero policatiónico, especialmente péptido policatiónico, especialmente poliarginina o un péptido que contiene al menos dos motivos LysLeuLys, especialmente KLKLLLLLKLK, oligodesoxinucleótido (ODN) inmunoestimulador que contiene dinucleótidos de citosina-guanina no metilados (CpG) en un contexto de bases definido (p. ej., tal como se describe en WO 96/02555) o ODN basados en inosina y citidina (p. ej., tales como se describen en WO 01/93903), o ácido desoxinucleico que contiene residuos desoxi-inosina y/o desoxiuridina (tales como se describen en WO 01/93905 y WO 02/095027), especialmente Oligo(dIdC)₁₃ (tal como se describe en WO 01/93903 y WO 01/93905), compuesto neuroactivo, especialmente hormona de crecimiento humana (descrita en WO 01/24822), o combinaciones de estos, una quimiocina (p. ej., defensinas 1 o 2, RANTES, MIP1- α , MIP-2, interleucina-8, o una citocina (p. ej., interleucina-1 β , -2, -6, -10 o -12; interferón- γ ; factor de necrosis tumoral- α ; o factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos) (descrito en Nohria and Rubin, 1994), una variante dipeptídica de muramilo (p. ej., murabutida, treonil-MDP o tripéptido de muramilo), variantes sintéticas de MDP, una proteína de choque térmico o una variante, una variante del LeIF principal de Leishmaniasis (Skeiky *et al.*, 1995, J. Exp. Med. 181: 1527-1537), variantes no tóxicas de exotoxinas ADP-ribosilantes bacterianas (bARE, por sus siglas en inglés) incluidas variantes en el sitio de escisión por tripsina (Dickenson and Clements, (1995) Infection and Immunity 63 (5): 1617-1623) y/o bARE que afectan la ADP-ribosilación (Douce *et al.*, 1997) o químicamente destoxificadas (anatoxinas), QS21, Quill A, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-[1,2-dipalmitoil-s-glicero-3-(hidroxifosforiloxi)]etilamida (MTP-PE) y composiciones que contienen un aceite metabolizable y un agente emulsionante. Un adyuvante se puede administrar con un antígeno o se puede administrar solo, ya sea por la misma vía que el antígeno o por una vía diferente a la del antígeno. Una molécula de adyuvante simple puede tener propiedades de adyuvante y antígeno.

«Cantidad eficaz» significa una cantidad de un agente terapéutico suficiente para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica para antígeno, para un antígeno, o tratar o diagnosticar una afección, para un fármaco. Dicha inducción de una respuesta inmunitaria puede proporcionar un tratamiento tal como, por ejemplo, inmunoprotección, desensibilización, inmunosupresión, modulación de una enfermedad autoinmunitaria, potenciación de inmunovigilancia del cáncer o vacunación terapéutica contra una enfermedad infecciosa establecida. El tratamiento incluye cura, mejora o prevención.

«Ácido nucleico» significa una base de ácido desoxirribonucleico simple o un ácido ribonucleico o una secuencia de los mismos unidos mediante enlaces fosfodiéster.

«Agente terapéutico» significa cualquier molécula que se puede utilizar para tratar una enfermedad, aliviar los síntomas de una enfermedad, prevenir una enfermedad o diagnosticar una enfermedad. Por ejemplo, un agente terapéutico puede ser un antígeno o un fármaco.

«Sujeto» significa un animal. El sujeto puede ser cualquier animal, incluido cualquier vertebrado. El sujeto puede ser ganado doméstico, animales de laboratorio (incluidos, pero sin limitarse a, roedores tales como una rata, hámster, jerbo o ratón) o un animales de compañía. En una realización, el animal puede ser un mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen humanos, primates, marsupiales, caninos, monos, roedores, felinos, simios, ballenas, delfines, vacas, cerdos y caballos. El sujeto puede necesitar tratamiento para una enfermedad o puede necesitar un tratamiento profiláctico.

Como se emplea en la presente memoria, el término «anticuerpo» significa una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno específico. Estos anticuerpos son conocidos por los expertos en la ciencia de la inmunología. Como se emplea en la presente memoria, el término «anticuerpo» significa no solo moléculas de anticuerpo de longitud completa sino también fragmentos de moléculas de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse al antígeno. Dichos fragmentos también son conocidos en la técnica y se emplean con regularidad in vitro e in vivo. En particular, como se emplea en la presente memoria, el término «anticuerpo» significa no solo moléculas de inmunoglobulina de

longitud completa sino también fragmentos activos de unión a antígeno tales como los conocidos fragmentos activos F(ab')₂, Fab, Fv, y Fd.

5 Como se emplea en la presente memoria, el término «variantes» puede incluir proteínas y/o polipéptidos y/o péptidos que son diferentes con respecto a un polipéptido natural, en el que uno o más residuos han sido sustituidos de forma conservadora por un residuo funcionalmente similar y que además exhibe propiedades funcionales sustancialmente idénticas a las del polipéptido natural. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen sustitución de un residuo no polar (hidrófobo) por otro (p. ej., isoleucina, valina, leucina o metionina), sustitución de un residuo polar (hidrófilo) por otro (p. ej., entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina), sustitución de un residuo básico por otro (p. ej., lisina, arginina o histidina), o sustitución de un residuo ácido por otro (p. ej., ácido aspártico o ácido glutámico). Una variante puede incluir cualquier polipéptido que tiene una estructura terciaria sustancialmente idéntica a la de un polipéptido de la invención, que también exhibe las propiedades funcionales de los polipéptidos tales como se describen en la presente memoria. Una variante puede ser un mutante de un polipéptido natural.

15 Como se usa en la presente memoria, «tratamiento» puede incluir cualquier tipo de intervención empleada en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula. El tratamiento puede incluir, pero no se limita a, administración de p. ej., una composición farmacéutica, sola o en combinación con otras modalidades de tratamiento conocidas en general en la técnica. El «tratamiento» puede realizarse de forma profiláctica o después del inicio de un evento patológico.

20 Como se emplea en la presente memoria, «vehículo farmacéuticamente aceptable» puede incluir cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente conserve la actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes y solubilizantes. En general, la naturaleza del vehículo o excipiente dependerá del modo de administración específico que se empleará. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden normalmente fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como el agua, disolución salina isotónica, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (p. ej. en forma de polvo, pastilla, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se administrarán pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tampón de pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

25 Como se emplea en la presente memoria, «fusión» puede hacer referencia a ácidos nucleicos y polipéptidos que comprenden secuencias que no se encuentran asociadas naturalmente entre sí en el orden o contexto en el que se colocan según la presente invención. Un ácido nucleico o polipéptido de fusión no comprende necesariamente la secuencia natural del ácido nucleico o polipéptido en su totalidad. Las proteínas de fusión tienen los dos o más segmentos ligados entre sí a través de enlaces peptídicos normales. Los ácidos nucleicos de fusión tienen los dos o más segmentos ligados entre sí a través de enlaces fosfodiéster normales.

Polipéptidos aislados

40 En la presente memoria se describen los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 tales como se establecen en SEQ ID N. °: 2 y SEQ ID N. °: 4, respectivamente, que comprende 19 unidades repetitivas de la toxina A de *C. difficile* y 23 unidades repetitivas de la toxina B de *C. difficile*. Un homólogo de C-TAB.G5, tal como C-TAB.G5.1, puede diferir respecto a C-TAB.G5 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. El polipéptido C-TAB.G5.1 es una proteína de fusión que contiene el mismo dominio de extremo C de la toxina B que C-TAB.G5, pero el dominio de extremo C de la toxina A derivado de la cepa VPI-10463 de *C. difficile* que es un homólogo del correspondiente al polipéptido C-TAB.G5 derivado de la cepa 630 de *C. difficile* y difiere en dos aminoácidos en las posiciones 155-156. La secuencia codificante de C-TAB.G5.1, tal como se establece en SEQ ID N. °: 3, se optimizó por medio de codones para obtener una expresión mejorada dentro de una célula hospedante *E. coli*. Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente pueden ser eficaces para neutralizar los efectos tóxicos de la toxina A y la toxina B de *C. difficile*.

50 La toxina A y la toxina B son codificadas por los genes *trdA* (SEQ ID N. °: 5) y *trdB* (SEQ ID N. °: 7) de la cepa 630 de *C. difficile*, respectivamente. Estructuralmente, las toxinas de *C. difficile* comprenden un dominio de ADP-glucosiltransferasa, un dominio de cisteína proteasa, una región hidrófoba y una región de unión a receptor. El dominio del extremo C contiene unidades altamente repetitivas (UR) (también conocidas como oligopéptidos repetitivos combinados (CROPS, por sus siglas en inglés)). Las UR pueden ser oligopéptidos largos o cortos y pueden comprender 20 a 50 aminoácidos con un motivo YYF consenso que está repetido. Las UR están agrupadas en aglomeraciones. A modo de ejemplo, la toxina A, de la cepa 630 (SEQ ID N. °: 6) codificada por el gen *trdA* natural (SEQ ID N. °: 5) contiene 39 UR. Las 39 UR están agrupadas en 8 aglomeraciones. La toxina B, de la cepa 630 (SEQ ID N. °: 8) codificada por el gen *trdB* natural (SEQ ID N. °: 7) contiene 24 UR que están agrupadas en 5 aglomeraciones. Las Tablas 1 y 2 a continuación muestran las posiciones de aminoácido de cada una de las UR en la toxina A y la toxina B de *C. difficile* codificadas por el gen *trdA* y el gen *trdB*.

ES 2 631 032 T3

Tabla 1: Unidades repetitivas de la toxina A (URA)

AGLOMERACIÓN	REPETICIÓN	INICIO DE AA (SEQ ID N.º: 6)	SEQ.
1	S1	1832	GLININNSLFFYFDPIEPLVT
	S1	1853	GWQTINGKKYYFDINTGAAL
	S3	1874	SYKIINGKHPYFNNDGVMQL
	L	1894	GVFKGPDGFYFAPANTQNNNIEGQAIVYQS
2	S1	1925	KFLTLNGKKYYFDNNSKAVT
	S2	1945	GWRIINNEKYYFNPNAIAAV
	S3	1966	GLQVIDNNKYYFNPDTAISK
	S4	1987	GWQTVNGSRYYTDTDTAIAFN
	S5	2008	GYKTIDGKHIFYFSDCVVKI
	L	2028	GVFSTSNGFYFAPANTYNNNIEGQAIVYQS
3	S1	2059	KFLTLNGKKYYFDNNSKAVT
	S2	2079	GLQTIDSKKYYFNTNTAEEAAT
	S3	2100	GWQTIDGKKYYFNTNTAEEAAT
	S4	2121	GWQTIDGKKYYFNTNTAIAST
	S5	2142	GYTIINGKHPYFNNDGIMQI
	L	2162	GVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
4	S1	2193	EFLTLNGKKYYFGSDSKAVT
	S2	2213	GWRIINNKYYFNPNAIAAI

ES 2 631 032 T3

AGLOMERACIÓN	REPETICIÓN	INICIO DE AA (SEQ ID N.º: 6)	SEQ.
	S3	2234	HLCTINNDKYYFSYDGILQN
	S4	2254	GYITIERNNFYFDANNESKMVT
	L	2276	GVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQN
5	S1	2307	KFLTLNGKKYYFDNDSKAVT
	S2	2328	GWQTIDGKKYYFNLNTAEAAT
	S3	2349	GWQTIDGKKYYFNLNTAEAAT
	S4	2370	GWQTIDGKKYYFNTNTFIAS
	S5	2391	GYTSINGKHFYFNTDGIMQI
	L	2411	GVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
6	S1	2441	KFLTLNGKKYYFGSDSKAVT
	S2	2460	GLRTIDGKKYYFNTNTAVAVT
	S3	2482	GWQTINGKKYYFNTNTSIAST
	S4	2503	GYTIISGKHFYFNTDGIMQI
	L	2523	GVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQN
7	S1	2554	RFLYLHDNIYYFGNNSKAAT
	S1	2574	GWVTIDGNRYFEPNTAMGAN
	S3	2595	GYKTIDNKNFYFRNGLPQI
	L	2614	GVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQN

ES 2 631 032 T3

AGLOMERACIÓN	REPETICIÓN	INICIO DE AA (SEQ ID N.º: 6)	SEQ.
8	S1	2645	RFLHLLGKIYYFGNNSKAVT
	S2	2665	GWQTINGKVYYFMPDTAMAAAG
	S3	2687	GLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGIYG

S: indica una unidad repetitiva corta

L: indica una unidad repetitiva larga

Tabla 2: Unidades repetitivas de la toxina B (URB)

AGLOMERACIÓN	REPETICIÓN	INICIO DE AA (SEQ ID N.º: 8)	SEQ.
1	S1	1834	GLIYINDSLYYFKPPVNNLIT
	S2	1854	GFVTVGDDKYYFNPINGGAASI
	S3	1877	GETIIDDKNYYFNQSGVLQT
	L	1897	GVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFT
2	S1	1927	GKLIIDENIYYFDDNYRGAV
	S2	1947	EWKELDGEMHYFSPETGKAFK
	S3	1968	GLNQIGDYKYYSNSDGVMMQK
	S4	1988	GFVNINDKTFYFDDSGVMKS
	S5	2008	GYTEIDGKHFYFAENGEMQI
	L	2028	GVFNTEGDKYFAHHNEDLGNEEGEEISYS
3	S1	2058	GILNFNNKIYYFDDSFYAVG

AGLOMERACIÓN	REPETICIÓN	INICIO DE AA (SEQ ID N.º: 8)	SEQ.
	S2	2078	WKDLEDGSKYYFDEDTAEAI
	S3	2098	GLSLINDGQYYFNDDGIMQV
	S4	2119	GFVTINDKVFYFSDSGHIES
	S5	2139	GVQNIDDNYFYIDDNGIVQI
	L	2159	GVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYS
4	S1	2189	GLVRVGEDVYYFGETYTIETGWI
	S2	2213	YDMENESDKYYFNPETKKACK
	S3	2234	GINLIDDIKYYFDEKGIMRT
	S4	2254	GLISFENNNYYFNENGEMQF
	S5	2274	GYINIEDKMFYFGEDGVMQI
	L	2294	GVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYT
5	S1	2324	GWLDLDEKRYFTDEYIAAT
	S2	2344	GSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

S: indica una unidad repetitiva corta

L: indica una unidad repetitiva larga

5 Por consiguiente, los polipéptidos aislados C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1 comprenden 19 UR del dominio del extremo C de la toxina A de *C. difficile* y 23 RU del dominio del extremo C de la toxina B de *C. difficile*, respectivamente. C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 comprende los aminoácidos de la toxina A 2272-2710 de SEQ ID N.º: 6 fusionados con los aminoácidos de la toxina B 1850-2366 de SEQ ID N.º: 8. El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 comprende la secuencia de aminoácidos tal como se establece en SEQ ID N.º: 2 y SEQ ID N.º: 4, respectivamente.

10 Las UR respectivas en el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 también puede ser de variantes de la toxina A o la toxina B de *C. difficile*. Estas UR en el polipéptido aislado C-TAB también pueden ser una combinación de la toxina A o la toxina B de origen natural de *C. difficile* o variantes de las mismas.

15 Las UR en los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 comprenden UR largas y UR cortas, y las UR largas y las UR cortas están dispuestas en una aglomeración. Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 de la presente invención comprenden 4 aglomeraciones de 3 a 5 UR cortas seguidas de una UR larga de la toxina A de *C. difficile* y 5 aglomeraciones de 3 a 5 UR cortas seguidas de una UR larga de la toxina B de *C. difficile*.

Las UR cortas y largas contienen motivos conservados. La unidad repetitiva corta puede comprender 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 aminoácidos. Cada unidad repetitiva corta puede comprender motivos de tirosina

conservados tales como YYF, FYF, YFF, FYT o HYF. Una unidad repetitiva corta puede comprender además un residuo de aspartato/histidina antes del motivo de tirosina si la unidad repetitiva siguiente es una unidad repetitiva larga. La unidad repetitiva larga puede comprender 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 aminoácidos. Cada unidad repetitiva larga puede comprender un motivo repetido de tirosina tal como FEYF, FKYF o YKYF.

5 En la presente invención, las porciones de toxina A y toxina B de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 pueden estar fusionadas directamente entre sí. Las porciones de toxina A y toxina B pueden estar separadas por una región enlazadora. Una región enlazadora puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a 15, 20 a 30, 40, 45 o 50 aminoácidos. Los expertos en la técnica reconocerán que se puede adaptar la región enlazadora para alterar el posicionamiento de las porciones de la toxina A y la toxina B, de tal modo que cada unidad repetitiva de toxina, en sus formas expresada y plegada, en los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se posicione para exponer los epítomos potenciales de forma óptima y para conservar su inmunogenicidad. Las UR y las aglomeraciones en los polipéptidos aislados C-TAB también pueden estar separadas por enlazadores. En una realización, el enlazador comprende el péptido RSMH (439-442 de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4).

15 Los polipéptidos aislados C-TAB descritos en la presente pueden tener al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia o similitud de secuencia con la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 4. Como se conoce en la técnica, la «similitud» entre dos polipéptidos o polinucleótidos se determina al comparar la secuencia de aminoácidos o nucleótidos y sus sustituciones conservadoras de nucleótidos o aminoácidos de un polinucleótido o polipéptido con la secuencia de un segundo polinucleótido o polipéptido. También se conoce en la técnica la «identidad» que significa el grado de relación de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de polinucleótidos que se determina por la identidad de la coincidencia entre dos cadenas de dichas secuencias. Tanto la identidad como la similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Aunque existen varios métodos para medir la identidad y la similitud entre dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, los términos «identidad» y «similitud» son conocidos por los expertos en la técnica (Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994 y Carillo, H. y Lipman, D., SIAM J. Applied Math. 48:1073 (1988).

35 Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente memoria son inmunógenos. Por ejemplo, los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente memoria pueden tener al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la actividad inmunológica de la toxina A bacteriana correspondiente y los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 pueden tener al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la actividad inmunológica de la toxina B bacteriana correspondiente. Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente pueden utilizarse como vacunas para tratar, prevenir o aliviar los síntomas de EACD.

40 Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente también incluyen variantes del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 que tienen la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 4, respectivamente. Las variantes pueden tener inserciones, sustituciones y/o supresiones de aminoácidos que tienen un efecto mínimo o nulo sobre la actividad, función o forma del polipéptido aislado. Los ejemplos de dichas sustituciones incluyen la sustitución de un residuo no polar por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, la sustitución de un residuo básico por otro o la sustitución de un residuo ácido por otro. Las variantes de polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 pueden incluir además inserciones, sustituciones y/o supresiones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la toxina A o la toxina B natural que proporcionan un efecto mínimo sobre la actividad, función y/o estructura del polipéptido. Los expertos en la técnica reconocerán que también se pueden utilizar aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, beta-alanina (beta-Ala) u otros omega-aminoácidos, tales como 3-amino propiónico, 2,3-diamino propiónico (2,3-diaP), 4-amino butírico, entre otros, ácido alfa-aminisobutírico (Aib), sarcosina (Sat), ornitina (Orn), citrulina (Cit), t-butilalanina (t-BuA), t-butilglicina (t-BuG), N-metilisoleucina (N-Melle), fenilglicina (Phg) y ciclohexilalanina (Cha), norleucina (Nle), ácido cisteico (Cya), 2-naftilalanina (2-Nal); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); beta-2-tienilalanina (Thi); y sulfóxido de metionina (MSO).

55 Las secuencias de nucleótidos que codifican para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente se pueden optimizar por medio de codones para potenciar la expresión en diversas células hospedantes. La optimización por medio de codones hace referencia a la modificación de la secuencia de nucleótidos a efectos de potenciar la expresión proteica en una célula hospedante de interés mediante el reemplazo de uno o más codones de la secuencia natural por codones que se utilizan de forma más frecuente en los genes de dicha célula hospedante o en los genes del hospedante del cual deriva la célula. Diversas especies exhiben una preferencia específica por

determinados codones de un aminoácido específico. En la presente se describe una secuencia de nucleótidos optimizada por medio de codones que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5.1 para una expresión potenciada en *E. coli*.

5 Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida. Por ejemplo, los polipéptidos aislados se pueden expresar a través de ingeniería genética. A modo de ejemplo, la traducción de ADN recombinante. Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 también se pueden preparar sintéticamente. A modo de ejemplo, los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se pueden sintetizar utilizando la técnica sintética en fase sólida descrita inicialmente por Merrifield (J. Am Chem. Soc. 85:2149-2154). Se pueden encontrar otras técnicas de síntesis de polipéptidos, por ejemplo, en Kent *et al.* (1985) en Synthetic Peptides in Biology and Medicine, eds. Alitalo *et al.*, Elsevier Science Publishers, 295-358.

10 Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente se pueden aislar u obtener en forma sustancialmente pura. Sustancialmente pura significa que las proteínas y/o polipéptidos y/o péptidos están esencialmente libres de otras sustancias con las cuales se pueden encontrar en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en una medida práctica y adecuada para su uso previsto. En particular, los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 son suficientemente puros y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de sus células hospedantes de forma tal que son útiles, por ejemplo, para generar anticuerpos, para secuenciación o para producir preparaciones farmacéuticas. Por medio de técnicas conocidas en la materia, se pueden producir polipéptidos sustancialmente puros teniendo en cuenta las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos descritas en la presente memoria. Dado que un polipéptido aislado sustancialmente purificado de la invención se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polipéptido aislado puede constituir solo un porcentaje determinado en peso de la preparación. Sin embargo, el polipéptido aislado es sustancialmente puro porque ha sido separado sustancialmente de las sustancias con las cuales puede estar asociado en sistemas vivientes.

25 En la presente memoria se describen polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 aislados que comprenden polipéptidos adicionales. Los polipéptidos adicionales pueden ser fragmentos de un polipéptido más grande. En una realización, hay uno, dos, tres, cuatro o más polipéptidos adicionales fusionados con los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En algunas realizaciones, los polipéptidos adicionales están fusionados en dirección al extremo amínico de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En otras realizaciones, los polipéptidos adicionales están fusionados en dirección al extremo carboxílico de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En realizaciones adicionales, los polipéptidos adicionales flanquean los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En otras realizaciones adicionales, los polipéptidos adicionales están dispersados entre la porción de toxina A y la porción de toxina B de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1.

30 En algunas realizaciones, los polipéptidos adicionales auxilian a orientar la secreción o localización subcelular de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Dichos polipéptidos se denominan «secuencia señal». Se describe una señal secretora, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.291.212 y la patente estadounidense 5.547.871. La secuencia señal secretora codifica para péptidos secretores. Un péptido secretor es una secuencia de aminoácidos que actúa para orientar la secreción de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 desde una célula. Los péptidos secretores en general se caracterizan por un núcleo de aminoácidos hidrófobos y se encuentran típicamente (pero no exclusivamente) en los extremos amínicos de las proteínas recientemente sintetizadas. El péptido secretor se puede escindir del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 durante la secreción. Los péptidos secretores pueden contener sitios de procesamiento que permiten la escisión del péptido señal de la proteína madura a medida que pasa a través de la vía secretora. Los sitios de procesamiento se pueden codificar dentro del péptido señal o se puede agregar al péptido señal mediante, por ejemplo, mutagénesis *in vitro*. Las secuencias señal secretoras pueden ser necesarias para una serie compleja de etapas de procesamiento postranslacionales para permitir la secreción de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. La secuencia señal puede estar inmediatamente después del codón de iniciación y codifica para un péptido señal en el extremo amínico de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. La secuencia señal puede preceder al codón de terminación y codifica para un péptido señal en el extremo carboxílico de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En la mayoría de los casos, la secuencia señal se extrae por escisión mediante una proteasa específica, denominada peptidasa señal. Los ejemplos de secuencias señal secretoras incluyen, pero no se limitan a, ompA, pelB y ST pre-pro.

45 En algunas realizaciones, los polipéptidos adicionales auxilian en la estabilización, estructura y/o purificación de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En algunas realizaciones, los polipéptidos adicionales pueden comprender un epítipo. En otras realizaciones, los polipéptidos adicionales pueden comprender una etiqueta de afinidad. A modo de ejemplo, la fusión de un polipéptido que comprende un epítipo y/o una etiqueta de afinidad con el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede auxiliar en la purificación y/o identificación del polipéptido. A modo de ejemplo, el segmento de polipéptido puede ser una etiqueta His, una etiqueta myc, una etiqueta S-péptido, una etiqueta MBP (proteína de unión a maltosa), una etiqueta GST (glutatión S-transferasa), una etiqueta FLAG, una etiqueta tiorredoxina, una etiqueta GFP (proteína verde fluorescente), una BCCP (proteína transportadora de biotina carboxilada), una etiqueta calmodulina, una etiqueta Strep, una etiqueta epítipo HSV, una etiqueta epítipo V5 y una etiqueta CBP. El empleo de dichos epítipos y etiquetas de afinidad es conocido por los expertos en la técnica.

50

En realizaciones adicionales, los polipéptidos adicionales pueden proporcionar un polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 que comprende sitios para la escisión del polipéptido. Como ejemplo, un polipéptido se pueden escindir por medio de hidrólisis del enlace peptídico. En algunas realizaciones, la escisión se lleva a cabo por medio de un enzima. En algunas realizaciones, la escisión se produce en la célula. En otras realizaciones, la escisión se produce a través de manipulación artificial y/o introducción artificial de una enzima de escisión. A modo de ejemplo, las enzimas de escisión pueden incluir pepsina, tripsina, quimotripsina, trombina y/o Factor Xa. La escisión facilita el aislamiento de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 de los polipéptidos. La escisión también puede permitir la separación de la porción de toxina A de la porción de toxina B. La escisión también puede permitir el aislamiento de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 fusionados con polipéptidos de otros polipéptidos, tal como a través de escisión de un epítipo utilizado para purificar la proteína expresada.

Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 pueden poseer además modificaciones estructurales adicionales no compartidas con el mismo péptido sintetizado orgánicamente, tal como adenilación, carboxilación, glicosilación, hidroxilación, metilación, fosforilación o miristilación. Estas modificaciones estructurales agregadas se pueden seleccionar o preferir adicionalmente a partir de la elección adecuada del sistema de expresión recombinante. Por otro lado, se puede extender la secuencia de los polipéptidos de fusión por medios de los principios y la práctica de la síntesis orgánica.

En la presente memoria se describen ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 que comprenden un porción de polipéptido obtenida de la toxina A de *C. difficile* y una porción de polipéptido obtenida de la toxina B de *C. difficile*. Los ácidos nucleicos pueden incluir formas mono o bicatenarias de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o polímeros de los mismos. En la presente memoria se describen ácidos ribonucleicos que codifican para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En la presente memoria se describen ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y el complemento del mismo. Condiciones rigurosas hace referencia al grado de homología entre una sonda y un ácido nucleico unido al filtro; cuanto mayor es la rigurosidad, más alto es el porcentaje de homología entre la sonda y el ácido nucleico unido al filtro. La temperatura para un lavado riguroso se puede determinar en función de la Tm del ácido nucleico (basada en el contenido de G/C). Las condiciones rigurosas también pueden ser afectadas por la concentración de sal en un tampón, tal como citrato de sodio estándar (SSC, por sus siglas en inglés). La presente invención proporcionar ácidos nucleicos que tienen alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de similitud de secuencia o identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1.

El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede comprender además una región enlazadora, por ejemplo, un enlazadores con menos de alrededor de 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de aminoácido. El enlazador puede enlazarse covalentemente con y entre la porción de polipéptido derivada de la toxina A o una porción de la misma y la porción de polipéptido derivada de la toxina B.

En la presente memoria se describen ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 que son redundantes con respecto a SEQ ID N.º: 1 o SEQ ID N.º: 3, respectivamente. La redundancia del código genético permite variaciones en la secuencia de nucleótidos de una proteína toxina A, una proteína toxina B y/o un polipéptido aislado de interés, mientras se sigue produciendo un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica a la del polipéptido codificado por la secuencia de ADN natural. El procedimiento, conocido como «optimización codónica» (descrito en la patente estadounidense 5.547.871) proporciona un medio para diseñar dicha secuencia de ADN alterada. El diseño de genes optimizados por medio de codones debe tener en cuenta diversos factores, incluida la frecuencia de uso de codones en un organismo, las frecuencias aleatorias más próximas, la estabilidad del ARN, el potencial para la formación de la estructura secundaria, la vía de síntesis y las futuras manipulaciones de ADN previstas de dicho gen. En particular, se pueden utilizar métodos disponibles para alterar los codones que codifican para un polipéptido aislado dado con aquellos más fácilmente reconocidos por levaduras cuando se utilizan sistemas de expresión en levadura o por células de insectos cuando se utiliza el sistema de expresión en células de insectos. La redundancia del código genético también permite que la misma secuencia de aminoácidos sea codificada y traducida de muchas formas diferentes. Por ejemplo, cada una de leucina, serina y arginina se codifica mediante seis codones diferentes, mientras que cada una de valina, prolina, treonina, alanina y glicina se codifica mediante cuatro codones diferentes. Sin embargo, la frecuencia de uso de dichos codones sinónimos varía de genoma a genoma entre eucariontes y procariontes. Por ejemplo, los patrones de elección de codones sinónimos entre mamíferos son muy similares, mientras que los organismos distantes a nivel evolutivo tales como levaduras (tales como *S. cerevisiae*), bacterias (tales como *E. coli*) e insectos (tales como *D. melanogaster*) revelan un patrón claramente diferente de frecuencias de uso de codones genómicos (Grantham, R., *et al.*, Nucl. Acid Res., 8, 49-62 (1980); Grantham, R., *et al.*, Nucl. Acid Res., 9, 43-74 (1981); Maroyama, T., *et al.*, Nucl. Acid Res., 14, 151-197 (1986); Aota, S., *et al.*, Nucl. Acid Res., 16, 315-402 (1988); Wada, K., *et al.*, Nucl. Acid Res., 19 Supp., 1981-1985 (1991); Kurland, C. G., FEBS Lett., 285, 165-169 (1991)). Estas diferencias en los patrones de elección de codones parecen contribuir a los niveles de expresión generales de genes individuales al modular las tasas de elongación peptídica. (Kurland, C. G., FEBS Lett., 285, 165-169 (1991); Pedersen, S., EMBO J., 3, 2895-2898 (1984); Sorensen, M. A., J. Mol. Biol., 207, 365-377 (1989); Randall, L. L., *et al.*, Eur. J. Biochem., 107, 375-379 (1980); Curran, J. F. y Yarus, M., J. Mol. Biol., 209, 65-77 (1989); Varenne, S., *et al.*, J. Mol. Biol., 180,

549-576 (1984), Varenne, S., *et al.*, J. Mol. Biol., 180, 549-576 (1984); Garel, J.-P., J. Theor. Biol., 43, 211-225 (1974); Ikemura, T., J. Mol. Biol., 146, 1-21 (1981); Ikemura, T., J. Mol. Biol., 151, 389-409 (1981)).

Las frecuencias de uso de codones preferidas para un gen sintético deben reflejar los usos de codones de genes nucleares derivados del genoma exacto (o lo más estrechamente relacionado posible) de la célula/organismo que se pretende utilizar para la expresión proteica recombinante.

Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, *et al.*, Nucl. Acid Res. 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403 (1990)). El grado de similitud o identidad mencionado anteriormente se determina como el grado de identidad entre las dos secuencias y a menudo indica que la primera secuencia deriva de la segunda. El grado de identidad entre dos ácidos nucleicos puede determinarse mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionada en el paquete de programas GCG (Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)). A los efectos de determinar el grado de identidad entre dos ácidos nucleicos para la presente invención, se utiliza GAP con la siguiente configuración: Penalización por creación de GAP (espacio) de 5,0 y penalización por extensión de GAP de 0,3.

En la presente memoria se describe un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Un vector puede ser cualquiera de varios ácidos nucleicos en los cuales se puede insertar una secuencia deseada mediante restricción y ligación para transporte entre diferentes entornos genéticos o para expresión en una célula hospedante. Los vectores están constituidos típicamente por ADN, aunque también hay vectores de ARN disponibles. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula hospedante y que se caracteriza además por uno o más sitios de restricción por endonucleasa en los cuales el vector se puede cortar de una forma determinable y en los cuales se puede ligar una secuencia de ADN de forma tal que el nuevo vector recombinante conserve su capacidad para replicarse en la célula hospedante. En el caso de los plásmidos, la replicación de la secuencia deseada se puede producir muchas veces a medida que el plásmido aumenta en cantidad de copias dentro de la bacteria hospedante o solo una única vez por hospedante antes de que el hospedante se reproduzca por mitosis. En el caso de un fago, la replicación se puede producir activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisógena.

Los vectores pueden contener además una secuencia promotora. Un promotor puede incluir un ácido nucleico no traducido generalmente ubicado antes de la región codificante que contiene el sitio para iniciar la transcripción del ácido nucleico. La región promotora también puede incluir otros elementos que actúan como reguladores de la expresión génica. En realizaciones adicionales de la invención, el vector de expresión contiene una región adicional para auxiliar en la selección de células que tienen el vector de expresión incorporado. La secuencia promotora está a menudo delimitada (inclusivamente) en su extremo en dirección a 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende hacia atrás (en dirección 5') para incluir la cantidad mínima de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en niveles detectables por encima del valor registrado. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucarióticos a menudo, pero no siempre, contendrán «secuencias TATA» y «secuencias CAT».

Los vectores pueden contener además una o más secuencias marcadoras adecuadas para uso en la identificación y selección de células que han sido transformadas o transfectadas con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican para proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o sensibilidad a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican para enzimas cuyas actividades son detectables mediante ensayos estándares conocidos en la técnica (p. ej., β -galactosidasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente el fenotipo de las células, hospedantes, colonias o calvas transformadas o transfectadas. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación y expresión autónomas de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los cuales están unidos funcionalmente.

Un vector de expresión es uno en el que se puede insertar un ácido nucleico deseado mediante restricción y ligación de forma tal que se una funcionalmente a las secuencias reguladoras y pueda expresarse como un transcrito de ARN. La expresión hace referencia a la transcripción y/o traducción de un gen, transgén o región codificante endógeno en una célula.

Una secuencia codificante está unida a secuencias reguladoras cuando las mismas están unidas covalentemente de modo tal que se coloca la expresión o transcripción de la secuencia codificante bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificantes se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas funcionalmente si la inducción de un promotor en la secuencia reguladora en dirección 5' resulta en la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza de la ligadura entre las dos secuencias de ADN no (1) resulta en la introducción de una mutación con desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de orientar la transcripción de la secuencias codificantes ni (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente de traducirse en una proteína. Por consiguiente,

una región promotora se uniría funcionalmente a una secuencia codificante si la región promotora fuera capaz efectuar la transcripción de dicha secuencia de ADN de forma tal que el transcrito resultante se tradujera en la proteína o el polipéptido deseado.

5 Los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente pueden producirse mediante la expresión del ácido nucleico codificante en células hospedantes. El ácido nucleico puede transformarse o transfectarse en células hospedantes. Por consiguiente, algunos aspectos descritos en la presente incluyen la transformación y/o transfección de ácido nucleico que codifica para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. La transformación es la introducción de ácido nucleico exógeno o heterólogo en el interior de una célula procarionte. La transfección es la introducción de ácido nucleico exógeno o heterólogo en el interior de una célula eucarionte. El ácido nucleico que se transforma o transfecta puede o no estar integrado (unido covalentemente) dentro del ADN cromosómico formando parte del genoma de la célula. En células procariontes, por ejemplo, el ácido nucleico que se transforma puede mantenerse en un elemento episómico tal como un plásmido o vector vírico. Con respecto a las células eucariontes, una célula transfectada de manera estable es una en la cual el ácido nucleico que se transfecta se ha integrado dentro el cromosoma de manera que este sea heredado por células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucarionte para establecer líneas celulares o clones que comprenden una población de células hijas que contienen el ácido nucleico transfectado.

20 Los cultivos de células eucariontes superiores se pueden utilizar para expresar las proteínas de la presente invención, ya sea de células de vertebrados o invertebrados, incluidos insectos, y los procedimientos de propagación de los mismos son conocidos (véase, por ejemplo, Kruse *et al.* (1973) Tissue Culture, Academic Press).

También se proporcionan células hospedantes y vectores para replicar los ácidos nucleicos y para expresar los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 codificados. Se puede utilizar cualquier vector o célula hospedante, ya sean procariontes o eucariontes. Muchos vectores y células hospedantes son conocidos en la técnica para dichos fines. La experiencia en la técnica conlleva el saber seleccionar un conjunto adecuado para la aplicación deseada.

25 Las secuencias de ADN que codifican para la toxina A y la toxina B, o porciones de las mismas, se pueden clonar a partir de una variedad de bibliotecas genómicas o de ADNc derivadas de *C. difficile* y otros procariontes conocidos en la técnica que expresan la toxina A y la toxina B. Las técnicas para aislar dichas secuencias de ADN utilizando métodos basados en sondas son técnicas convencionales y son conocidas por los expertos en la técnica. Las sondas para aislar dichas secuencias de ADN pueden basarse en secuencias de ADN o proteínas publicadas. Alternativamente, se puede utilizar el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) descrito por Mullis *et al.* (patente estadounidense N.º 4.683.195) y Mullis (patente estadounidense N.º 4.683.202). La elección de la biblioteca y la selección de sondas para el aislamiento de dichas secuencias de ADN se encuentran dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica.

35 Las células hospedantes adecuadas pueden derivar de procariontes o eucariontes. Los hospedantes procariontes adecuados incluyen: *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* tales como *S. aureus* y *S. epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Bacillus* tales como *B. subtilis* y *B. megaterium*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus* tales como *M. luteus* y *M. roseus* y *Proteus vulgaris*. Las células hospedantes adecuadas para expresar los polipéptidos de la presente invención en eucariontes superiores incluyen: levaduras tales como *Saccharomyces* (p. ej. *S. cerevisiae*); 293 (riñón embrionario humano) (ATCC CRL-1573); 293F (Invitrogen, Carlsbad, CA); 293T y la variante 293T/17 (293tsA1609neo y la variante ATCC CRL-11268) (riñón embrionario humano transformado con antígeno T de SV40); COS-7 (línea CVI de riñón de mono transformada con SV40) (ATCC CRL1651); BHK (células de riñón de hámster bebé) (ATCC CRL10); CHO (células de ovario de hámster chino); células de Sertoli de ratón; CVI (células de riñón de mono) (ATCC CCL70); VERO76 (células de riñón de mono verde africano) (ATCC CRL1587); HeLa (células de carcinoma cervical humano) (ATCC CCL2); MDCK (células de riñón canino) (ATCC CCL34); BRL3A (células de hígado de rata búfalo) (ATCC CRL1442); W138 (células de pulmón humano) (ATCC CCL75); HepG2 (células de hígado humano) (HB8065); y MMT 060652 (tumor mamario de ratón) (ATCC CCL51).

50 En la presente memoria se describen ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido aislado que comprende los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y polipéptidos adicionales. Los vectores útiles para construir sistemas de expresión eucarióticos para la producción de polipéptidos de fusión comprenden ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado unido funcionalmente con una secuencia de activación de la transcripción adecuada, tal como un promotor y/u operador. Otras características típicas pueden incluir sitios de unión a ribosoma adecuados, codones de terminaciones, potenciadores, terminadores o elementos replicón. Estas características adicionales se pueden insertar en el vector en el sitio o sitios adecuados mediante técnicas de empalme convencionales tales como digestión y ligación por endonucleasa de restricción.

60 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos adicionales pueden fusionarse con el ácido nucleico que codifica para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. El ácido nucleico fusionado puede codificar para polipéptidos que pueden auxiliar en la purificación y/o inmunogenicidad y/o estabilidad sin desplazar el marco de lectura codónica del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Los ácidos nucleicos fusionados pueden codificar para una secuencia secretora, que puede o no escindirse de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Los ácidos nucleicos

fusionados pueden no elongar de forma significativa el polipéptido expresado. Los ácidos nucleicos fusionados pueden codificar para menos de sesenta aminoácidos adicionales para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos fusionados están a continuación del ácido nucleico que codifica para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos fusionados preceden al ácido nucleico que codifica para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos fusionados flanquean al ácido nucleico que codifica para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos fusionados pueden codificar para un polipéptido que auxilia en la purificación de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico fusionado codificará para un epítipo y/o etiqueta de afinidad. Los ejemplos de polipéptidos que auxilian en la purificación incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta His, una etiqueta myc, una etiqueta S-péptido, una etiqueta MBP, una etiqueta GST, una etiqueta FLAG, una etiqueta tiorredoxina, una etiqueta GFP, una etiqueta BCCP, una etiqueta calmodulina, una etiqueta Strep, una etiqueta epítipo HSV, una etiqueta epítipo V5 y una etiqueta CBP. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos fusionados pueden codificar para un polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 que tiene un sitio orientado o propenso a la escisión. En una realización, el ácido nucleico fusionado puede codificar para polipéptidos que comprenden sitios de escisión enzimática. En realizaciones adicionales, la escisión enzimática puede auxiliar a aislar los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, así como también otros segmentos polipeptídicos fusionados, de otros polipéptidos adicionales. A modo de ejemplo, un ácido nucleico intermediario que codifica para un sitio de escisión enzimática colocado entre ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y un epítipo puede permitir la separación posterior de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 expresados y el epítipo. Dichos sitios también pueden estar presentes entre la porción de toxina A y la porción de toxina B.

En la presente memoria se describen sistemas de expresión diseñados para auxiliar a expresar y proporcionar los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. El sistema de expresión puede comprender una célula hospedante transformada o transfectada con un ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. La célula hospedante puede ser un procarionte. El procarionte puede ser *E. coli*. La célula hospedante puede ser una célula eucarionte.

El sistema de expresión puede comprender además agentes que ayudan en la selección de las células hospedantes transformadas o transfectadas de forma exitosa con un ácido nucleico que codifica para los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede expresar además un gen que ayuda a la célula hospedante en la resistencia a antibióticos, tales como genes para resistir a la kanamicina o gentamicina o ampicilina o penicilina. Dichos genes resistentes permitirán la selección de células hospedantes que tienen incorporado de forma adecuada el ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, tal como lo saben los expertos en la técnica.

Otro aspecto descrito en la presente está dirigido a la generación de anticuerpos. Los ejemplos de anticuerpos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos producidos mediante la inmunización de un sujeto con el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Los anticuerpos generados mediante la inmunización con el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se pueden unir específicamente a la toxina A o la toxina B, o pueden hacer reacción cruzada con el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Los anticuerpos producidos por los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente memoria pueden caracterizarse utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos producidos utilizando el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 de la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (p. ej., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena pesada solo, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos de dominio simple, variantes de los mismos, polipéptidos aislados que comprende una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina molécula que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno con la especificidad requerida, incluidas variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos preferidos derivan de ratón, rata, humano, conejo, canino, porcino, dromedario, camello, llama, felino, primate o cualquier otro origen (incluidos anticuerpos quiméricos, fragmentos y/o anticuerpos humanizados).

En otras realizaciones, los anticuerpos producidos mediante inmunización con el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 después se humanizan mediante métodos conocidos en la técnica. Un anticuerpo humanizado es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En otras realizaciones adicionales, se obtienen anticuerpos completamente humanos utilizando ratones disponibles en el mercado que se han genomanipulado para expresar proteínas inmunoglobulinas humanas específicas. En otras realizaciones, los anticuerpos son quiméricos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que combina características de dos anticuerpos diferentes. Los métodos para preparar anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica.

En otras realizaciones, se obtiene la secuencia nucleotídica que codifica para los anticuerpos y después se clona en un vector para expresión o propagación. En otra realización, los anticuerpos se producen de forma recombinante y

se expresan utilizando métodos conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede utilizarse como antígeno a los efectos de aislar anticuerpos recombinantes por medio de estas técnicas. Los anticuerpos se pueden producir de forma recombinante mediante el uso de secuencias génicas para expresar el anticuerpo de forma recombinante en células hospedantes. Los métodos para producir variantes de anticuerpos y anticuerpos recombinantes se conocen en la técnica.

En otras realizaciones, los anticuerpos se unen a un vehículo mediante métodos convencionales en la técnica, para uso, por ejemplo, para aislar o purificar toxina A o toxina B natural o detectar toxina A o toxina B natural o *C. difficile* en una muestra biológica o espécimen.

Composiciones y formulaciones

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Las composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente generalmente comprende, a modo de ejemplo y no como limitación, una cantidad eficaz del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 (p. ej., una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria) descrito en la presente o un anticuerpo contra los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 (p. ej., una cantidad de un anticuerpo neutralizante suficiente para mitigar la infección, aliviar un síntoma de la infección y/o prevenir la infección). La composición farmacéutica puede comprender además vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica (véase, en general, Remington, (2005) *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams and Wilkins).

El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente memoria se puede utilizar en métodos para inmunizar o tratar humanos y/o animales con la EACD. Por lo tanto, los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se pueden utilizar en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender además vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención son convenciones y pueden incluir tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes y solubilizantes. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15a Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los polipéptidos descritos en la presente memoria. En general, la naturaleza del vehículo o excipiente dependerá del modo de administración específico que se empleará. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden normalmente fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como el agua, disolución salina isotónica, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (p. ej. en forma de polvo, pastilla, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se administrarán pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tampón de pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

En una realización, la composición farmacéutica puede comprender además una sustancia inmunoestimulante, tal como un adyuvante. El adyuvante se puede seleccionar en función del método de administración y pueden incluir adyuvantes basados en aceite mineral tales como el adyuvante de Freund completo o incompleto, adyuvante Montanide incompleto de Seppic tal como ISA, adyuvantes de emulsión de aceite en agua tales como el sistema adyuvante Ribi, formulación adyuvante syntax que contiene dipéptido de muramilo, hidróxido de aluminio o adyuvante de sal de aluminio (alumbre), polímero policatiónico, especialmente péptido policatiónico, especialmente poliarginina o un péptido que contiene al menos dos motivos LysLeuLys, especialmente KLKLLLLLKLK, oligodesoxinucleótido (ODN) inmunoestimulador que contiene dinucleótidos de citosina-guanina no metilados (CpG) en un contexto de bases definido (p. ej., tal como se describe en WO 96/02555) o ODN basados en inosina y citidina (p. ej., tales como se describen en WO 01/93903), o ácido desoxinucleico que contiene residuos desoxi-inosina y/o desoxiuridina (tales como se describen en WO 01/93905 y WO 02/095027), especialmente Oligo(dIdC)₁₃ (tal como se describe en WO 01/93903 y WO 01/93905), compuesto neuroactivo, especialmente hormona de crecimiento humana (descrita en WO 01/24822) o combinaciones de estos. Dichas combinaciones se hacen según las descritas, por ejemplo, en WO 01/93905, WO 02/32451, WO 01/54720, WO 01/93903, WO 02/13857, WO 02/095027 y WO 03/047602. Preferiblemente, el adyuvante es un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Los vehículos, excipientes o estabilizadores son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones que se administran. Los vehículos, excipientes o estabilizadores pueden comprender además tampones. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos (tales como monosacáridos y disacáridos), azúcares (tales como sacarosa, manitol y sorbitol), fosfato, citrato, antioxidantes (tales como ácido ascórbico y metionina), conservantes (tales como fenol, butamol, benzanol; aquilparabenos, catecol, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y m-cresol), polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas (tales como seroalbúmina o inmunoglobulinas), aminoácidos poliméricos hidrófilos, agentes quelantes (tales como EDTA), contraiones formadores de sales, complejos metálicos (tales como complejos Zn-proteína) y tensioactivos no iónicos (tales como TWEEN™ y polietilenglicol).

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede comprender además agentes adicionales que sirven para potenciar y/o complementar el efecto deseado. A modo de ejemplo, para potenciar la inmunogenicidad del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 de la invención que se administra como una vacuna de subunidades, la composición farmacéutica puede comprender además un adyuvante.

5 Un ejemplo de una composición farmacéutica puede ser una composición inmunógena. En la presente memoria se describen composiciones inmunógenas que comprenden los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. La composición inmunógena puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otros vehículos y/o excipientes en una formulación adecuada para inyección en un mamífero. Una composición inmunógena es cualquier composición de material que desencadena una respuesta inmunitaria en un hospedante mamífero cuando la composición inmunógena se inyecta o se introduce de otra forma. La respuesta inmunitaria puede ser humoral, celular o ambas. Un efecto de refuerzo hace referencia a una respuesta inmunitaria aumentada a una composición inmunógena tras la exposición posterior del hospedante mamífero a la misma composición inmunógena. Una respuesta humoral resultada en la producción de anticuerpos por parte del hospedante mamífero tras la exposición a la composición inmunógena.

15 Las composiciones inmunógenas descritas en la presente memoria desencadenan una respuesta inmunitaria en un hospedante mamífero, incluidos humanos y otros animales. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta dependiente de la célula o una respuesta dependiente del anticuerpo o ambas; y además la respuesta puede proporcionar memoria inmunológica o un efecto de refuerzo o ambos en el hospedante mamífero. Estas composiciones inmunógenas son útiles como vacunas y pueden proporcionar una respuesta protectora por parte del sujeto u hospedante mamífero a la infección por cepas de *C. difficile*.

20 En la presente memoria se describen métodos para producir una composición inmunógena mediante la construcción de un ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y la expresión del componente de polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en un hospedante microbiano; recuperar el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 de un cultivo del hospedante; conjuguar el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 con un segundo componente proteico y recuperar la proteína conjugada y el componente polisacárido. El ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede mantenerse a lo largo del crecimiento del hospedante mediante presión selectiva constante y estable. Se puede conferir el mantenimiento del vector de expresión mediante la incorporación en el vector de expresión de una secuencia genética que codifica para un genotipo selectivo, cuya expresión en la célula hospedante microbiana resulta en un fenotipo selectivo. Una secuencia de genotipo selectivo también puede incluir un gen que complementa una mutación letal condicional. Se pueden incorporar otras secuencias genéticas en el vector de expresión, tales como otros genes de resistencia a fármacos o genes que complementan mutaciones letales. Los hospedantes microbianos pueden incluir: bacterias gram positivas; bacterias gram negativas, tales como *E. coli*; levaduras; hongos filamentosos; células de mamíferos; células de insectos; o células vegetales.

35 Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan un nivel de expresión del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en el hospedante a un nivel mayor que alrededor de 50 mg/litro del cultivo, un nivel mayor que alrededor de 100 mg/litro, un nivel mayor que alrededor de 500 mg/litro o un nivel mayor que alrededor de 1 g/litro. La proteína puede recuperarse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica para el aislamiento y la recuperación de proteínas, tales como precipitación en sulfato de amonio y posteriormente cromatografía de intercambio iónico.

En la presente memoria se describen métodos para preparar la composición inmunógena que proporciona que el componente de proteína se conjugue con un segundo componente de proteína mediante uno de varios medios conocidos por los expertos en la técnica, tal como una reacción de amidización.

45 En la presente memoria se describen formulaciones que comprenden el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 para tratar y prevenir EACD. En una realización, la formulación puede incluir el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente, un adyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la formulación incluye el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente o consiste esencialmente en uno o más polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descritos en la presente. La formulación puede comprender el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente y un adyuvante. La formulación puede incluir además un antígeno o un fármaco adicional. Además, la formulación puede incluir uno o más fármacos y puede incluir además del polipéptido aislado y/o adyuvante, uno o más fármacos.

55 La formulación que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede estar en forma líquida o seca. Una formulación seca se puede almacenar y transportar fácilmente. Las formulaciones secas prescinden de la cadena de frío requerida desde el lugar de fabricación de la vacuna hasta el local donde se lleva a cabo la vacunación. Alternativamente, el ingrediente activo seco de la formulación puede ser de por sí una mejora al proporcionar una forma en partículas sólidas que las células que presentan antígenos absorben y procesan. Estos posibles mecanismos no se describen para limitar el alcance de la invención o sus equivalentes, sino para facilitar el entendimiento del funcionamiento de la invención y guiar el uso de la formulación en la inmunización y vacunación.

- 5 Las formulaciones secas del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se pueden proporcionar en varias formas, por ejemplo, polvos finos o granulados, polvo liofilizado, películas uniformes, sedimentos o comprimidos. Se pueden secar al aire, secar a temperatura elevada, liofilizar, congelar o secar por pulverización, recubrir o pulverizar sobre un sustrato sólido y después secar, espolvorear sobre un sustrato sólido, congelar rápidamente y después secar lentamente al vacío o combinaciones de estas. Si diferentes moléculas conforman los ingredientes activos de la formulación, las mismas se pueden mezclar en disolución y después secar, o se pueden mezclar solo en forma seca.
- 10 Las formulaciones que comprenden el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en forma líquida o sólida, tal como una forma sólida, se pueden aplicar con uno o más adyuvantes en el mismo o en sitios separados o simultáneamente o en aplicaciones repetidas frecuentes. La formulación puede incluir otros antígenos de forma tal que la administración de la formulación induzca una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos. En tal caso, los otros antígenos pueden tener estructuras químicas diferentes a efectos de inducir una respuesta inmunitaria específica para diferentes antígenos. Al menos un antígeno y/o adyuvante se puede conservar en forma seca antes de la administración. La liberación posterior de líquido desde un reservorio o entrada de líquido hacia un reservorio que contiene el ingrediente seco de la formulación disolverá al menos parcialmente dicho ingrediente.
- 15 También se pueden incorporar sólidos (p. ej., partículas en dimensiones de nanómetros o micrómetros) en la formulación. Las formas sólidas (p. ej., nanopartículas o micropartículas) pueden auxiliar en la dispersión o solubilización de ingredientes activos; proporcionar un punto de acoplamiento para el adyuvante, polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, o ambos con un sustrato que se puede opsonizar mediante células que presentan antígeno, o combinaciones de estos. La liberación prolongada de la formulación desde un sólido poroso con forma de lámina, varilla o perla actúa como un depósito.
- 20 Al menos un ingrediente o componente de la formulación (es decir, polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, adyuvante o fármaco) se puede proporcionar en forma seca antes de la administración de la formulación. Esta formulación también se puede usar conjuntamente con técnicas de inmunización entéricas, mucosales o parenterales convencionales.
- 25 La formulación que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se puede fabricar en condiciones asépticas aceptables para las agencias reguladoras apropiadas (p. ej., la Dirección de Fármacos y Alimentos, EMEA (siglas en inglés para Agencia Europea de Medicamentos) para productos biológicos y vacunas). Opcionalmente, se pueden incluir componentes tales como desecantes, excipientes, estabilizadores, humectantes, conservantes o combinaciones de estos en la formulación aunque sean inmunológicamente inactivos. Sin embargo, pueden tener otras propiedades o características deseables.
- 30 Los procesos para la fabricación de una formulación farmacéutica son conocidos. Los componentes de la formulación se pueden combinar con un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, así como también con cualquier combinación de aditivos opcionales (p. ej., diluyentes, aglutinantes, excipientes, estabilizadores, desecantes, conservantes, colorantes). El uso de vehículos sólidos y la adición de excipientes para auxiliar en la solubilización de componentes secos o estabilizadores de la actividad inmunógena o adyuvante representan realizaciones preferidas. Véase, en general, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª Ed. (edición electrónica, 2003); Remington's Pharmaceutical Sciences, 22ª (Gennaro, 2005, Mack Publishing); Pharmaceutical Dosage Forms, 2ª Ed. (diversos editores, 1989-1998, Marcel Dekker); y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (Ansel *et al.*, 2005, Williams & Wilkins).
- 35 Las buenas prácticas de fabricación son conocidas en la industria farmacéutica y reguladas por las agencias gubernamentales (p. ej., la Dirección de Fármacos y Alimentos, la EMEA). Se pueden preparar formulaciones líquidas estériles al disolver un componente previsto de la formulación en una cantidad suficiente de un disolvente adecuado y posteriormente esterilizar mediante filtración para extraer los microbios contaminantes. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos componentes esterilizados de la formulación en un portador estéril que contiene el medio de dispersión básico. Para la producción de formas sólidas que debe ser estériles se puede utilizar secada al vacío o secado por congelamiento.
- 40 En general, las formas de dosificación sólidas (p. ej., polvos, gránulos, sedimentos, comprimidos) se pueden producir con al menos un ingrediente activo o componente de la formulación.
- 45 Los procedimientos adecuados para la formación de comprimidos son conocidos. La formulación también se puede producir al encapsular formas sólida de al menos un ingrediente activo, o mantenerlas separadas de los líquidos en compartimientos o cámaras. Se pueden utilizar el tamaño de cada dosis y el intervalo de dosificación para el sujeto para determinar el tamaño y la forma adecuados del comprimido, cápsula, compartimiento o cámara.
- 50 Las formulaciones contendrán una cantidad eficaz de ingredientes activos (p. ej., fármaco, antígeno y adyuvante) junto con un vehículo o cantidades adecuadas de portador a efectos de proporcionar composiciones farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración a un humano o animal.
- 55 Las cantidades relativas de ingredientes activos, tales como las cantidades de polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, dentro de una dosis y el régimen de dosificación se pueden ajustar según sea adecuado para la

administración eficaz a una sujeto (p. ej., animal o humano). Este ajuste también puede depender de la enfermedad o afección específica del sujeto y de se pretende brindar tratamiento o profilaxis. Para simplificar la administración de la formulación al sujeto, cada dosis unitaria contiene los ingredientes activos en cantidades predeterminadas para una única instancia de inmunización.

- 5 Existen numerosas causas de la inestabilidad o degradación del polipéptido, incluidas la hidrólisis y la desnaturalización. En el caso de la desnaturalización, se altera la conformación o estructura tridimensional de la proteína y la proteína se despliega y pierde su estructura globular habitual. En lugar de volver a plegarse en su conformación natural, la interacción hidrófoba puede provocar que las moléculas se acumulen (es decir, aglomeración) o que se vuelvan a plegar en una conformación no natural. Cualquiera de estos resultados pueden conducir a la disminución o pérdida de la actividad inmunógena o adyuvante. Se pueden agregar estabilizadores para reducir o prevenir dichos problemas.

- 10 La formulación, o cualquier intermediario en su producción, se puede pretratar con agentes protectores (es decir, crioprotectores y estabilizadores secos) y después someterse a tasas de enfriamiento y temperaturas finales que minimizan la formación de cristales de hielo. Mediante la selección adecuada de agentes crioprotectores y el uso de parámetros de secado preseleccionados, casi cualquier formulación podría crioprepararse para un uso final deseado adecuado.

- 15 Se ha de entender en la siguiente descripción de aditivos opcionales como excipientes, estabilizadores, desecantes y conservantes, que se describen por su función. Por consiguiente, una sustancia química específica puede actuar como una combinación de receptor, estabilizador, desecante y/o conservante. Dicha sustancia química sería inmunológicamente inactiva porque no induce de forma directa una respuesta inmunitaria, pero aumenta la respuesta al potenciar la actividad inmunológica del antígeno o adyuvante: por ejemplo, al reducir la modificación del antígeno o adyuvante o la desnaturalización durante el secado y los ciclos de disolución.

- 20 Los estabilizadores incluyen ciclodextrina y variantes de la misma (véase la patente estadounidense N.º 5.730.969). Se pueden agregar también conservantes adecuados tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina para estabilizar la formulación final (Howell y Miller, 1983). Se puede agregar a la formulación un estabilizador seleccionado de tensioactivos no iónicos, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido D-glucurónico, sales de ácido D-glucurónico, trehalosa, dextranos, almidones hidroxietílicos y mezclas de los mismos. La adición de una sal de metal alcalino o cloruro de magnesio puede estabilizar el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, y se puede incluir opcionalmente seroalbúmina y secar por congelamiento para potenciar adicionalmente la estabilidad. El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 también se puede estabilizar al ponerlo en contacto con un sacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrano, ácido condroitinosulfúrico, almidón, glicógeno, insulina, dextrina y sal de ácido algínico. Otros azúcares que se pueden agregar incluyen monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcar y mezclas de estos (p. ej., glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manitol, xilitol). Los polioles pueden estabilizar un polipéptido y son miscibles con agua o solubles en agua. Los polioles adecuados pueden ser alcoholes polihidroxi, monosacáridos y disacáridos que incluyen manitol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, trimetilglicol, pirrolidona vinílica, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa y polímeros de estos. Varios excipientes también pueden estabilizar a los polipéptidos, incluidos seroalbúmina, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos, tensioactivos, metales, polioles, agentes reductores, agentes quelantes metálicos, pirrolidona polivinílica, gelatina hidrolizada y sulfato de amonio.

- 30 A modo de ejemplo, la formulación de polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se puede estabilizar en sacarosa, trehalosa, poli(ácido láctico) (PLA) y microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) mediante la elección adecuada del excipiente o estabilizador (Sanchez *et al.*, 1999). La sacarosa o trehalosa se puede utilizar de forma ventajosa como un aditivo porque es un sacárido no reductor y, por lo tanto, no provoca reacciones amino-carbonilo con sustancias que contienen grupos amino tales como proteínas. La sacarosa o trehalosa se puede combinar con otros estabilizadores tales como sacáridos.

- 35 Además, la formulación que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede incluir agentes terapéuticos tales como, p. ej., anestésicos, analgésicos, antiinflamatorios, esteroides, antibióticos, antiartríticos, anorexígenos, antihistamínicos y antineoplásicos. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen lidocaína y fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE). En otra realización, los agentes terapéuticos son antígenos y adyuvantes. En otra realización adicional, la formulación que comprenden antígeno y/o adyuvante puede aplicarse por separado pero junto con otros agentes terapéuticos, tales como, p. ej., anestésicos, analgésicos, antiinflamatorios, esteroides, antibióticos, antiartríticos, anorexígenos, antihistamínicos y antineoplásicos. En una realización preferida, los antibióticos son fidaxomicina, metronidazol o vancomicina.

- 40 La formulación que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se puede administrar a través de diversas vía de administración tales como, p. ej., intramuscular.

- 45 Se pueden agregar polímeros a la formulación y pueden actuar como excipiente, estabilizador y/o conservante de un ingrediente activo así como también reducir la concentración de ingrediente activo que satura una disolución utilizada para disolver la forma seca del ingrediente activo. Dicha reducción se produce porque el polímero reduce el volumen efectivo de la disolución al llenar el espacio «vacío». Por consiguiente, se pueden conservar las cantidades

de antígeno/adyuvante sin reducir la cantidad de disolución saturada. Una consideración termodinámica importantes es que se «impulsará» un ingrediente activo en la disolución saturada hacia regiones de concentración más baja. En disolución, los polímeros también pueden estabilizar y/o conservar la actividad de antígeno/adyuvante de ingredientes solubilizados de la formulación. Dichos polímeros incluyen polímeros y copolímeros de etileno o propilenglicol, pirrolidona vinílica y 0-ciclodextrina.

Se proporciona una dosis simple o unitaria de la formulación que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 adecuada para administración. La cantidad de adyuvante y/o polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 en la dosis unitaria puede estar en cualquier punto de un intervalo amplio de alrededor de 0,001 µg a alrededor de 10 mg. Este intervalo puede ser de alrededor de 0,1 µg a alrededor 1 mg; un intervalo menor es de alrededor de 5 µg a alrededor de 500 µg. Otros intervalos adecuados están entre alrededor de 20 µg y alrededor de 200 µg, tales como, p. ej., alrededor de 20 µg, alrededor de 75 µg o alrededor de 200 µg. Una dosis preferida de un polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 es de alrededor de 20 µg o 200 µg o menos. La relación entre el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y el adyuvante puede ser de alrededor de 1:1 o alrededor de 1:1,25, pero también se pueden utilizar relaciones más elevadas (p. ej., alrededor de 1:10 o menor), o se pueden utilizar también relaciones más bajas entre el polipéptido aislado C-TAB y el adyuvante (p. ej., alrededor de 10:1 o mayor).

El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se puede utilizar como antígeno y se puede presentar a células inmunitarias e inducir una respuesta inmunitaria específica para el antígeno. Esto se puede producir antes, durante o después de la infección por un patógeno, tal como, *C. difficile*. Solo el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede ser necesario, sin ningún adyuvante adicional, si la inmunogenicidad de la formulación es suficiente para que no sea necesaria una actividad adyuvante. La formulación puede incluir un antígeno adicional de forma tal que la aplicación de la formulación induzca una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos (es decir, polivalente). En la respuesta inmunitaria pueden participar linfocitos específicos para el antígeno y, en caso de que participen linfocitos B, anticuerpos específicos para el antígeno pueden formar parte de la respuesta inmunitaria. Las formulaciones descritas anteriormente pueden incluir desecantes, excipientes, humectantes, estabilizadores y conservantes conocidos en la técnica.

La formulación que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente memoria se puede utilizar para tratar a un sujeto (p. ej., un humano o animal que necesita tratamiento tal como prevención de una enfermedad, protección contra efectos de la infección, reducción o alivio de los síntomas de una enfermedad, tal como EACD o combinaciones de estos). Por ejemplo, la formulación que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 descrito en la presente memoria se puede utilizar para tratar a un sujeto en riesgo de padecer una EACD, tal como, p. ej., un sujeto con el siguiente perfil: i) un sujeto con un sistema inmunitario más débil, tal como, p. ej., un sujeto anciano (p. ej., un sujeto con más de 65 años de edad) o un sujeto con menos de 2 años de edad; ii) un sujeto inmunodeprimido, tal como, p. ej., un sujeto con SIDA; iii) un sujeto que toma o planea tomar fármacos inmunosupresores; iv) un sujeto con una hospitalización planeada o un sujeto que está en un hospital; v) un sujeto que está o se espera que vaya a una unidad de cuidados intensivos (UCI); vi) un sujeto que se está sometiendo o planea someterse a cirugía gastrointestinal; vii) un sujeto que está o planea ir a un centro de asistencia para una estancia prolongada, tal como, una residencia de ancianos; viii) un sujeto con comorbilidades que requiere un uso frecuente y/o prolongado de antibióticos; ix) un sujeto que es un sujeto con dos o más de los perfiles mencionados anteriormente, tal como, p. ej., un sujeto anciano que planea someterse a una cirugía gastrointestinal; x) un sujeto con enfermedad inflamatoria intestinal; y/o xi) un sujeto con EACD recurrente, tal como, p. ej., un sujeto que ha sufrido uno o más episodios de EACD.

El tratamiento puede vacunar al sujeto contra la infección por el patógeno o contra sus efectos patógenos, tales como aquellos causados por la secreción de toxina. La formulación se puede utilizar de forma terapéutica para tratar una enfermedad existente, de forma protectora para prevenir una enfermedad, para reducir la gravedad y/o duración de una enfermedad, para mejorar los síntomas de la enfermedad, o combinaciones de estos.

Las formulaciones que comprenden los polipéptidos aislados C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se pueden administrar por diversas vías de administración que incluyen, pero no se limitan a, vía oral, subcutánea, intradérmica, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intracardíaca, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular y/o sublingual.

La formulación puede comprender también uno o más adyuvantes o combinaciones de adyuvantes. Normalmente, el adyuvante y la formulación se mezclan antes de la presentación del antígeno pero, alternativamente, pueden presentarse por separado en un intervalo de tiempo corto.

Los adyuvantes incluyen, por ejemplo, una emulsión oleosa (p. ej., adyuvante de Freund completo o incompleto), adyuvante Montanide incompleto de Seppic tal como ISA, adyuvantes de emulsión de aceite en agua tales como el sistema adyuvante Ribic, formulación adyuvante syntax que contiene dipéptido de muramilo, adyuvante de hidróxido o sal de aluminio (ALUM), polímero policatiónico, especialmente péptido policatiónico, especialmente poliarginina o un péptido que contiene al menos dos motivos LysLeuLys, especialmente KLKLLLLLKLK, oligodesoxinucleótido (ODN) inmunostimulador que contiene dinucleótidos de citosina-guanina no metilados (CpG) en un contexto de bases definido (p. ej., tal como se describe en WO 96/02555) o ODN basados en inosina y citidina (p. ej., tales como se describen en WO 01/93903), o ácido desoxinucleico que contiene residuos desoxi-inosina y/o desoxiuridina (tales como se describen en WO 01/93905 y WO 02/095027), especialmente Oligo(dIdC)₁₃ (tal como se describe en WO

01/93903 y WO 01/93905), compuesto neuroactivo, especialmente hormona de crecimiento humana (descrita en WO 01/24822), o combinaciones de estos, una quimiocina (p. ej., defensinas 1 o 2, RANTES, MIP1- α , MIP-2, interleucina-8, o una citocina (p. ej., interleucina-1 β , -2, -6, -10 o -12; interferón- γ ; factor de necrosis tumoral- α ; o factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos) (descrito en Nohria and Rubin, 1994), una variante dipeptídica de muramilo (p. ej., murabutida, treonil-MDP o tripéptido de muramilo), variantes sintéticas de MDP, una proteína de choque térmico o una variante, una variante del LelF principal de Leishmaniasis (Skeiky *et al.*, 1995), variantes no tóxicas de exotoxinas ADP-ribosilantes bacterianas (bARE, por sus siglas en inglés) incluidas variantes en el sitio de escisión por tripsina (Dickenson and Clements, 1995) y/o bARE que afectan la ADP-ribosilación (Douce *et al.*, 1997) o químicamente destoxificadas (anatoxinas), QS21, Quill A, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-[1,2-dipalmitoil-s-glicero-3-(hidroxifosforiloxi)]etilamida (MTP-PE) y composiciones que contienen un aceite metabolizable y un agente emulsionante, donde el aceite y el agente emulsionante están presentes en forma de una emulsión de aceite en agua que tiene gotas de aceite y todas tienen sustancialmente menos de un micrón de diámetro (véase, por ejemplo, EP 0399843). Además, véase Richards *et al.* (1995) donde se indican otros adyuvantes útiles en la inmunización.

Se puede elegir un adyuvante para inducir preferentemente anticuerpos o efectores celulares, isotipos de anticuerpo específicos (p. ej., IgM, IgD, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4), o subconjuntos de linfocitos T específicos (p. ej., CTL, Th1, Th2 y/o T_{DTH}) (véase, por ejemplo, Munoz *et al.*, 1990; Glenn *et al.*, 1995).

Se sabe que los dinucleótidos CpG o motivos no metilados activan los linfocitos B y macrófagos (Stacey *et al.*, 1996). Otras formas de ADN se pueden utilizar como adyuvantes. Los ADN bacterianos están entre una clase de estructuras que tienen patrones que permiten que el sistema inmunitario reconozca sus orígenes patógenos para estimular la respuesta inmunitaria innata que conduce a respuestas inmunitarias adaptativas (Medzhitov and Janeway, 1997, Curr. Opin. Immunol. 9(1): 4-9). Estas estructuras se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) e incluyen lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, motivos CpG no metilados, ARN bicatenario y maninas. Los PAMP inducen señales endógenas que pueden mediar la respuesta inflamatoria, actuar como coestimuladores de la función de los linfocitos T y controlar la función efectora. La capacidad de los PAMP para inducir estas respuestas tiene un papel en su potencial como adyuvantes y sus objetivos son CPA (células presentadoras de antígenos) tales como macrófagos y células dendríticas. Los PAMP también podrían utilizarse conjuntamente con otros adyuvantes para inducir diferentes moléculas coestimuladoras y controlar diferentes funciones efectoras para guiar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, de una respuesta Th2 a una Th1.

En la presente memoria se describe el uso del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 como agente de vacunación. Las vacunas o composiciones inmunógenas descritas en la presente puede emplear una cantidad eficaz de antígeno. Se incluirá una cantidad de antígeno que provocará que el sujeto produzca una respuesta inmunitaria específica y suficiente a efectos de impartir protección al sujeto contra la exposición posterior a *C. difficile*. El antígeno puede ser el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. En una realización, el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se administra solo o en combinación con un adyuvante.

En la presente memoria se describe el uso del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 como vacuna de subunidades. Una vacuna de subunidades hace referencia al uso de un fragmento de un patógeno como agente inoculante. Los expertos en la técnica sabrán que las vacunas de subunidades ofrecen un medio para generar anticuerpos para una parte o región específica de un patógeno.

El régimen de dosificación de la administración y eficacia de la vacuna se pueden determinar mediante métodos conocidos en la técnica. La cantidad de vacuna y el régimen de inmunización puede depender del antígeno específico y el adyuvante empleado, el modo y la frecuencia de administración y el efecto deseado (p. ej., protección y/o tratamiento). En general, la vacuna descrita en la presente memoria se puede administrar en cantidades que varían entre 1 μ g y 100 mg, tales como, p. ej. entre 60 μ g y 600 μ g. Una dosis simple de la vacuna que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede estar en el intervalo de alrededor de 1 μ g a alrededor 1 mg, preferiblemente de alrededor de 5 μ g a alrededor de 500 μ g, más preferiblemente de alrededor de 20 μ g a alrededor de 200 μ g. La relación entre el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y el adyuvante, tal como alumbre, puede ser de alrededor de 1:1, tal como, p. ej. 1:1,25, pero también se pueden utilizar relaciones más elevadas (p. ej., alrededor de 1:10 o menor), o se pueden utilizar también relaciones más bajas (p. ej., alrededor de 10:1 o mayor). En una realización, en la vacuna que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, se utilizará el adyuvante hidróxido de aluminio en un intervalo de alrededor de 50 μ g/mL a alrededor de 200 μ g/mL, preferiblemente en la cantidad de alrededor de 125 μ g/mL de la formulación final.

La vacuna que comprende el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se puede administrar por vía oral, intravenosa, subcutánea, intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular y/o sublingual.

El régimen de inmunización se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica. La administración de la vacuna se puede repetir si un experto en la técnica determina que es necesario hacerlo. Por ejemplo, tras una dosis inicial se pueden administrar 1, 2, 3 o más dosis de refuerzo en intervalos semanales, bisemanales o mensuales. En una realización de la presente, invención, después de la dosis inicial se administran uno o dos refuerzos en intervalos de alrededor de 7 a alrededor de 14 días, tal como, p. ej., a los 7 días y 21 días después de la dosis inicial.

En una realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna se administra dos o tres veces en intervalos de 14 días +/- 1, 2 o 3 días (bisemanal) a un sujeto. En una realización de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna se administra una vez.

5 Otro aspecto adicional se dirige a la población que se puede tratar según la presente invención. En una realización, la población incluye individuos sanos que están en riesgo de exposición a *C. difficile*, especialmente, los individuos con una hospitalización inminente o que residen en un centro de asistencia sanitaria, así como también el personal de hospitales, residencias de ancianos y otros centros de asistencia sanitaria. En otra realización, la población incluye pacientes infectados anteriormente que sufrieron una recaída tras suspender el tratamiento con antibióticos o pacientes para quienes el tratamiento con antibióticos no es eficaz.

10 En una realización adicional de la invención, la población incluye individuos que tienen al menos 18 años o más. En una realización preferida, el sujeto humano tiene entre 18 y 65 años. En otra realización preferida, el sujeto humano es individuos ancianos con más de 65 años. El último grupo etario representa la población más vulnerable a padecer infecciones por *C. difficile*. En algunas realizaciones adicionales, el sujeto humano tiene menos de 18 años.

Métodos para utilizar el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1.

15 En la presente memoria se describen métodos para utilizar el polipéptido aislado. Por ejemplo, el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 puede utilizarse para prevenir o tratar enfermedades asociadas con *C. difficile*. A modo de ejemplo, la introducción de los polipéptidos aislados de la presente invención en el sistema inmunitario de un sujeto puede inducir una respuesta inmunitaria que incluye que el sujeto produzca anticuerpos dirigidos contra el polipéptido aislado. Dichos anticuerpos son útiles para reconocer a *C. difficile*.

20 En la presente memoria se describen métodos de administración de los polipéptidos aislados a un sujeto, que comprenden administrar el polipéptido aislado a un sujeto. El polipéptido aislado se puede administrar como un líquido o un sólido. El polipéptido aislado puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En la presente memoria se describen métodos para identificar y aislar dominios variables de un anticuerpo que reconocen y se unen a la toxina A y/o la toxina B, que comprenden el uso del polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 para producir una respuesta inmunitaria, purificar y después caracterizar los anticuerpos producidos en respuesta al polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Los epítomos identificados se pueden utilizar para clonar adicionalmente anticuerpos o sus fragmentos.

30 Un aspecto de la presente descripción se dirige en parte al tratamiento, la prevención y la detección de *C. difficile*. En algunas realizaciones, un sujeto, tal como un animal, recibe tratamiento y/o prevención y/o detección de *C. difficile*. En otras realizaciones, el animal es un humano. Por ejemplo, los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para producir anticuerpos contra *C. difficile* in vivo. Como ejemplo adicional, los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar si un sujeto produce anticuerpos contra *C. difficile*. En algunas realizaciones, el polipéptido se utiliza para aislar anticuerpos. A modo de ejemplo, los polipéptidos pueden estar unidos a una matriz de afinidad.

35 A modo de ejemplo adicional, el ácido nucleico descrito en la presente se puede utilizarse para transformar y/o transfectar para producir de forma recombinante los polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención. Los ácidos nucleicos descritos en la presente también se pueden utilizar, por ejemplo, para determinar si un sujeto está infectado con *C. difficile*. A modo de ejemplo, esto se puede lograr utilizando métodos de hibridación radioetiquetada.

40 Como ejemplo adicional, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para reconocer una infección por *C. difficile*. A modo de ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer la toxina A y/o la toxina B natural como un antígeno. Los anticuerpos descritos en la presente también se pueden utilizar para combatir una infección por *C. difficile*. A modo de ejemplo, los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo o anticuerpos monoclonales pueden emplear la propia respuesta inmunitaria del sujeto contra una infección por *C. difficile*. A modo de ejemplo adicional, los anticuerpos descritos en la presente pueden acoplarse a un citocina o una toxina o una enzima o un marcador para auxiliar en el tratamiento y detección de una infección.

45 Aspectos adicionales de la presente descripción se relacionan con ensayos de diagnóstico. La presente descripción es útil con muchos ensayos conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica reconocerán la amplia gama de usos basados en la investigación para los polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos descritos en la presente memoria. Los polipéptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos descritos en la presente se pueden, por ejemplo, etiquetar, tal como con moléculas radioactivas, quimioluminiscentes, fluorescentes y/o de tinte. Los anticuerpos, ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en la presente son útiles para ensayos de uso, por ejemplo, ensayos de ADN (tales como transferencia southern), ensayos de ARN (tales como transferencia northern), ensayos proteicos (tales como transferencia western), ensayos cromatográficos (tales como gaseosa, líquida, HPLC, de exclusión por tamaño), inmunoanálisis (tales como ELISA) y ensayos estructurales (tales como cristalografía y espectroscopía RMN). Los anticuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos descritos en la presente se pueden utilizar además como sondas. Los ensayos que amplifican las señales desde una sonda también son conocidos por los expertos en la técnica.

Kits

En la presente memoria se describen kits que comprenden, a modo de ejemplo y no como limitación, ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1, el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y/o anticuerpos contra el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1. Los kits pueden incluir uno o más contenedores e instrucciones de uso según cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. El polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 y/o anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar en una variedad de ensayos que incluyen inmunoensayos para detectar *C. difficile*. En una realización, el polipéptido aislado C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 sirve para funcionar como un antígeno a los efectos de detectar anticuerpos en muestras biológicas. Los contenedores pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes de múltiples dosis) o dosis de subunidades. Los kits de la presente invención están en un envase adecuado. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal o un dispositivo de infusión. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril. El contenedor también puede tener un puerto de acceso estéril. Los kits opcionalmente pueden proporcionar componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa.

Los kits se pueden utilizar para detectar la presencia de *C. difficile* o detectar una enfermedad asociada a *C. difficile* tal como EACD. Los kits se pueden utilizar para prevenir o tratar enfermedades asociadas a *C. difficile*. Los kits descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para aliviar los síntomas de una enfermedad asociada a *C. difficile*.

Se cree que sin una descripción adicional un experto en la técnica puede, utilizando las descripciones precedentes y los siguientes ejemplos ilustrativos, producir y utilizar la invención reivindicada. Los siguientes ejemplos prácticos señalan, por lo tanto, las realizaciones específicamente preferidas de la presente invención y no se deben interpretar como una limitación en ningún sentido del resto de la descripción.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de los polipéptidos aislados C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1.

El presente ejemplo describe la preparación de polipéptidos aislados que comprenden porciones de las toxinas A (CTA) y B (CTB) de *C. difficile* para expresión en células de *E. coli*. El método descrito a continuación se puede utilizar para producir diversos polipéptidos aislados que comprenden CTA y CTB. Como ejemplo, se describe un polipéptido aislado que comprende una porción del dominio del extremo C de CTA y una porción del dominio del extremo C de CTB.

Ejemplo 1.1: Clonación de las construcciones génicas C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1.

La porción del gen de CTA (N.º de acceso YP-001087137) que codifica para los aminoácidos 2026 a 2710 del dominio del extremo C se amplificó mediante PCR a partir del ADN genómico de la cepa 630 de *C. difficile* (ATCC BAA-1382) utilizando los siguientes cebadores:

directo: 5'- caccACTAGTatgaacttagtaactggatggc -3'(SEQ ID N.º: 9) e

inverso: 5'- CTGAGTtagccatataatcccagggc -3' (SEQ ID N.º: 10).

La amplificación con el cebador directo creó un sitio *SpeI* y la amplificación con el cebador inverso creó un sitio *XhoI*.

La porción del gen de CTB (N.º de acceso: YP-00108735) que codifica para los aminoácidos 1850 a 2366 del dominio del extremo C se amplificó mediante PCR utilizando los siguientes cebadores:

directo: 5'- caccATGCATatgagtttagttaatag 3' (SEQ ID N.º: 11) e

inverso: 5'- ggcCTGAGctattcactaatcactaattgagc -3' (SEQ ID N.º: 12).

La amplificación con el cebador directo creó un sitio *NsiI* y la amplificación con el cebador inverso creó un sitio *XhoI*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando PCR Super-Mix (Invitrogen). Las condiciones de ciclo fueron 95 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 50 segundos, 68 °C durante 8 minutos (30 ciclos) y 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se purificaron con el kit de extracción génica Quick (Invitrogen) y se ligaron con el vector PCR 2.1 TOPO (Invitrogen). Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar las células Mech-1 de *E. coli* mediante choque térmico. Los transformantes se colocaron sobre placas de ImMedia Amp Blue (Invitrogen). Se recogieron colonias blancas y se cultivaron en tubos de 15 ml con 4 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 37 °C y los plásmidos se extrajeron con el kit Quick plasmid miniprep (Invitrogen).

El fragmento del gen de CTA en el vector PCR 2.1 -TOPO/TA se digirió con *SpeI* y *XhoI* y el fragmento se clonó en un vector intermediario, también digerido con *SpeI* y *XhoI*, utilizando T4 ADN Ligasa. A continuación se insertó un enlazador que contenía tres sitios de restricción (BgII-Nsil-SacI) en el extremo 3' del fragmento del gen de CTA mediante PCR utilizando el siguiente conjunto de cebadores sintéticos:

directo: 5'- AGATCTATGCATGAGCTCctcgagcccaaaacgaaaggctcagc -3' (SEQ ID N.º: 13)

inverso: 5'- cggctccggggccatataatcccaggggctttactcc -3' (SEQ ID N.º: 14).

5 El fragmento del gen de CTB en PCR 2.1 -TOPO/TB se digirió con *Nsil* y *XhoI*, y el fragmento de gen de CTB digerido se ligó con el vector intermediario que contenía el gen de CTA y el enlazador, que también se digirió con *Nsil* y *XhoI*. El gen de CTB se insertó en dirección a 3' con respecto al enlazador proporcionando la secuencia de construcción 5'-CTA-enlazador-CTB-3'. Esta construcción de fusión se denomina vector intermediario C-TAB.V1.

El gen de C-TAB.G5 se amplificó mediante PCR del vector intermediario C-TAB.V1 utilizando los cebadores:

directo: 5'- caccCCATTGatggttaacaggagtatttaaagga (SEQ ID N.º: 15)

inverso: 5' - CTCGAGctattcactaatcactaattgagctg (SEQ ID N.º: 16).

10 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando PCR Super mix (Invitrogen). Las condiciones de ciclo fueron 95 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 50 segundos, 68 °C durante 4 minutos (30 ciclos) y 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se purificaron con el kit de extracción génica Quick (Invitrogen) y se ligaron con el vector PCR2.1 TOPO (Invitrogen). Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar las células Mech-1 de *E. coli* mediante choque térmico. Los transformantes se colocaron sobre placas de ImMedia Amp Blue (Invitrogen). Se recogieron colonias blancas y se cultivaron en tubos de 15 ml con 4 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 37 °C y los plásmidos se extrajeron con el kit Quick plasmid miniprep (Invitrogen). El gen de fusión de C-TAB.G5 en el vector PCR 2.1 -TOPOTA se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*. Estos fragmentos de C-TAB de ligaron con el vector de expresión pET28 digerido con las mismas enzimas de restricción. Esta construcción resultante codifica para el dominio del extremo C de la toxina A de los aminoácidos 2272 a 2710 fusionados con el dominio del extremo C de la toxina B de los aminoácidos 1851 a 2366. La construcción pET28/C-TAB.G5 se transformó BL21 (DE3) de *E. coli* para expresión. Se seleccionaron cinco colonias que contenían el gen de fusión C-TAB.G5 para análisis.

15 La secuencia codificante de C-TAB.G5.1 se obtuvo mediante optimización codónica para una expresión mejorada en células hospedantes de *E. coli*. El uso de los codones se adaptó a la preferencia codónica de los genes de *E. coli*. Además, se ajustó el contenido de GC para prolongar la semivida del ARNm; se evitó una región con un contenido de GC muy elevado (>80 %) o muy bajo (<30 %). Por lo tanto, el gen optimizado posibilita tasas de expresión elevadas y estables en *E. coli*. El gen de C-TAB.G5.1 optimizado por codones se sintetizó *in situ* y se subclonó en el vector de expresión pET-28b(+).

20 Secuenciación de ADN: Las secuencias de ADN plasmídico se confirmaron utilizando química de secuenciación de terminador de ciclo en tinte con tintes de d-Rodamina. Los datos de la secuenciación se analizaron utilizando el programa informático Jellyfish.

30 Ejemplo 1.2: Expresión de las proteínas de fusión C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 recombinantes en *E. coli*.

La expresión de las construcciones génicas C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1 se puede lograr utilizando un procedimiento estándar para expresión en *E. coli*.

35 Barrido de colonias para determinar la expresión de la proteína de fusión C-TAB recombinante: A los efectos del barrido, se recogieron colonias y se cultivaron en tubos Falcon de 15 ml con 4 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina. Los tubos se cultivaron durante toda la noche a 37 °C con mezcla a 250 rpm. Tras la fase de crecimiento inicial, se transfirió 1 ml de cultivo de cada tubo a una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos y se indujo la expresión con 1 mM isopropil-β-D-1-tiogalacto-piranosido (IPTG) durante 3 h a 30 °C. Se recogieron los sedimentos celulares mediante centrifugación a 12.000 g durante 1 min en microcentrífuga. Se prepararon lisados de sedimento celular y la fracción soluble se sometió a ensayo mediante DT-PAGE y análisis de transferencia western para determinar la expresión de la proteína de fusión C-TAB. Los clones positivos se seleccionaron para evaluación adicional.

45 Fermentación por lotes para la expresión de C-TAB.G5: Se cultivaron cultivos de siempre en cinco matraces de agitación de 500 ml que contenían cada uno 150 ml de medio Super Broth complementado con 30 µg/ml de kanamicina. Los cultivos se cultivaron durante 12 h a 28 °C con agitación continua a 275 rpm hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 2 a 2,5. Los matraces de agitación se utilizaron para inocular un fermentador que contenía 10 L de Super Broth. El cultivo se cultivó alrededor de 4,5 h a 37 °C hasta DO₆₀₀ = 3,5 a 4. Para la inducción de la expresión del producto se agregó 0,1 mM de IPTG y el cultivo continuó durante 4 h más a 25 °C. A continuación las células se cosecharon mediante centrifugación y la pasta celular se almacenó congelada a -70 °C. Un tasa de expresión específica del producto típica mediante este proceso de fermentación fue de alrededor de 200 mg/ml.

50 Fermentación con alimentación en lotes para la preparación de C-TAB.G5.1: Se utilizó una alícuota de 500 µl de concentrado de glicerol de un banco de cultivo (almacenado a -75°C) para inocular 100 ml de medio de precultivo complementado con 30 µg/ml de kanamicina en un matraz de agitación de 1 L. El precultivo se incubó a 37 °C con agitación constante ~150 rpm durante alrededor de 7 h hasta que alcanzó una DO₆₀₀ = 1,0 a 2,0. Se utilizaron 25 mL

55

de precultivo para inocular 7 L de medio de fermentación por lotes en un fermentador de 15 L estándar en la industria equipado con un sistema de control del proceso capaz de llevar a cabo fermentaciones con alimentación por lotes. La fase de cultivo en lote de 7 L se llevó a cabo durante 12 h a 37 °C ($DO_{600} = 12$ a 15) hasta que se agotó la glucosa. La fase libre de glucosa (producción de biomasa) a continuación se inició mediante un modo de alimentación exponencial a una constante de tasa de cultivo específica $\mu = 0,25/h$ a 37 °C durante 6 h ($DO_{600} = 40$ a 50). Una hora antes de cambiar a una fase de alimentación constante e inducción con una concentración final de 1 mM IPTG (producción de producto), la temperatura se redujo hasta alcanzar 30 °C para reducir el riesgo de formación de cuerpos de inclusión. La fase de expresión de producto continuó durante otras 5 h con alimentación constante a 30 °C ($DO_{600} = \sim 100$) que resultaron en un tiempo de proceso de fermentación total de 23 h y un volumen de cultivo final de $\sim 8,2$ L. Se cosechó una biomasa celular húmeda de alrededor de 1,2 kg mediante centrifugación y se almacenó a ≤ -70 °C. Un tasa de expresión específica del producto típica alcanzada mediante la fermentación con alimentación por lotes fue de hasta 1,3 g/L.

Ejemplo 1.3: Purificación de las proteínas de fusión C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 recombinantes.

Purificación de muestra analítica de C-TAB.G5: La pasta celular congelada se descongeló y se volvió a suspender en 10 mM de tampón ácido cítrico/NaOH a pH 5,6, y la suspensión celular se pasó dos veces a través de un homogeneizador (homogeneizador GEA Niro Soavi) a 550 bar. La suspensión se centrifugó dos veces: una vez a 13500 rpm durante 30 minutos y la segunda vez a 18000 rpm en una ultracentrífuga durante una hora. Los sobrenadantes se concentraron y se ajustó el pH hasta alcanzar 5,6 con 50 mM de tampón de ácido cítrico pH 3. Los lisados celulares clarificados se pasaron por una columna de flujo rápido SP con 10 mM de tampón ácido cítrico/NaOH a pH 5,6. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio con aumento de 0 a 500 mM en 20 mM de NaPi. Las fracciones que contenían C-TAB.G5 se concentraron. La conductividad se ajustó hasta 5 mS/cm con H₂O destilado. Se agregó Tris hasta una concentración final de 25 mM. Las fracciones concentradas se pasaron por una columna de flujo rápido DEAE. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio con aumento de 50 a 500 mM en 25 mM de Tris. Nuevamente, las fracciones que contenían C-TAB.G5 se concentraron y se agregó 1,5 M Na-Citrato, pH 7,5 hasta una concentración final de 0,4 M. El concentrado de C-TAB.V1 se cargó en una columna de Sepharose HP fenol equilibrada con 25 mM de Tris, 0,4 M Na-Citrate, pH 7,5. La proteína de fusión C-TAB.G5 se eluyó con una reducción de concentración de sal en un gradiente lineal utilizando 5 mM de TRIS, pH 7,5. Todas las columnas se monitorizaron mediante un sistema de cromatografía AKTA Prime. Se intercambió el tampón de proteína de fusión C-TAB a PBS utilizando una membrana de 50 K.

Purificación de la preparación a granel de C-TAB.G5.1: La biomasa se almacenó a -80 °C hasta el procesamiento. Se diluyen 450 g de pasta celular congelada (equivalente a 2,90 L del fermentador) con 4 volúmenes de tampón de lisis (20 mM de Hepes, pH 7,5, $\sim 0,6$ mS/cm) (p. ej., 450 g de pasta + 1800 mL de tampón) y se descongelan de esta forma durante $\sim 1 \pm 0,5$ h con agitación mecánica. Opcionalmente, las aglomeraciones restantes se pueden volver a suspender utilizando Ultraturrax (p. ej., 5 min a 8000 rpm). La lisis celular se lleva a cabo en un homogeneizador de alta presión Niro Soavi Panda (640 ± 25 bar, 3 ciclos). El lisado se enfría hasta alcanzar < 10 °C utilizando un intercambiador térmico y se mantiene a esta temperatura durante la centrifugación. El lisado celular bruto se somete a una etapa de centrifugación por lotes (Beckmann Avanti JLA 60.25) operada a 14000 rpm (30000 g) a 4 °C durante 30 min. Los sobrenadantes se recogen y se concentran. La parte semilíquida del sedimento se descarta también, para reducir el riesgo de obstrucción en la etapa de filtración. Los sobrenadantes concentrados a continuación se filtran a través de una cápsula de filtro de profundidad Supercap PDH4 100/12,7 cm (5 pulgadas) (Pall) (área de filtración efectiva de 250 cm²). El lisado restante en el alojamiento del filtro se extrajo por enjuague con tampón de lisis. Después de la clarificación, se agrega una alícuota de 1M de disolución concentrada de Tris, pH 7,5, al lisado hasta una concentración final de 25 mM. La composición de tampón del lisado final es 20 mM de Hepes, 25 mM de Tris, pH 7,5, conductividad ~ 6 mS/cm). El lisado puede estar todavía ligeramente turbio después de la filtración, pero esto no afecta la etapa de captura posterior. La etapa de captura se lleva a cabo a temperatura ambiente con DEAE Sepharose FF (GE Healthcare) en una columna XK50/30 (GE Healthcare) con las siguientes dimensiones: diámetro de 50 mm, altura de lecho fijo 20 cm, volumen de lecho fijo ~ 400 mL. La densidad de carga es de alrededor de 0,8 a 1,2 g de biomasa/mL de gel. El proceso se lleva a cabo mediante un sistema Akta Explorer (GE Healthcare) y se monitoriza a 280 nm. El equilibrio se lleva a cabo a 100 cm/h con alrededor de 5 VC (volúmenes de columna) de 25 mM de Tris, 20 mM de Hepes, 25 mM de NaCl, pH 7,5, conductividad ~ 5 mS/cm hasta que el pH, la conductividad y la absorbancia a 280 nm estén estables. El lisado se carga sobre la columna a 75 cm/h y el flujo continuo se descarta. Después de cargar todo el lisado filtrado, el flujo se reanuda con alrededor de 5 VC de tampón de equilibrio hasta que la absorbancia a 280nm se estabiliza. Las impurezas se extraen de la columna durante la etapa de lavado 2 con 5 VC de 25 mM de TRIS, 175 mM de NaCl, pH 7,5, conductividad 19 mS/cm. La proteína C-TAB se eluye de la columna mediante la etapa de elución con 3 VC de 25 mM de TRIS, 375 mM de NaCl, pH 7,5, conductividad 36 mS/cm. La recolección de las fracciones que contienen C-TAB comienza cuando la absorbancia a 280 nm comienza a aumentar (generalmente después de 1 VC) y dura alrededor de 0,5 a 1,0 VC. Las fracciones concentradas que contienen C-TAB se pueden almacenar a 2 a 8 °C durante toda la noche. La etapa de purificación intermedia se lleva a cabo con SP-Sepharose FF (GE Healthcare) en una columna XK50/30 (GE Healthcare) a temperatura ambiente con las siguientes dimensiones: diámetro de 50 mm, altura de lecho fijo 20 cm, volumen de lecho fijo ~ 400 mL. La densidad de carga máxima es de alrededor de 4 a 5 mg de C-TAB/mL de gel. El proceso se lleva a cabo mediante un sistema Akta Explorer (GE Healthcare) y se monitoriza a 280 nm. Las etapas de equilibrio,

lavado y elución con gradiente lineal se llevan a cabo a un caudal máximo de 200 cm/h (65 mL/min) a menos que la contrapresión excesiva (>4 bar) lo impida. El equilibrio se lleva a cabo con alrededor de 5 a 10 VC de tampón G a 200 cm/h hasta que el pH, la conductividad y la absorbancia a 280 nm estén estables. Antes de la carga, el concentrado de DEAE debe ajustarse para permitir la unión de C-TAB a la resina SP-FF. El concentrado de DEAE se diluye 25 veces con tampón de equilibrio SP-FF (10 mM de ácido cítrico, 2 mM de EDTA, pH 5,5±0,1, conductividad ~2 mS/cm) hasta una conductividad final de no más de 3,5 mS/cm, pH 5,5 ± 0,1. Si es necesario se agrega agua MilliQ adicional hasta alcanzar la conductividad deseada. Obsérvese que la baja conductividad es esencial para permitir la unión de C-TAB a SP-FF. La muestra se carga sobre la columna a 150 cm/h y el flujo continuo se descarta. Después de cargar la muestra, el flujo se reanuda con alrededor de 5 VC de tampón de equilibrio a 200 cm/h hasta que la absorbancia a 280nm se estabiliza. La elución se lleva a cabo con un gradiente lineal a 100 cm/h de 0 % de tampón de equilibrio hasta 30 % de 20 mM de fosfato de sodio, 500 mM de NaCl, pH 7,0 en 10 VC. Se recogen las fracciones y la concentración se lleva a cabo mediante absorbancia a UV 280 nm. La concentración comienza a 15 % del pico máximo y termina a 15 % del pico máximo. El concentrado inmediatamente se ajusta hasta 400 mM de citrato (pH final 7, alrededor de 49 mS/cm) utilizando una disolución concentrada de citrato 1,5 M, pH 8,0. El concentrado de SPFF ajustado debería tener pH 7 y alrededor de 49 mS/cm y se almacena a 2 a 8 °C durante toda la noche.

La etapa de cromatografía de pulido se lleva a cabo con Phenyl-Sepharose HP (GE Healthcare) en una columna XK50/30 (GE Healthcare) a temperatura ambiente con las siguientes dimensiones: diámetro 50mm, altura del lecho fijo 15 cm, volumen de lecho fijo ~300 mL. La densidad de carga es de alrededor de 4 a 5 mg de C-TAB/mL de gel. El proceso se lleva a cabo mediante un sistema Akta Explorer (GE Healthcare) y se monitoriza a 280 nm. Las etapas de equilibrio, lavado y elución se llevan a cabo a un caudal máximo de 100 cm/h (33 mL/min) a menos que la contrapresión excesiva (>4 bar) lo impida. En tal caso, se debe reducir el caudal. El equilibrio se lleva a cabo con alrededor de 5 a 10 VC de 25 mM de Tris, 400 mM de citrato de sodio, pH 7,5, 46 mS/cm a 100 cm/h hasta que el pH, la conductividad y la absorbancia a 280 nm estén estables. La muestra se carga sobre la columna a 100 cm/h y el flujo continuo se descarta. Después de cargar la muestra, el flujo se reanuda con alrededor de 5 VC de tampón de equilibrio a 100 cm/h hasta que la absorbancia a 280nm se estabiliza. La elución se lleva a cabo con un gradiente lineal a 100 cm/h de 100 % de tampón de equilibrio / 0 % de 5 mM Tris, pH 7,5, 0,5 mS/cm hasta 100 % de 5 mM Tris, pH 7,5, 0,5 mS/cm en 20 VC. Se recogen las fracciones y la concentración se lleva a cabo mediante absorbancia a UV 280 nm. La concentración comienza a alrededor de 10 a 15 % del pico máximo y termina a alrededor de 20 % del pico máximo. El concentrado ajustado se almacena a 2 a 8 °C durante toda la noche. La preparación de disolución proteica de sustancia medicamentosa de C-TAB final se logra mediante filtración de flujo tangencial de corte 30 kDa (TFF, membrana Pellicon 2, Millipore) operada a temperatura ambiente. La disolución proteica se diafiltra contra el tampón de formulación (20 mM de Histidina, 75 mM de NaCl, 5 % de Sacarosa, 0,025 % de Tween®80, pH 6,5) hasta que el pH del permeado es igual a 6,5±0,2).

La concentración proteica final se ajusta a 2 mg/mL según la medición de UV a 280 nm utilizando 1566 como el coeficiente de extinción específico a 280 nm para C-TAB (conc. proteica 1 mg/mL, cubeta de 1 cm).

SDS-PAGE y análisis de transferencia Western: Los lisados celulares enteros y la proteína de fusión C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 purificada se volvieron a suspender en tampón de muestra Nu-Page que contenía beta-mercaptoetanol y se hirvieron durante 10 min. Las muestras (25 µl) se cargaron en gel Tris-Acetato al 3 a 8 %. Después de la electroforesis (150 V durante 1 h), las proteínas se visualizaron mediante tinción de los geles con tinte Simply Blue o se utilizaron para el análisis de transferencia Western.

La expresión específica de C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 se determinó mediante análisis de transferencia Western utilizando anticuerpos específicos para las toxinas. Las proteínas se transfirieron a 23 V durante 60 min sobre una membrana de PVDF utilizando 1x de tampón de transferencia en metanol al 10 %. Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 0,5 % de caseína en solución salina tampón fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Las membranas de transferencia se incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal contra la Toxina B (GenWay; clon B426M) o un anticuerpo policlonal de cobaya derivado internamente contra la Toxina A (List Biological Labs). Las membranas lavadas se incubaron con IgG anticobaya o IgG antirratón conjugada con peroxidasa de rábano. Las transferencias se lavaron y se agregaron sustratos AEC. Las transferencias se incubaron con mezcla suave durante 5 a 10 minutos. Las transferencias se enjuagaron con agua para detener el desarrollo de color.

Hemoaglutinación de RBC: Se ha demostrado que el dominio de unión celular de la toxina A es capaz de aglutinar eritrocitos (RBC, por sus siglas en inglés) de conejo, pero no el de la toxina B. El proceso de aglutinación es el resultado de la unión de la toxina A con una secuencia de glicano que se encuentra en los antígenos sanguíneos de RBC de conejo. Las muestras (C-TAB.G5 y toxina A natural) se diluyen hasta 100 µg/ml en PBS. En una placa de microtitulación con fondo en V, se preparan diluciones en serie dobles a lo largo de la placa por duplicado, comenzando a 100 µg/ml y dejando 50 µl de la dilución en cada pocillo. Se agregan cincuenta microlitros de una suspensión al 0,75 % de RBC de conejo/PBS a cada pocillo de la placa de microtitulación y la placa se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. La hemoaglutinación se indica por la incapacidad para formar un sedimento de RBC en el fondo de la placa. El título de hemoaglutinación de una muestra se representa mediante la concentración

de la proteína presente en el pocillo con la dilución de muestra más alta en la que no se ha observado sedimento de RBC.

Ejemplo 2: Titulación de dosis de la proteína de fusión C-TAB.G5 en presencia y ausencia de alumbre en ratones.

5 Este estudio se llevó a cabo para determinar la viabilidad de una titulación de dosis in vivo de C-TAB.G5 con y sin adyuvante de alumbre como un ensayo de potencia de C-TAB. El alumbre utilizado fue Hydragel, (hidróxido de alumbre, Brenntag). Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (Charles River Labs.) con entre 8 y 9 semanas para la inmunización. Todos los animales recibieron una primera inmunización mediante inyección intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho el día 0. La segunda inmunización se llevó a cabo mediante inyección IM en el músculo del muslo izquierdo el día 14. Un total de 72 ratones se dividieron en 12 grupos vacunados de la siguiente forma:

- 10 Grupo 1: Solo PBS
- Grupo 2: 100 (154) ng de C-TAB.G5
- Grupo 3: 300 (462) ng de C-TAB.G5
- Grupo 4: 1.000 (1.540) ng de C-TAB.G5
- 15 Grupo 5: 3.000 (4.620) ng de C-TAB.G5
- Grupo 6: 10.000 (15.400) ng de C-TAB.G5
- Grupo 7: PBS con 50 µg de alumbre
- Grupo 8: 10.0 (15.4) ng de C-TAB.G5 con 50 µg de alumbre OH
- Grupo 9: 30.0 (46.2) ng de C-TAB.G5 con 50 µg de alumbre OH
- 20 Grupo 10: 100 (154) ng de C-TAB.G5 con 50 µg de alumbre OH
- Grupo 11: 300 (462) ng de C-TAB.G5 con 50 µg de alumbre OH
- Grupo 12: 1.000 (1.540) ng de C-TAB.G5 con 50 µg de alumbre OH

25 En este estudio se determinó la concentración proteica en primer lugar según el protocolo estándar Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad). En última instancia, la concentración proteica (se muestra entre paréntesis) se volvió a determinar mediante medición de UV a 280 nm según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.3. En todos los estudios de seguimiento la concentración proteica se midió mediante el método de UV.

Se recogieron muestras de sangre de todos los animales dos semanas después de la primera inmunización (día de estudio 14) y dos semanas después de la segunda inmunización (día de estudio 28). El suero se almacenó a -20 °C hasta el análisis.

30 ELISA de IgG sérica: Los anticuerpos séricos producidos para C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 (denominado C-TAB), toxina A y toxina B o sus anatoxinas se evaluaron en un ensayo de adsorción (ELISA, por sus siglas en inglés). En síntesis, se prepararon disoluciones concentradas de 1,0 µg/ml de toxina A, toxina B o el polipéptido aislado C-TAB.G5 en PBS y se agregaron 100 µl a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de la incubación durante toda la noche a 4 °C, las placas se lavaron y se bloquearon con tampón de bloqueo de caseína al 0,5 %. Las placas se volvieron a lavar y se agregaron diluciones en serie dobles de suero de prueba a las placas.

35 Después de una segunda incubación durante toda la noche a 4°C, las placas se lavaron y se incubaron con IgG antirratón conjugada con peroxidasa (H + L). Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se volvieron a lavar, se agregó sustrato de peroxidasa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) y se dejó que el color se desarrollara durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de SDS al 2 % en los pocillos. Se leyeron las placas con un lector de placas de ELISA a una absorbancia de 405 nm.

40 Los títulos de anticuerpos séricos se indican como la media geométrica de unidades de ELISA, que son las diluciones en suero que resultan en una lectura de DO a 405 nm de 1,0. Como testigo negativo se utilizó una muestra concentrada de suero previo a la inmunización obtenida de animales de los que se tomó sangre antes de la primera inmunización para evaluar una respuesta de anticuerpos.

45 Los animales que recibieron C-TAB.G5 demostraron un aumento en los títulos de anticuerpo dependiente de la dosis y el adyuvante alumbre permitió una mejora significativa en los títulos de anticuerpo a dosis más bajas de C-TAB.G5. La Figura 3 muestra los títulos para IgG anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B. La Figura 4 muestra una comparación gráfica de los títulos de anticuerpo en presencia o ausencia de alumbre.

Ejemplo 3: Inmunogenicidad y eficacia protectora de C-TAB.G5 en ratones.

Este estudio se llevó a cabo para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia protectora de C-TAB.G5 en ratones vacunados que recibieron una exposición letal de toxina A o toxina A de *C. difficile*. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (Charles River Labs.) con 6 a 7 semanas para este estudio. Todos los animales recibieron la primera vacunación mediante inyección intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho el día 0. La segunda vacunación se llevó a cabo mediante inyección IM en el músculo del muslo izquierdo el día 14. 116 ratones se dividieron en grupos vacunados de la siguiente forma:

- 5 • Grupo 1: Solo PBS
- Grupo 2: 3 µg de C-TAB.G5
- Grupo 3: 10 µg de C-TAB.G5
- 10 • Grupo 4: 30 µg de C-TAB.G5
- Grupo 5: 3 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 6: 10 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 7: 30 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 8: Solo PBS
- 15 • Grupo 9: 3 µg de C-TAB.G5
- Grupo 10: 10 µg de C-TAB.G5
- Grupo 11: 30 µg de C-TAB.G5
- Grupo 12: 3 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 13: 10 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH
- 20 • Grupo 14: 30 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH

Se recogieron muestras de sangre de todos los animales dos semanas después de la segunda inmunización (día de estudio 28). El suero se almacenó a -20 °C hasta el análisis. A continuación se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B mediante ELISA y se indicaron como unidades de ELISA (UE).

- 25 La Figura 5 muestra títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B en ratones evaluados dos semanas después de la segunda inmunización (día de estudio 28). Este estudio demostró que la proteína de fusión C-TAB.G5 es altamente inmunógena en ratones y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos fuerte contra la toxina A y la toxina B incluso sin agregar un adyuvante. La inmunogenicidad de C-TAB.G5 se aumentó de manera significativa (más de un logaritmo) mediante la coadministración con hidróxido de alumbre. Los animales que recibieron C-TAB.G5 con o sin alumbre demostraron un aumento de 2 veces en la respuesta de anticuerpos en un intervalo de logaritmo de dosis.
- 30

Además de evaluar los títulos de anticuerpos, los anticuerpos generados por la inmunización con C-TAB.G5 se evaluaron para determinar su capacidad para neutralizar la toxina A y B natural en un ensayo de neutralización de toxina in vitro (TNA, por sus siglas en inglés).

- 35 Ensayo de anticuerpo neutralizador de toxina (ANT). Para el análisis in vitro, se incubaron 125 µl de la toxina A (5 ng/ml) o toxina B (1 ng/ml) con 125 µl de diluciones en serie de anti-suero obtenido de ratones inmunizados. Después de una hora de incubación a 37 °C, la mezcla de toxina:suero se agregó a pocillos de microtitulación que contenían células Vero (células de riñón de mono) y las placas de microtitulación se incubaron durante 18 hr. La incubación de la toxina A o B con las células Vero resultó en un cambio en la morfología celular y una pérdida de la adherencia celular que se midió mediante tinción con rojo neutro de las células tratadas con toxina después de la extracción de las células no adherentes. El título de neutralización de toxina de un suero se indica como la dilución de suero que proporciona un 50 % de reducción en la actividad de la toxina.
- 40

- Los resultados del ensayo ANT se muestran en la Figura 6. Los datos indican que los anticuerpos generados después de la inmunización con C-TAB.G5 solo son capaces de neutralizar la actividad tóxica de la toxina A natural pero no de la toxina B. Cuando se coadministró C-TAB.G5 con alumbre, los títulos de ANT aumentaron con un aumento de alrededor de 6 veces en los ANT antitoxina A y solo títulos 2 veces más bajos para ANT antitoxina B. Estos datos indican que el polipéptido aislado C-TAB.G5 no solo conserva los epítopos antigénicos de reconocimiento de anticuerpo presentes en las toxinas naturales, sino que también comprende epítopos antigénicos esenciales necesarios para la generación de anticuerpos neutralizantes de toxina funcionales. Por consiguiente, C-TAB.G5 es eficaz para neutralizar los efectos tóxicos de la toxina A y la toxina B de *C. difficile*, por lo tanto, es útil en la vacunación.
- 45
- 50

Además de evaluar la respuesta de anticuerpos, se determinó la capacidad de la inmunización con C-TAB.G5 para proteger a los ratones contra una exposición letal de toxinas naturales. Tres semanas después de la segunda vacunación (día de estudio 35) los animales en los grupos vacunados y no vacunados (N=8) recibieron por vía intraperitoneal (IP) una dosis letal de 25 ng de toxina A o 50 ng de toxina B. La supervivencia de los animales se monitorizó en los 9 días posteriores y los resultados se muestran en la Figura 6. Este experimento demostró que la inmunización de ratones con C-TAB.G5 en ausencia del adyuvante alumbre fue capaz de conferir un 100 % de protección contra una exposición letal con toxina A natural y un 50 % de protección contra la exposición a la toxina B. La coadministración de C-TAB.G5 con alumbre potenció la inmunidad protectora contra la toxina B en hasta un 100 % de protección. Estos datos indican que la vacunación con C-TAB.G5 induce una respuesta inmunitaria suficiente para proteger a los ratones de los efectos tóxicos de las toxinas A y B en el modelo de exposición letal.

Ejemplo 4: Evaluación de la inmunogenicidad y eficacia protectora de C-TAB.G5 en ratones jóvenes y adultos.

Este estudio se llevó a cabo para comparar la respuesta inmunitaria desencadenada contra C-TAB.G5 en ratones jóvenes y adultos. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (Charles River Labs.) con 6 a 7 semanas y 18 meses, respectivamente, para este estudio. Todos los animales recibieron la primera vacunación mediante inyección intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho el día 0. La segunda vacunación se llevó a cabo mediante inyección IM en el músculo del muslo izquierdo el día 14. 192 ratones se dividieron en grupos vacunados de la siguiente forma:

- Grupo 1: PBS a ratones jóvenes
- Grupo 2: PBS a ratones adultos
- Grupo 3: 10 µg de C-TAB.G5 a ratones jóvenes
- Grupo 4: 30 µg de C-TAB.G5 a ratones jóvenes
- Grupo 5: 10 µg de C-TAB.G5 a ratones adultos
- Grupo 6: 30 µg de C-TAB.G5 a ratones adultos
- Grupo 7: 10 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones jóvenes
- Grupo 8: 30 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones jóvenes
- Grupo 9: 10 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones adultos
- Grupo 10: 30 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones adultos
- Grupo 11: PBS a ratones jóvenes
- Grupo 12: PBS a ratones adultos
- Grupo 13: 10 µg de C-TAB.G5 a ratones jóvenes
- Grupo 14: 30 µg de C-TAB.G5 a ratones jóvenes
- Grupo 15: 10 µg de C-TAB.G5 a ratones adultos
- Grupo 16: 30 µg de C-TAB.G5 a ratones ancianos
- Grupo 17: 10 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones jóvenes
- Grupo 18: 30 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones jóvenes
- Grupo 19: 10 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones adultos
- Grupo 20: 30 µg de C-TAB.G5 + 50 µg de alumbre OH a ratones adultos

Tres semanas después de la segunda vacunación (día de estudio 35) los animales en los grupos vacunados y no vacunados (N=6) recibieron una exposición letal por vía intraperitoneal (IP) de 25 ng de toxina A o 50 ng de toxina B. La supervivencia de los animales se monitorizó en los 9 días posteriores.

Se recogieron muestras de sangre de todos los animales dos semanas después de la primera inmunización (día de estudio 14) y dos semanas después de la segunda inmunización (día de estudio 28). El suero se almacenó a -20 °C hasta el análisis. A continuación se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B mediante ELISA y se indicaron como unidades de ELISA (UE). Los anticuerpos neutralizantes de la toxina A y la toxina B (ANT) se determinaron utilizando células Vero tratadas con una cantidad citotóxica de toxina A y toxina B recombinantes.

- Los animales jóvenes que recibieron la vacuna de C-TAB.G5 exhibieron niveles significativamente más altos de todos los anticuerpos evaluados, en comparación con los animales adultos. Se obtuvieron títulos de anticuerpos especialmente elevados en ratones jóvenes vacunados con C-TAB.G5 en presencia de hidróxido de alumbre (Figura 7). Se logró una mejora particularmente significativa en el título de ANT de toxina B. Al mismo tiempo, no hubo una diferencia grande entre los ratones jóvenes y adultos en la capacidad para soportar las exposiciones a la toxina A y la toxina B. Sin embargo, ambos grupos exhibieron una tasa de protección mejorada cuando se vacunaron en presencia de alumbre. La Figura 7 muestra una comparación de la inmunogenicidad y la eficacia protectora de C-TAB.G5 en ratones jóvenes con respecto a ratones adultos. La Figura 8 muestra la cinética del desarrollo de anticuerpos anti-C-TAB en ratones jóvenes y adultos.
- 5
- 10 Ejemplo 5: Comparación de la inmunogenicidad y eficacia protectora de C-TAB.G5.1 y anatoxina A y B.
- Este estudio se llevó a cabo para comparar la inmunogenicidad y la eficacia protectora de C-TAB.G5.1 con respecto a la anatoxina A/B. La anatoxina A/B utilizada fue la mezcla de partes iguales (1:1) de anatoxina A (lote N.º 1009132) y anatoxina B (lote N.º 1009133). La anatoxina se preparó mediante fijación en formalina y se adquirió a TechLab. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (Charles River Labs.) con 6 a 7 semanas para este estudio. Todos los animales recibieron la primera vacunación mediante inyección intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho el día 0. La segunda vacunación se llevó a cabo mediante inyección IM en el músculo del muslo izquierdo el día 14. Se dividieron 180 ratones vacunados en grupos de la siguiente forma:
- 15
- Grupo 1: Solo PBS
- Grupo 2: 10 µg de C-TAB.G5.1
- 20 Grupo 3: 30 µg de C-TAB.G5.1
- Grupo 4: 10 µg de C-TAB.G5.1 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 5: 10 µg de C-TAB.G5.1 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 6: 30 µg de anatoxina A/B
- Grupo 7: 10 µg de anatoxina A/B
- 25 Grupo 8: 30 µg de anatoxina A/B + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 9: 30 µg de anatoxina A/B + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 10: PBS
- Grupo 11: 10 µg de C-TAB.G5.1
- Grupo 12: 30 µg de C-TAB.G5.1
- 30 Grupo 13: 10 µg de C-TAB.G5.1 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 14: 30 µg de C-TAB.G5.1 + 50 µg de alumbre OH
- Grupo 15: 10 µg de anatoxina A/B
- Grupo 16: 30 µg de anatoxina A/B
- Grupo 17: 10 µg de anatoxina A/B + 50 µg de alumbre OH
- 35 Grupo 18: 30 µg de anatoxina A/B + 50 µg de alumbre OH
- Tres semanas después de la segunda vacunación (día de estudio 35) los animales en los grupos vacunados y no vacunados (N=6) recibieron una exposición letal por inyección intraperitoneal (IP) de 28 ng de toxina A o 50 ng de toxina B. La supervivencia de los ratones se monitorizó en los 9 días posteriores.
- 40
- Se recogieron muestras de sangre de todos los animales dos semanas después de la primera inmunización (día de estudio 14) y dos semanas después de la segunda inmunización (día de estudio 28). El suero se almacenó a -20 °C hasta el análisis. A continuación se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B mediante ELISA y se indicaron como unidades de ELISA (UE). Los anticuerpos neutralizantes de la toxina A y la toxina B (ANT) se determinaron utilizando células Vero tratadas con una cantidad citotóxica de toxina A y toxina B recombinantes.
- 45
- Este estudio demuestra la inmunogenicidad y la eficacia protectora de C-TAB.G5.1 y la anatoxina A/B en ratones después de dos vacunaciones. Los animales que recibieron C-TAB.G5.1 exhibieron títulos de anticuerpo anti-C-TAB más bajos pero significativos en comparación con animales que recibieron la anatoxina A/B. Además, la

5 coadministración con alumbre aumentó en gran medida todas las respuestas de anticuerpo evaluadas. Como resultado, los niveles de los anticuerpos anti-C-TAB y antitoxina A logrados en animales inmunizados con C-TAB.G5.1 o con anatoxina A/B en presencia de alumbre son similares. El único título de anticuerpo más bajo se observó para el anticuerpo antitoxina B cuando los ratones se inmunizaron con C-TAB.G5.1, en comparación con ratones inmunizados con anatoxina A/B. Cabe señalar que a diferencia de los anticuerpos generados contra C-TAB.G5.1 que reconocen epítomos en la porción del extremo C de las moléculas de toxina, los anticuerpos inducidos por inmunización con anatoxina eran específicos para la porción del extremo N de las moléculas de toxina, que se recogió en el ELISA antitoxina. Por consiguiente, los anticuerpos antitoxina A y antitoxina B generados en ratones inmunizados con C-TAB.G5.1 y anatoxina A/B eran anticuerpos de diferente especificidad y, por lo tanto, no se pueden comparar directamente. Sin embargo, los datos indican que la respuesta de anticuerpo a la inmunización con C-TAB.G5.1 es significativamente alta, al igual que con la inmunización con anatoxinas. Además, el estudio de exposición a toxina demostró que la capacidad de la inmunización con C-TAB.G5.1 para proteger a los ratones contra una exposición letal es comparable a la eficacia protectora de la anatoxina A y B. La Figura 9 muestra una comparación de la inmunogenicidad C-TAB.G5.1 y la anatoxina A/B. La Figura 10 muestra los datos de neutralización de toxina y protección para ratones inmunizados con C-TAB.G5.1 en comparación con aquellos inmunizados con la anatoxina A/B.

Ejemplo 5.1: Comparación de títulos de anticuerpo y la eficacia protectora de C-TAB.G5.1 en diferentes regímenes de inmunización.

20 Este estudio se llevó a cabo para comparar la inmunogenicidad y la eficacia protectora de C-TAB.G5.1 en ratones que recibieron tres dosis de la vacuna en diferentes regímenes de inmunización. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (Charles River Labs.) con 6 a 7 semanas para este estudio. 135 ratones se dividieron en 14 grupos. Todos los animales en los grupos números 2 a 13 tres vacunaciones mediante inyección intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho o en el músculo del muslo izquierdo en los días indicados más adelante. Los ratones en grupos 1 y 8 no recibieron vacunación; sirvieron como testigo negativo. La inmunización se llevó a cabo de la siguiente forma:

Grupo	Vacuna	Día de inmunización (vía)
1	-	-
2	10 µg de G5.1	0 (D), 3 (I), 14 (D)
3	10 µg de G5.1 + 50 µg de alumbre	0 (D), 3 (I), 14 (D)
4	10 µg de G5.1	0 (D), 7 (I), 21 (D)
5	10 µg de G5.1 + 50 µg de alumbre	0 (D), 7 (I), 21 (D)
6	10 µg de G5.1	0 (D), 14 (I), 28 (D)
7	10 µg de G5.1 + 50 µg de alumbre	0 (D), 14 (I), 28 (D)
8	-	-
9	10 µg de G5.1	0 (D), 3 (I), 14 (D)
10	10 µg de G5.1 + 50 µg de alumbre	0 (D), 3 (I), 14 (D)
11	10 µg de G5.1	0 (D), 7 (I), 21 (D)
12	10 µg de G5.1 + 50 µg de alumbre	0 (D), 7 (I), 21 (D)
13	10 µg de G5.1	0 (D), 14 (I), 28 (D)
14	10 µg de G5.1 + 50 µg de alumbre	0 (D), 14 (I), 28 (D)

(D) = músculo del muslo derecho (I) = músculo del muslo izquierdo

Se recogieron muestras de sangre de todos los animales en los días de estudio 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42. El suero se almacenó a -20 °C hasta el análisis. Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y

toxina B mediante ELISA y se indicaron como unidades de ELISA (UE). Los anticuerpos neutralizantes de la toxina A y la toxina B (ANT) se determinaron el día 42 del estudio utilizando células Vero tratadas con una cantidad citotóxica de toxina A y toxina B recombinantes.

5 Tres semanas después de la última vacunación (día de estudio 49) los animales en los grupos vacunados y no vacunados (N=8) recibieron una exposición letal por vía intraperitoneal (IP) de 28 ng de toxina A o 50 ng de toxina B. La supervivencia de los ratones se monitorizó en los 9 días posteriores.

10 Este estudio demuestra que todos los títulos de anticuerpo medidos dos semanas después de la tercera vacunación o en el día 35 y 42 del estudio son comparables en todos los regímenes de inmunización, aunque el régimen de inmunización de 0/14/28 exhibe las mejores respuestas de anticuerpos. Si se comparan los títulos de anticuerpo medidos dos semanas después de la segunda vacunación, entonces el régimen de vacunación de 0/14/28 es mejor que el régimen de vacunación de 0/7/21 y mucho mejor que el régimen de inmunización de 0/3/14. Este estudio confirmó que los títulos de anticuerpo antitoxina A/B se potencian significativamente cuando el antígeno se coinyecta con hidróxido de aluminio (no se muestran los datos). Este estudio también muestra que incluso dos dosis de la vacuna con alumbre administradas en un intervalo de dos semanas pueden desencadenar un nivel elevado de anticuerpo, comparable con el nivel obtenido después de tres vacunaciones de dosis.

15 El nivel de anticuerpos neutralizantes de toxina A/B es mucho más alto en el régimen de inmunización de 0/7/21 y 0/14/28 que en el régimen de inmunización de 0/3/14.

20 La protección completa contra la exposición a la toxina A no requiere alumbre en el régimen de inmunización de 0/7/21 y 0/14/28 pero no en 0/3/14. El régimen de inmunización de 0/14/28/ con alumbre indujo el nivel de protección más alto (87,5 %) contra la exposición a la toxina B, mientras que el régimen de inmunización de 0/7/21 proporciona un 37,5 % de protección y 0/3/14 exhibe un 28,6 % de protección. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 20.

Ejemplo 6: Evaluación de la inmunogenicidad y eficacia protectora de la proteína de fusión C-TAB.G5.1 recombinante en hámsteres.

25 Este estudio se llevó a cabo para evaluar adicionalmente la inmunogenicidad de la proteína de fusión C-TAB.G5.1 recombinante administrada con o sin adyuvante en un modelo de animal diferente.

30 Se utilizaron hámsteres hembra (Harlan), con 7 semanas y con pesos entre 80 y 90 g para este estudio. Todos los animales recibieron la primera vacunación mediante inyección de bolo intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho el día 0. La segunda vacunación se llevó a cabo mediante inyección IM en el músculo del muslo izquierdo el día 14 y la tercera vacunación se hizo mediante inyección IM el día 28. Los hámsteres se dividieron en grupos (N=6) y se vacunaron de la siguiente forma:

- Grupo 1: Solo tampón de formulación
- Grupo 2: 10 µg de C-TAB.G5.1
- Grupo 3: 10 µg de C-TAB.G5.1 + 100 µg de alumbre OH
- 35 • Grupo 4: 30 µg de C-TAB.G5.1
- Grupo 5: 30 µg de C-TAB.G5.1 + 100 µg de alumbre OH
- Grupo 6: 100 µg de C-TAB.G5.1
- Grupo 7: 100 µg de C-TAB.G5.1 + 100 µg de alumbre OH
- Grupo 10: Solo tampón de formulación
- 40 • Grupo 11: 10 µg de C-TAB.G5.1
- Grupo 12: 10 µg de C-TAB.G5.1 + 100 µg de alumbre OH
- Grupo 13: 30 µg de C-TAB.G5.1
- Grupo 14: 30 µg de C-TAB.G5.1 + 100 µg de alumbre OH
- Grupo 15: 100 µg de C-TAB.G5.1
- 45 • Grupo 16: 100 µg de C-TAB.G5.1 + 100 µg de alumbre OH

Dos semanas después de la tercera vacunación (día de estudio 42) los animales en los grupos vacunados y no vacunados (N=6) recibieron una exposición letal por inyección intraperitoneal (IP) de 75 ng de toxina A o 125 ng de

toxina B. Se utilizaron 12 hámsteres adicionales para una titulación de dosis de la exposición a la toxina A o la toxina B el día 44. La supervivencia de los hámsteres se monitorizó en los 8 días posteriores.

Se recogieron muestras de sangre de todos los animales dos semanas después de la primera inmunización (día de estudio 14), después de la segunda inmunización (día de estudio 28) y la tercera inmunización (día de estudio 35). El suero se almacenó a -20°C hasta el análisis. A continuación se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B mediante ELISA y se indicaron como unidades de ELISA (UE). Los anticuerpos neutralizantes de la toxina A y la toxina B (ANT) se determinaron utilizando células Vero tratadas con una cantidad citotóxica de toxina A y toxina B recombinantes.

Este estudio demostró que los hámsteres, de forma similar a los ratones, fueron capaces de responder positivamente a la vacunación con C-TAB.G5.1. Los animales que recibieron C-TAB.G5.1 demostraron un aumento dependiente de la dosis en todos los títulos de anticuerpo evaluados, mientras que el adyuvante alumbre mejoró significativamente los títulos de anticuerpo en todas las dosis de C-TAB.G5. Los títulos de anticuerpo más altos se observaron dos semanas después de la segunda inyección (día de estudio 28). La Figura 11 (A-C) muestra títulos de anticuerpo para cada grupo de hámsteres inmunizados. La Figura 12 muestra la cinética del desarrollo de anticuerpos anti-C-TAB en hámsteres inmunizados con C-TAB.G5 en presencia o ausencia de hidróxido de alumbre.

Los resultados del ensayo ANT se muestran en la Figura 13. Estos ratones son similares a los obtenidos para ratones e indican que el anticuerpo generado contra la proteína de fusión C-TAB.G5.1 en hámsteres es eficaz para neutralizar los efectos tóxicos de la toxina A y la toxina B de *C. difficile*.

La Figura 13 también muestra los datos de protección para hámsteres inmunizados con C-TAB.G5.1 después de una exposición letal a toxina. Se logró una protección alta incluso con la vacunación con C-TAB.G5.1 en ausencia del adyuvante. El nivel de protección se mejoró hasta el 100 % mediante la adición de alumbre a la vacuna.

Ejemplo 7: La eficacia protectora de la proteína de fusión C-TAB.G5.1 contra una exposición a esporas de *C. difficile* en hámsteres tratados con clindamicina.

Después del tratamiento con antibiótico, *C. difficile* puede colonizar el intestino y, si es toxígeno, puede provocar diarrea asociada al antibiótico. La enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD) en humanos se modela en hámsteres utilizando clindamicina para hacer que los animales sean susceptibles a la colonización, diarrea y muerte, normalmente pocos días después de la siembra con la cepa toxígena. Para evaluar la eficacia de la vacuna de C-TAB.G5.1, los hámsteres vacunados y no vacunados se expusieron a clindamicina y a la cepa 630 de *C. difficile*. Se mezclaron $100\ \mu\text{g}$ de C-TAB.G5.1 con $125\ \mu\text{g}$ de adyuvante hidróxido de alumbre. Los hámsteres hembra adultos que pesaban $\sim 100\ \text{g}$ recibieron 3 vacunaciones mediante inyección intramuscular (IM) en los días 0, 14 y 28. El placebo fue PBS. 48 hámsteres se dividieron en grupos de 8 y se vacunaron de la siguiente forma:

Grupo 1: Solo PBS + exposición a 10^2 de esporas

Grupo 2: C-TAB.G5.1 + exposición a 10^2 de esporas

Grupo 3: Solo PBS + exposición a 10^3 de esporas

Grupo 4: C-TAB.G5.1 + exposición a 10^2 de esporas

Grupo 5: Solo PBS + exposición a 10^4 de esporas

Grupo 6: C-TAB.G5.1 + exposición a 10^4 de esporas

El día 42 todos los animales en todos los grupos recibieron una dosis oral de $10\ \text{mg}$ de fosfato de clindamicina/ kg de peso corporal. El día 43 todos los animales en todos los grupos se dosificaron mediante sonda oral con esporas de la cepa 630 de *C. difficile* lavadas. Se utilizaron tres niveles de exposición a esporas ($\sim 10^2$, 10^3 y 10^4). La observación, pero no el tratamiento, continuó hasta el día 54. Al finalizar el estudio, todos los animales sobrevivientes estuvieron sin enfermedad durante ≥ 5 días.

Se tomaron muestras de sangre para obtener suero para estudios serológicos los días 0, 14, 28, 42 y el día 54 (fin del estudio). Se recogieron las heces los días 1 y 42, directamente del ano de los hámsteres, o si fuese necesario, del lecho.

Los resultados se muestran en la Figura 14 y exhiben las curvas de supervivencia después de la exposición a las esporas en hámsteres. Los datos de supervivencia se graficaron como curvas de Kaplan-Meier ajustadas a la supervivencia y se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando un análisis logarítmico-ordinal. En todas las dosis de esporas, se observó un 100 % de supervivencia de hámsteres en el grupo vacunado y la supervivencia mejoró de forma significativa en comparación con el grupo con placebo: $p=0,0245$ a 10^2 de esporas, $p=0,0006$ a 10^3 de esporas, $p<0,0001$ a 10^4 de esporas.

Ejemplo 8: Inmunogenicidad y eficacia protectora de C-TAB.G5.1 en monos.

- Este estudio se llevó a cabo para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia protectora de C-TAB.G5.1 en monos cangrejeros. Se utilizaron seis monos cangrejeros hembra con entre 4 y 6 años y con pesos entre 2 y 4 kg para este estudio. Se dispusieron dos grupos de tres monos, el primer grupo (Grupo 1) recibió 200 µg de C-TAB.G5.1 y el segundo (Grupo 2) recibió 200 µg de C-TAB.G5.1 y 250 µg de alumbre. Como adyuvante alumbre se utilizó Rehydragel (Reheis, lote N.º 534401, diluido en PBS hasta 2 mg/ml). Antes de la recolección de sangre o la inmunización se rasuró a los animales (de ser necesario).
- La 1ª (día de ensayo 0) y la 3ª (día de ensayo: 28) inmunización se inyectaron el brazo izquierdo (deltoides), la 2ª inmunización (día de ensayo: 14) se inyectó en el brazo derecho (deltoides). El Grupo 1 recibió 200 µg de C-TAB.G5.1 solo en 0,5 ml de 1xPBS mediante inyección IM y el Grupo 2 recibió 200 µg de C-TAB.G5.1 con 250 µg de alumbre en 0,5ml de 1xPBS mediante inyección IM.
- En los puntos de tiempo establecidos (días de estudio 0, 14, 28 y 42) se obtuvieron 2 a 3 mL de sangre entera mediante métodos estándares en tubos separadores de suero. Las muestras de suero se congelaron a alrededor de -20 °C. Después se utilizó el método ELISA para evaluar los títulos de IgG anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B. Los títulos de anticuerpo se presentaron en unidades de ELISA (UE).
- La Figura 15 muestra que dosis en aumento de C-TAB.G5.1 conducen a una producción de anticuerpo aumentada conociendo las tres proteínas, mientras que la presencia de alumbre mejoró significativamente los niveles de anticuerpo. Los títulos de anticuerpo más altos se observaron con dos vacunaciones el día 42. Estos datos indican de forma clara la viabilidad del uso de las proteínas de fusión C-TAB.G5 o C-TAB.G5.1 recombinantes para la vacunación de sujetos que lo necesitan.
- Ejemplo 9: Comparación de la inmunogenicidad de C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1.
- Este estudio se llevó a cabo para comparar la inmunogenicidad de C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1, así como también el efecto de dos tampones diferentes en los que se administró C-TAB dentro. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (Charles River Labs.) con entre 8 y 9 semanas para la inmunización. Todos los animales recibieron la primera inmunización mediante inyección intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho el día 0. La segunda inmunización se llevó a cabo mediante inyección IM en el músculo del muslo izquierdo el día 14. Un total de 72 ratones se dividieron en 12 grupos vacunados de la siguiente forma:
- Grupo 1: 1 µg de C-TAB.G5 en PBS
 Grupo 2: 3 µg de C-TAB.G5 en PBS
 Grupo 3: 10 µg de C-TAB.G5 en PBS
 Grupo 4: 30 µg de C-TAB.G5 en PBS
 Grupo 5: 1 µg de C-TAB.G5 en tampón histidina
 Grupo 6: 3 µg de C-TAB.G5 en tampón histidina
 Grupo 7: 10 µg de C-TAB.G5 en tampón histidina
 Grupo 8: 30 µg de C-TAB.G5 en tampón histidina
 Grupo 9: 1 µg de C-TAB.G5.1 en tampón histidina
 Grupo 10: 3 µg de C-TAB.G5.1 en tampón histidina
 Grupo 11: 10 µg de C-TAB.G5.1 en tampón histidina
 Grupo 12: 30 µg de C-TAB.G5.1 en tampón histidina
- Se recogieron muestras de sangre de todos los animales dos semanas después de la segunda inmunización (día de estudio 28). El suero se almacenó a -20 °C hasta el análisis. Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B mediante ELISA y se indicaron como unidades de ELISA.
- La Figura 16 muestra que todos los títulos de anticuerpo (anti-C-TAB, antitoxina A y antitoxina B) no fueron significativamente diferentes (tal como se revela por la prueba de la T) en el intervalo de dosis 1 a 30 µg para las tres formulaciones de vacuna. Se logró una producción de anticuerpo ligeramente más alta con la formulación de C-TAB.G5 en tampón histidina, en comparación con PBS. No se observó una diferencia significativa entre la inmunización con las formulaciones en histidina de C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1. Por consiguiente, este estudio demuestra una inmunogenicidad igual de las construcciones C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1.
- Ejemplo 10: Preparación y evaluación de las proteínas de fusión C-TABNCTB y C-TADCTB alternativas.

Este ejemplo describe la preparación de otras dos proteínas de fusión que comprenden una porción de dominio del extremo C de CTA y dos porciones del dominio del extremo C dominio de CTB derivada de la cepa VPI-10463 de *C. difficile*. La proteína de fusión C-TABNCTB (SEQ ID N.º: 18) comprende, al igual que C-TAB.G5, 19 unidades repetitivas de CTA (aminoácidos 2272-2710), 23 unidades repetitivas de CTB (aminoácidos 1850-2366) y 10 repeticiones más adicionales de CTB (aminoácidos 1834-2057) fusionadas con el extremo C de CTB. La proteína de fusión C-TADCTB (SEQ ID N.º: 20) comprende la secuencia de C-TAB.G5 (19 repeticiones de CTA y 23 repeticiones de CTB) más 24 unidades repetitivas adicionales de CTB (aminoácidos 1834-2366) fusionadas con el extremo C de C-TAB.G5. Por consiguiente, C-TADCTB comprende una porción doble de las unidades repetitivas de CTB. La clonación de las construcciones génicas C-TABNCTB y C-TADCTB se llevó a cabo de forma similar a la descrita en el Ejemplo 1.1. Las proteínas de fusión recombinantes se expresaron en células de in *E. coli* y se purificaron utilizando un procedimiento estándar tal como se describió en el Ejemplo 1.2. Los polipéptidos aislados se evaluaron en los estudios de inmunogenicidad y protección en animales.

Ejemplo 10.1: Comparación de la inmunogenicidad y eficacia protectora de C-TAB.G5, C-TABNCTB y C-TADCTB en ratones.

Este estudio se llevó a cabo para comparar la inmunogenicidad y eficacia protectora de C-TAB.G5, C-TABNCTB y C-TADCTB en ratones vacunados con cinco dosis de antígeno en dos intervalos logarítmicos. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (Charles River Labs.) con 6 a 7 semanas para este estudio. Todos los animales recibieron dos vacunaciones: la primera mediante inyección intramuscular (IM) (50 µl) en el músculo del muslo derecho el día 0. La segunda vacunación se llevó a cabo mediante inyección IM en el músculo del muslo izquierdo el día 14. Todas las inmunizaciones se llevaron a cabo en ausencia de alumbre. Se recogieron muestras de sangre dos semanas después de la segunda inmunización (día de estudio 28). El suero se almacenó a -20 °C hasta el análisis. Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B mediante ELISA y se indicaron como unidades de ELISA (UE) que se muestran en la Figura 17.

Este estudio demostró que las proteínas de fusión C-TADCTB y C-TABNCTB alternativas, así como también C-TAB.G5 son altamente inmunógenas y capaces de inducir una respuesta de anticuerpos fuerte contra la toxina A y la toxina B incluso sin agregar un adyuvante.

Además de evaluar la respuesta de anticuerpos, se determinó la capacidad de la inmunización con C-TADCTB y C-TABNCTB para proteger a los ratones contra una exposición letal a la toxina B natural. Tres semanas después de la segunda vacunación (día de estudio 35) los animales en los grupos vacunados y no vacunados (N=6) recibieron por vía intraperitoneal (IP) una dosis letal de 50 ng de toxina B. La supervivencia de los animales se monitorizó en los 9 días posteriores y los resultados se muestran en la Figura 18. Este experimento demostró que la inmunización de ratones con 33 µg de C-TADCTB en ausencia de alumbre fue capaz de conferir un 100 % de protección contra una exposición letal a la toxina B natural, mientras que la misma dosis de C-TAB.G5 y C-TABNCTB solo induce una protección parcial. Estos datos indican que, de forma similar a C-TAB.G5, otras dos proteínas de fusión C-TADCTB y C-TABNCTB pueden ser protectoras contra la exposición letal a la toxina natural.

Ejemplo 10.2: Comparación de la inmunogenicidad y eficacia protectora de C-TAB.G5.1 y C-TADCTB en hámsteres.

Este estudio se llevó a cabo para evaluar adicionalmente la inmunogenicidad de la proteína de fusión C-TADCTB alternativa administrada con o sin adyuvante alumbre en un modelo de animal diferente.

Este estudio se diseñó tal como se describe en el Ejemplo 6: se vacunaron hámsteres hembra tres veces mediante inyección IM (días de estudio 0, 14 y 28) en presencia o ausencia de 100 µg de hidróxido de alumbre. Dos semanas después de la tercera vacunación (día de estudio 42) todos los animales recibieron una exposición letal por inyección intraperitoneal (IP) de 75 ng de toxina A o 125 ng de toxina B. Se recogieron muestras de sangre en los días de estudio 14, 28 y 35 y se determinaron los títulos de anticuerpos séricos para C-TAB, toxina A y toxina B mediante ELISA. Los anticuerpos neutralizantes de la toxina A y la toxina B (ANT) se midieron en sueros del día 35. La supervivencia de los hámsteres se monitorizó y se informó como un % de protección.

Este estudio demostró que la proteína de fusión C-TADCTB puede inducir una respuesta de anticuerpos antitoxina en hámsteres, de forma similar a con ratones. El adyuvante alumbre mejoró significativamente todos los títulos de anticuerpo evaluados. Los resultados del ensayo ANT que se muestran en la Figura 19 indican que el anticuerpo generado contra C-TADCTB es eficaz para neutralizar los efectos tóxicos de la toxina A y la toxina B de *C. difficile*. La Figura 19 también muestra la comparación de datos de protección para hámsteres inmunizados con C-TAB.G5.1 o con C-TADCTB. Se logró una protección elevada mediante vacunación con ambas proteínas de fusión recombinantes.

Ejemplo 11: Un estudio en fase 1 sin ocultación para evaluar la seguridad, inmunogenicidad y respuesta a la dosis de una composición farmacéutica que comprende C-TAB.G5.1.

La composición farmacéutica que comprende C-TAB.G5.1, una proteína de fusión recombinante que consiste en la Toxina A y la Toxina B truncadas de *Clostridium difficile* (*C. difficile*), que se administrará en tres dosis diferentes: 20

µg con Al(OH)₃ (alumbre), 75 y 200 µg con y sin Al(OH)₃, respectivamente, por inyección intramuscular (IM) en tres vacunaciones los días 0,7 y 21.

Objetivos del estudio:

Primarios:

- 5 ■ Investigar la seguridad y tolerabilidad de una composición farmacéutica que comprende C-TAB.G5.1 hasta 6 meses después de la tercera vacunación.

Secundarios:

- 10 ■ Investigar la respuesta inmunitaria medida contra el antígeno de vacuna C-TAB.G5.1 y las toxinas A y B naturales de *C. difficile* para tres dosis diferentes y dos formulaciones en los días 0, 7, 14, 21, 28, 113, 201 después de la primera vacunación para obtener una primera indicación de la dosis y formulación óptimas.
- Investigar la capacidad de los anticuerpos IgG inducidos por la vacuna de C-TAB.G5.1 para neutralizar las toxinas A y B de *C. difficile* in vitro.

Diseño del estudio

- 15 Se trata de un estudio en fase 1, sin ocultamiento, parcialmente aleatorizado, de dosis escalonadas que consistirá en una parte A en adultos sanos con edades entre ≥18 y <65 años y una parte B en ancianos sanos ≥65 años, el último grupo etario representa la población más vulnerable a padecer infecciones por *C. difficile*. La parte A se llevará a cabo con un régimen de vacunación en los días 0, 7 y 21 en cinco grupos de tratamiento de 12 sujetos adultos sanos para estudiar la seguridad y la respuesta a la dosis para 20 µg de vacuna de C-TAB.G5.1 con adyuvante y para 75 µg y 200 µg de vacuna de C-TAB.G5.1 con o sin adyuvante, respectivamente. La seguridad y la inmunogenicidad se analizarán después de que todos los sujetos adultos de la parte A hayan recibido la tercera vacunación, todos los datos de seguridad serán revisados por una Junta de Vigilancia de Datos de Seguridad (DSMB, por sus siglas en inglés) antes de la inclusión de sujetos de la parte B. En caso de identificar grupos de tratamiento no seguros o en vano (es decir, dosis que no inducen respuestas de IgG considerables) durante el análisis provisional, estos grupos de tratamiento se suspenderán y no se continuarán en la parte B.

- 25 La parte B del estudio buscará la confirmación de la dosis en la población anciana. Por consiguiente, la parte B se llevará a cabo en 5 grupos de tratamiento de 20 sujetos ancianos sanos por grupo. Se aplicará el régimen de vacunación de los días 0, 7 y 21. Este diseño de estudio permitirá comparar respuestas a dosis en adultos y ancianos. El último grupo etario será la población objetivo principal para una vacuna para *C. difficile*, ya que representa la población más vulnerable para las dos indicaciones objetivo en la vía de desarrollo de una vacuna para *C. difficile*, es decir, la prevención de la diarrea por *C. difficile* recurrente y la prevención de la infección primaria por *C. difficile* en una estrategia de vacunación preventiva basada en la edad o en el riesgo por edad. Sin embargo, los sujetos ancianos podrían responder menos a la vacunación que los adultos jóvenes, por consiguiente, la confirmación de la dosis en la población objetivo de ancianos es necesaria desde una etapa de desarrollo temprana. Un análisis provisional después de que todos los adultos de la parte A hayan sido vacunados permitirá descartar dosis/formulaciones no seguras que no inducen respuestas de IgG considerables en adultos a efectos de mitigar el riesgo de exponer a los sujetos en el grupo de ancianos a dosis potencialmente inseguras o en vano (p. ej., la dosis más baja) y/o formulaciones (p. ej., formulación sin adyuvante) de la vacuna.

- 35 La vacuna de C-TAB.G5.1 es una disolución acuosa de C-TAB.G5.1 en 20 mM de L-Histidina, 75mM de NaCl, sacarosa al 5 %, Tween®80 al 0,025 %; pH6,5 producida mediante métodos estándares.

40

SECUENCIAS

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
C-TAB.G5 (secuencia de ácidos nucleicos)	1	<p>ATGGTAACAGGAGTATTTAAAGGACCTAATGGATTTGAGTATTTTGC ACCTGCTAATACTCACAATAATAACATAGAAGGTCAGGCTATAGTTT ACCAGAACAAATTCTTAACCTTTGAATGGCAAAAAATATTATTTTGAT AATGACTCAAAAGCAGTACTGGATGGCAAACCATTGATGGTAAAA AATATTACTTTAATCTTAACACTGCTGAAGCAGCTACTGGATGGCAA ACTATTGATGGTAAAAAATATTACTTTAATCTTAACACTGCTGAAGC AGCTACTGGATGGCAAACCTATTGATGGTAAAAAATATTACTTTAATA CTAACACTTTCATAGCCTCAACTGGTTATACAAGTATTAATGGTAAA CATTTTTATTTAATACTGATGGTATTATGCAGATAGGAGTGTAAAA GGACCTAATGGATTTGAATACTTTGCACCTGCTAATACTCATAATAA CAACATAGAAGGCAAGCTATACTTTACCAAAAATAAATCTTAACCTT TGAATGGTAAAAAATATTACTTTGGTAGTGACTCAAAAGCATTACC GGATTGCGAACTATTGATGGTAAAAAATATTACTTTAATACTAACAC TGCTGTTGCAGTACTGGATGGCAAACCTAATGGTAAAAAATACT ACTTTAATACTAACACTTCTATAGCTTCAACTGGTTATACAATTATTA GTGGTAAACATTTTTATTTAATACTGATGGTATTATGCAGATAGGAG TGTTTAAAGGACCTGATGGATTTGAATACTTTGCACCTGCTAATAACA GATGCTAACAAATATAGAAGGTCAGCTATACGTTATCAAAATAGATT CCTATATTTACATGACAATATATATTATTTGGTAATAAATCAAAAGC AGCTACTGGTTGGGTAACCTATTGATGGTAATAGATATTACTTCGAGC CTAATACAGCTATGGGTGCGAATGGTTATAAACTATTGATAATAAA AATTTTTACTTTAGAAAATGGTTTACCTCAGATAGGAGTGTAAAAAGG GTCTAATGGATTTGAATACTTTGCACCTGCTAATACGGATGCTAACAA ATATAGAAGGTCAGCTATACGTTATCAAAATAGATTCCTACATTTA CTTGGAAAAATATATTACTTTGGTAATAAATCAAAAGCAGTACTGG ATGGCAAACCTAATGGTAAAGTATATTACTTTATGCCTGATACTG CTATGGCTGCAGCTGGTGGACTTTTCGAGATTGATGGTGTATATATT</p>
		<p>TCTTTGGTGTGATGGAGTAAAAGCCCTGGGATATATGGCAGATCT ATGCATAATTTGATAACTGGATTTGTGACTGTAGGCGATGATAAATA CTACTTTAATCCAATTAATGGTGGAGCTGCTTCAATTGGAGAGACAA TAATTGATGACAAAAATTATTATTTCAACCAAAGTGGAGTGTACAA ACAGGTGTATTTAGTACAGAAGATGGATTTAAATATTTGCCCCAGC TAATACACTTGATGAAAACCTAGAAGGAGAAGCAATTGATTTTACTG GAAAATTAATTATTGACGAAAAATTTTATTTTGTATGATAAATTATA GAGGAGCTGTAGAAATGGAAAGAAATTAGATGGTGAAGATGCATTTTT AGCCCAGAAACAGGTAAAGCTTTTAAAGGTCTAAATCAAAATAGGTG ATTATAAATACTATTTCAATCTGATGGAGTTATGCAAAAAGGATTT GTTAGTATAAATGATAATAAACACTATTTTGTATGATTCTGGTGTATG AAAGTAGGTTACTACTGAAATAGATGGCAAGCATTCTACTTTGCTGA AAACGGAGAAAATGCAAAATAGGAGTATTTAATACAGAAGATGGATT AAATATTTTGTCTATCATAATGAAGATTTAGGAAATGAAGAAGGTGA AGAAATCTCATATTCTGGTATATTAATTTCAATAATAAATTTACTA TTTTGATGATTCATTTACAGCTGTAGTTGGATGGAAAAGATTTAGAGG ATGGTTCAAAGTATTATTTGATGAAGATACAGCAGAAGCATATATA GGTTTGCATTAATAAATGATGGTCAATATTATTTAATGATGATGGA ATTATGCAAGTTGGATTTGTCATATAAATGATAAAGTCTTCTACTTC TCTGACTCTGGAATTATAGAATCTGGAGTACAAAACATAGATGACAA TTATTTCTATATAGATGATAATGGTATAGTTCAAATTTGGTGTATTTGA TACTTCAGATGGATATAAATATTTTGCACCTGCTAATACTGTAATG ATAATATTTACGGACAAGCAGTTGAATATAGTGGTTTAGTTAGAGTT GGGAAGATGTATATTATTTGGAGAAACATATACAATTGAGACTGG ATGGATATATGATATGGAAAATGAAAGTGATAAATATTATTTCAATC CAGAAACTAAAAAAGCATGCAAAAGGTATTAATTTAATTGATGATATA AAATATTATTTTGTATGAGAAGGGCATAATGAGAACGGGTCTTATATC ATTTGAAAATAATAATTATTACTTTAATGAGAATGGTGAATGCAAT TTGGTTATATAAATATAGAAGATAAGATGTTCTATTTTGGTGAAGAT GGTGTATGCAGATTGGAGTATTAATACACCAGATGGATTTAAATA CTTTGCACATCAAAATACTTTGGATGAGAATTTTGGGGAGAATCAA TAAACTATACTGGTTGGTTAGATTTAGATGAAAAGAGATATTTATTT ACAGATGAATATATTGCAGCAACTGGTTCAAGTTATTATTGATGGTGA GGAGTATTATTTGATCCTGATACAGCTCAATTAGTGATTAGTGAATA G</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
C-TAB.G5 (secuencia de aminácidos)	2	MVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDN DSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAA TGWQTIDGKKYYFNTNTFIASSTGYTSINGKHFFNTDGMQIGVFKGPN GFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTI DGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASSTGYTIISGKHFF NTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIY YFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLP QIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNS KAVTGWQTINGKVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGI YGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPIINGGAASIGETIIDDKNYFQSGV LQTGVFSTEDGFKYFAPANLTDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYR GAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGMQKGFV SINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGENMIGVFNTEDGFKY FAHNEDLGNEEGEISYSGILNFNNKIYYFDDSFYAVVGVKDLLEDGSK YFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGII ESGVQNIIDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSYGYKYFAPANTVNDNIYQAV EYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWYDMENESDKYYFNPETKACKGI NLIDDIKYYFDEKGMRTGLISFENNNYYFNENGENMIFGYINIEDKMFYF GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRY YFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE
C-TAB.G5.1	3	CCATGGTTACAGGTGTTTTCAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATATTTG

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
(secuencia de ácidos nucleicos)		<p>CACCCGGCAAATACCCACAATAATAATATTGAAGGCCAGGCCATCGTG TATCAGAATAAAATTTCTGACCCTGAACGGCAAAAAATACTATTTTCGA TAACGATAGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCAAACCATTGATGGCAAA AAATATTACTTCAACCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCCGGCTGGCA GACGATCGACGGTAAAAAGTACTATTTAACCTGAACACAGCCGAA GCCGCTACAGGCTGGCAGACAATAGATGGGAAGAAGTATTATTTTAA TACCAATACCTTTATTGCCAGCACCGGCTATAACCAGCATTAAATGGCA AACACTTCTATTTTAAACCCGATGGTATTATGCAGATCGGTGTGTTA AGGGCCCTAATGGTTTTGAGTACTTCGCTCCGGCTAATACCGATGCA AATAACATCGAAGGTCAGGCAATTCTGTACCAGAACAATTTAAC GCTGAACGGTAAGAAATATTACTTTGGTAGCGATTCAAAAGCCGTTA CCGGTCTGCGTACGATCGACGGCAAGAAATATTATTTCAATACAAAC ACCGCAGTTGCCGTGACAGGTTGGCAGACGATAAATGGTAAGAAGT ACTACTTCAAGCACAATACCAGCATTGCAAGTACCGTTATACCATT AICAGCGCAAAACACTTTTACTTTCAATACAGACGGCAATATGCAGAT TGGCGTTTTCAAAGTCCGGATGGTTTTCGAGTACTTTGCCCTGCAA ATACAGATGCAAAACAATATTGAGGGACAGGCAATTCGCTATCAGAA TCGTTTTCTGTATCTGCACGATAACATCTATTACTTCGCAAAATTTAAC AAAAGCAGCCACCGGTTGGGTTACAATTGATGGTAATCGTTATTACT TTGAGCCGAATACCGCAATGGGTGCAAAATGGTTATAAAACCATCGAT AACAAAAATTTTTATTTCCGCAACGGTCTGCCGAGATTGGTGTTTTT AAGGGTAGCAATGGCTTCGAGTATTTTGCGCCAGCCAACACCGATGC CAACAACATTGAAGGCCAAGCGATTCTGTTATCAAAACCGCTTTCTGC ATCTGCTGGGCAAAATTTATTACTTTGGCAACAATAGCAAAGCGGTG ACGGGCTGGCAAAACCTTAAACGGTAAAGTTTATTATTTTCATGCCGGA TACCGCTATGGCAGCAGCCGGTGGTCTGTTTGAATTTGATGGCGTGA TTTTTTTTTTGGCGTGGATGGTGTAAAGCACCCGGTATTTATGGTC GTAGCATGCATAATCTGATTACCGGTTTTGTTACCGTGGGCGACGAT AAATACTACTTTAATCCGATTAATGGTGGTGCAGCAAGCATTGGTGA AACCATTCGATGACAAAACTATTATTTTAAACCAGAGCCGTTCTC TGCAGACAGGTGTTTTAGCACCGAAGATGGCTTCAAATATTTTGCT CCTGCGAATACACTGGATGAAAATCTGGAAGGTGAAGCAATTGATT TACCGGCAAACTGATCATCGACGAAACATCTACTATTTTGATGATA ATTATCGCGGTGGTGAATGGAAAGAACGTGATGGTGAATCAGA CTATTTTAGTCCGAAACCGGTAAGCCTTTAAAGGTCTGAATCAGA TCGGCGATTACAAGTATTACTTTAATTCAGATGGCGTGATGCAGAAA GGCTTTGTGAGCATTAAACGACAACAACACTATTTTGACGACAGCGG TGTGATGAAAGTGGTTATACCGAAATCGACGGGAAACATTTTATG TTGCCGAAAACCGCGAAATGCAGATTGGAGTATTTAATACCGAGGA CGGCTTAAATACTTTGCCATCATAATGAAGATCTGGGTAATGAAG AAGGCGAAGAAATTAAGCTAIAAGCGCATTCIGAAATTTAATAACAAG ATCTATTATTTTCGATGATAGCTTACCGCAGTTGTTGGTGAAGAT CTGGAAGATGGCAGCAAAATATTATTTGATGAAGATACCGCAGAGGC CTATATTGGTCTGAGCCTGATTAATGATGGCCAGTATTATTTCAACGA TGATGGTATCATGCAGGTGGTTTTGTGACCATCAACGATAAAGTGT TCTATTTACCGGATAGCGGCATTATTGAAAGCGGTGTTCAGAACATC GACGATAACTATTTCTACATCGATGATAACGGTATTGTTTCAGATTGG CGTGTGATACCTCCGATGGTTATAAATATTTTCGACCAGCCAATAC CGTGAACGATAAATATTAAIGGTCAGGCAGTTGAATAATTCAGGTCIGG TTCGTGTTGGCGAAGATGTTTATTATTTGGCGAAACCTATACCATG AAACCGGCTGGATCTATGATATGGAAAACGAGAGCGACAAGTACTA TTTCAATCCGAAACGAAAAAGCCTGCAAAGGCATTAATCTGATCG ACGATATTAAGTACTACTTTGACGAAAAAGGCATTATGCGTACCGGT CTGATTAAGCTTTGAGAACAACAATAATTTCAATGAGAACGGTGA GATGCAGTTGGCTATATCAACATCGAGGACAAAAATGTTTTATTTG GTGAGGACGGTGTGATGCAGATAGGGTTTTTAATACACCGGATGGG</p>
		<p>TTAAGTATTTGCACATCAGAACACCCTGGATGAAAACCTTTGAAGG CGAAAGCATTAAATATACCGGTTGGCTGGATCTGGATGAGAAACGTT ATTATTTACCGACGAATACATTGCAGCAACCCGTAGCGTTATTATT GATGGTGAAGAAATTAATCTTCGATCCGGATACAGCACAGCTGGTTAT TAGCGAATAACTCGAG</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
C-TAB.G5.1 (secuencia de aminoácidos)	4	<p>VTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDND SKAVTGWQIDGKKYYFNLNTAEEAATGWQIDGKKYYFNLNTAEEAAT GWQIDGKKYYFNTNTFIASGTYSINGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPN FEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTID GKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTHSGKHFFYFN TDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLYLHDNIYY FGNNKAATGWVTIDGNRY YFEPNTAMGANGYKTI DNKNFYFRNGLPQ IGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLHLLGKIYYFGNNSK AVTGWQTINGK VYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVYFFGVDGVKAPGIY GRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPI NGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVL QTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIDENIYFDDNYRG AVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMMQKGFVSI NDNKH YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAENGEMQIGVFNTEDGFKYF AHHNEDLGNEEGEISYSGILNFNKNIYYFDDSDFTAVVWGDLEDGSKY YFDEDTAEA YIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIE SGVQNIDNYYFIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGOAVE YSGLVRVGEDVY YFGETYTIETGWYIDMENESDKY YFNPETKKACKGI NLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRY YFTDEYIAATGSVIIDGEEY YFDPDTAQL VISE</p>
Secuencia de ácido nucleicos de <i>trdA</i> (cepa 630)	5	<p>atgctttaatatctaaagaagagtaataaaactcgcatatagcattagaccaagagaaaatgagtataaaactatac taactaattagacgaatataataagtaactacaacaataatgaaaataaatattacaattaaaaactaaatgaa tcaattgatgittatgaataaataataaaactcaagcagaatagagcactctctaactcaaaaaagatafataaaa gaagtaattctfataaaaaatccaatacaagccctgtagaaaaaaatfacaatttgatgataggtggagaagctag tgatattgctctgaatacaaaaactgggctgataatgacagaatataatfcaactgtagatgataggaag cattcttagtaatacactaaaaagctatagttgaactctaccactgaagcattacagcctagagggaagat tcaaaatcctcaattgataatgaatfatacaaaaaaggatggaattatataatgatagacaaaaaggfataaaa ttattataaactcaaatcaataaactacagctacacatagatgataatataaagctcactatgataatgataat agagatgaaactgtattagaatcatalagaacaactcttgagaaaaataatagtaacatgggagatagatcagg gctaagattgtttacagaacaagagttataaataatfataagcaggagttgtaaatgtagaaattagctgcagca tctgacatagtaagattatagcccaaaaaatfctggcggagatattagatgtagatgctccaggatcactctg atfataaaaaaataatctagacctagctctattggactagaccgtgggaaatgataaaatagaggctattatgaag tataaaaaatataaataatfatacatcagaaactfataaaactgatcaacaataaaagataatfataaactatta tagaaagtaaaagtgaaaaactgagatattctaaatfagaaaaatfataatgtagctgactgaaatfataaactgctt cgcttaggcaggttataaatacaagcctgatacaaaaaggtcatacttactaacctagtaataagaacaagtaa aaaaatagatcaatfataaaccacacctaaaccagccatagagctgataaactcacagatacactaaaatf ttcatgattcattatfatacagctaccgcagaaaactctatgctfatacaaaaaatagcaccatactacaagtaggtt tatgccagaagctgctccacaataagtttaagtggtccaggagcttatgctgacttactatgattcataaattac aagaaaaactatagaaaaactfataaagcactagattfataagaatfataatfatacaaaaaatatactatcacta acagaacaagaataatagctatggagcttgatcaagcaagtgcaaaatcaatfatagaataatgtaagagat tatactggtgatctcttgaagacaatgggtagactfataaaaaactgcccctgacaaaaactattfataaat aataaaatccatcaacaatgtagaagaagctggaagtataaataatgattcattatatacagfatacaaggagatg atataagttatgaagcaacatgcaattatfctaaaaatcctaaaaatagattattatacaaacgaaatagatgaaa gtagaaaaactactfataaagtagatggagaactatfataaataatataagatgatacctgaaagattaaaa aataagaaaaagtaaaagtaaccttattggacatgtaaaagatgaattcaacacaagcgaattgctagattaggt gtagatcactfcaatgagataagfcaattatagataccalaaaatagatatacaccataaaatgtagaagtaaac ttactggatgataatgatttagatttaagttgaagaacttatcctgggaagtgctattaagattatgacaa aattactccacttacctgatgataaaaaattctatfataagagcaaatcaatagaagtaagtaagtaagta gggaagaaaaaactctgctcactcagtaaatggataataaagaagaagctattatgagcatttatctagta aagaatacattttttagctatagataaagctaaaaagcaagctcaagaatfatacaggatgacatcaatata</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
		<p>gaagatataaaaaacatttacttctgatccaagtgtagccctgatacaaaaattattttaaataacttaagcttaattga atctcttattggtgattacatttattatgaaaaatagagccctgttaaaaaataaaitcacaacttatagatgatttaataga tgagttcaacttacttgaaaaatgatctgatgaattatagaatlaaaaaaataaataaactatagatgaggaagatttaata cttttgaagatctcaaaaaataaacttactctgtaagatttattcaaaaaagtaagggtagtcagttttagtag aaacagaaaaagaaattttcaaaaatatagcgaacatattcaaaaagaaataagtagactataaagaatgataaattac agalglttaaggtaatttttggataatatacagttagatcacttctcaagttlaalacatlaaacgcagacacagcttattc aatcattatagattatagtagcaataaagatgactgaatgatttaagtagctcagtttaaggttcaactttatgctcaac tatttagtagcaggtttaatactatataatgactctatccaataglaaalftaalatcaaatgcaaglaalgalactataaal gtactacctacaataacagaggggafactatttattctactatattagacggaataaacttaggtgcagcaatfaag gaattactagacgaacatgccattactaaaaaaagaattagaagcgaaggtgggtgttttagcaataaataatgta ttactatagctgcaactgtagctccaattgttggaaatgggtgctgaagttactatfttctattactatagctgtagatct gcaggaatcctctatttagttaaataatgaatfaatttgcataaaggaacttcaaggtgtaaacattttatcatittgt ctgaatctaaaaatagccctcttaaaacagaagatgataaaaatttagtccattgatgatgtaataatcagaaa tagattttaaataaattcgataaacaggaacatgataatattagcaatggagggggagcagacacacagctgtaga ctegtaalatagacacttttctcactccatctaaagttctcalatctctcaatftatcaatttattctgcaataggtataga aacagaaaaatctagattttcaaaaaaataatgatgttaccaatgctcctcaagaggttttgggtgggaaactgga gcagttccaggttlaagatcattggaaaaagacgggaactagatttgaatcaataagagattataccacaggtaaat ttactggagattctgcttttccgattgcaataacacattaaaaccagtttatgagaacacacacacacacacacacac ctagataaagatactagaacttcataatgccactalaactaactaacgaattagaacaataatcttatttatttattgat ggagcaggggaacttactcttatttatttctcatccaatatacaacgaatataaatttactaaagatgatttagga tatttaataatgataatgaaagtaagagaataatctatagaaaatggtagcttaaaaaaggaagtttaataaagatgitt laaglaaaatlgatataaataaataaacttattatagggcaatcaacaatagattttcagggcagatagataaataa gatagataatatttctgacttggtagttagatgataaaatagtttaataatgaaataaacttggtagcaaaactttag ttgttattgctggggataaaaaattattgataccaatttacttaataattttagagaatacaacttttagccctagatag taaaaatataagcgtacaacttactgatgaatcaataaataaattttggagctatcttaaaaacagcaaaaaagca laatacattataaaaaagacaglaaaaaatattagaatttttaaatgacagtaacallaagaaftaacacaglaaaatftat tgcagaaatataaattgattttatgaagatgataataactataacaggaataactatgtagataataactgataa aaglatagatttcttatttcttagtagtaaaaaacagtaaaaagtaaatgatttataaataaactgtagacttctg cttacctgattttgtaaaaactcagatggacaccataaacttcaattttatgaattttttggacaataaagtttctg gaaattgttgggttgaataataaattttgtaactgataaatactttacccttgggttaaaacttaacttggatagtag aatttatttgacaataataaataatagatataattttggtagaaggaacatctgcaactaaagcactatatttag cggaaatggtagaaatgttagtagagccctataataactctgatacgggtgaagatatacttacttactagatttt cctatgaacctctctggaatagatagatatacaataaagatttagatgacacctgattatatacaagtttaataaata laataccaatttattcaaatgtagtactacccctgagattatagttccttaacccaatacacttcccaaaaaagtaaalat aaatttagatagtttcttttgagtataaatggctacagaaggaagtagctttatttttagtagacttagaagaaagt aataaaaaatatacaaaaaataaagaatcaaaaggtatcttatcaactcaactcaatttaataaataagtagatagattt aaagatataaaaaactcattagatataatagtagtaattttaaactcaatttaactgaaaaatgaatagatagagatc atttaggatttaaaaatagataaataaactttactatgtagaagatagtaaaatgtagtaaaatgtagtaaaatgtag taattcatttctattttgactctatagaatttaacttaglaactggatggcaactatcaatggtaaaaaatattatttga tataaatactggagcagctttaaattagttataaaaattataatggtaaacactttattttaaataatgatgggtgatgag tggagattttaaaggacctgattgatttgaatatttgcacctgccaatacctcaaaaataaataaataaaggtcagcc tatagttlatcaaaaglaaacttaacttgaatggcaaaaaatattttgataatgactcaaaaagcagtagcactggatg gagaatttaaacatgagaaaatattacttlaactcaataatgctatttctgtagcagtggaatgcaatgtagaataa taagattatttcaactctgactctatcactcaaaaaggtggcagactgtaattggtagtagactactttagact gataccgtattgctttaaaggttataaaaactttaggtaaacactttatttttagatgattttagtagtaaaaatag gtggttagtagctctaatggatttgaatatttgcacctgctaacttataataaatacaataaaggtcagccctatag ttatcaaaatgaatttcaacttgaatgtaaaaaatattactttgataatacctcaaaaagcagttaccggattgcaaaa ctattgatagtaaaaaatattacttataactaacactgctgaagcagctactggatggcaactatttaggtgtaaaaa atattcttlaactaacactgctgaagcagctactggaaggcaactatttagglaaaaaatatttacttataactaa cactgctatagcttcaactggilatacaatattatagtaaacatttttatttataactgtagtatttagcaatagga tgtttaaaggacctaaatgatttgaatatttgcacctgctaactggatgtaaacacatagaaaggtcaagctactt taccaaaatgaatttcaacttgaatgtaaaaaatattactttggtagtagcactcaaaaagcagttactggatggagaat lattaacaataaagaatattacttlaactcaataatgctatttctgcaattcacttagcactataaataatgacaagatt acttttagttatgatggaatttcaaaaatggatattactattgaaagaaataatttctatttttagtctaataatgaacta aaatggtaacaggagattttaaaggacctaatggattttagattttgcacctgctaactcaactcaataaatacaataga aggtagcctatagttaccagaacaatttcaacttgaatggcaaaaaatattttttgataatgactcaaaaagcag</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
		<p>ttactggatggcaaccattgatggtataaaatattactttaacttaacactgctgaagcagctactggatggcaaac tattgatgtaaaaaaataacttaacttaacactgctgaagcagctactggatggcaaacattgatgtaaaaaa attactttaactaacttaacttaacactgctgaagcagctactggatggcaaacattgatgtaaaaaa ttatcgagataggaggtttaaaggacctaaggatggaatacttgcacctgtaataactcataataataacatagaa ggccaagctatactttacaaaataaacttcaacttgaatggtataaaatattacttggtagtgactcaaaagcatt accggattgcgaactattgatggtataaaatattactttaactaactgctgctgacgtactggatggcaaacat taatggtaaaaaataacttaacttaacacttctatagcttcaactggtatacaantattagtgtaaacattttatttt aatlactgatggtattatcgagataggaggtttaaaggacctgatggattgaaactttgcacclgctaatacagatg ctaacaatataagaagtcagctatacgttatacaaatagattctataattacatgacaatatatattttgtaataat tcaaaagcagctactggttgglaactattgatgtaaatagatattacttcgagcctaatacagctatgggccaag gttataaaactattgataataaaatattacttttagaatggtttacctcagataggaggtttaaaggctcaatggatt gaatactttgcacctgctaatacggatgtaacaatataagaagtcagctatacgttatacaaatagattctacattt actggataaataatattacttggtaataaactcaaaagcagctactgtagtgcaaacatttaaggtaagatattacttt atgcclgatactgctatggctcgactgggacttttcgagattgatgggttatatattctttgggtttgatggagta aaaagccctgggatataatggctaa</p>
<p>Secuencia de aminoácidos de <i>trdA</i> (<i>cepa 630</i>)</p>	<p>6</p>	<p>MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTLTNLDEYNKLTNNNENKYLQLKK LNESIDVFMNKYKTSRRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV WIGGEVSDIALEYIKQWADINAENIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTT EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKRMFEFYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT IDDIKSHLVSEYNRDETVELESYRTNSLRKINSNHGDIRANSLFTEQELN IYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLQKHSDFLTKTISR PSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLDQQLDNFKLIIESK SEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKN RYQFLNQHLNPAIESDNFTDTTKIFHDSLFNSATAENSMFLTKIAPYLQ VGFMPPEARSTISLSPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEFKFPEN NLSQLTEQEINLSWFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSSENGVDFNKN TALDKNYLLNKNIPSNNVEEAGSKNYVHYIQLQGGDISYEATCNLFSK NPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFI GHGKDEFNTSEFARLSVDSLNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGCNMFS YDFNVEETYPGKLLL SIMDKITS TLPD VNKN SITIGANQYEV RINSEGRKE LLAHS GK WINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLASIEDI KTL LLDASVSPDTK FILN NLKLNIESSIGDYTYEYKLEPVKNIIHNSIDDLI DEFNLLENVSDLE YELKLNLDLDEKYLISFEDISKNNSTYSRVFNKSNNG ESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNIQLDHTSQVNT LNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLY AQLFSTGLNTIYDSIQLV NLISNAVNDTINVLPTITTEGPIVSTILDGINLGAAIKELLDHDP LLLKKELE AKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAGISAGIPSLVNNELIL HDKATS VVNYFNHLSSESKYGPLKTEDDKILVPIDDLVISEIDFNNSIKL GTCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIPSLSIYSAIGIETENLDFSK KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGTRLLDSIRDLYPGKFYWR FYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDKDRNFIMPTITTTNEIRNKL SYSD GAGGTYSLLLSSYPISNTINLSKDDLWIFNIDNEVREISIEGNTIKKGLIK DVL SKIDINKNKL IIGNQTIDFSGDIDNKDRYIFLTCELDDKISLIIEINLVA KSYSLLSGDKNYLISNL SNIEKINTLGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAI SKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNDSTLEFN SKDFAEDINVMKDDINTITG KYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYL NESVYSSYLD FVKNSDGH HN TSNFMNLF LDNISFWKLF GFENIN FVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDN NKNIDYFGEWK TSSSKSTIFSGNGRN VVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYE PLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNI NLDSSSFYK WSTEGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSI DFKDIK KLSLGYIMSNFKSFNSENELDRDHLGFKIIDNKTY YDEDSKLV KGLININNSLFYFDPIEFNLVTGWQTINGKKYYFDINTGAAALISYKIINGK HFYFNNDGVMQLGVFKGPDGFYFAPANTQNNNIEGQAIYVQSKFLT NGKKYYFDNDSKAVTGWRINNEKY YFNPNNAIAVGLQVIDNNKY YF NPDTAIIKSGWQTVNGSRYYFDTDTAIAFNGYK TIDGKH FYFSDCVVK IGVFSTSGFEYFAPANTYNNNIEGQAIYVQSKFLTNGKKYYFDNNSK</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
		<p>aacatgffcattagttgaaactgaaggagatfcttcttattagatgataaaaatgatgccacaagatgatttagta taicagaaaatagatttaataataatcaatagtttaggtaaatgtgaaactggagaatggaaagtggttcaggtcat actgtaactgatgatagatcactctttcagcaccatcaataacatagagagccacacttatctatatatgacgta ttgaaagtacaaaagaagaacttgatttgcataaagattaatggtaactaatgctccaaatagagatttgcctg ggaaaacaggatggacaccaggttlaagaaagcttagaaaalagatggcacaacactgttagaccgtataagagataa ctatgaaggtagttttatggagatatttgcctttatagctgatgcttataaacacattaaaaccaagatagaagat actaatataagaataaatttagatagtaactagaagttttagatgccaaataaactacagaataataagaagaaa attatcatattcttctatggttcaggaggaacttatgcttctcttctcaatataatgggtataaatatagaaltaag lgaaaglgatgllggallalagatgllgataalgllgagagatglaactatagaatcigtataaaallaaaaagtg afttaatagaaggtattttctacactaagattgaagagaataaaattatctaaatagccatgagattatcttctggt gagtaaalggaaaglaatggatttcttcaactttcaattttagaaggaataaatgcaattatagaaggtgatttall atctaaatcataaaattacttattctggcgaatlaaaaatattgatgtaaatcacaatcattcaacagaaaatagatt atataggattcaatagcgaattacagaaaaatataccatagcttttagatagtgaaagaaaagagaatggtttat taatggttcaacaaaagaaggttalltlatcgaatlacctgatgtagtcttataaglaaggtttataggatgatg aagccttcaattggataatfatagtaataattgaaagatgcaaaagttalaactaaagataatgtaataatataacaggt attatctaaagatgataaaaaatctcttcttctgactctacaagatgaaaaactataaagtaaatagtgctgca agatgaaagtgagtagctgagatttgaagttcaatgaatagaagggtaalacaactctcagatcttllaatgagc ttttagaagatgaaatataaaagatttctgtaattcttacaactaataaattatattatagactaatttataat aagtggtactactctattggccaattgagtttatttggatgaaaaatgataatatacaccataattcattaaagttata cactagaactaataatatactttatagtagaaatagacaaaatagatagtgaaacaaatgatgattagatgattctg gagatatacttcaactgttatcaattctctcaaaagtatctttatggaatgacaggttggttaataaagttgtaattca ccaaatfatacagatgaaataaataaacgctgtatagaacaataaataactatccagaagttattgatttagat gcaaatatataaatgaaaaataaagttlaalatcaatgatctatctatcagatgtagggagtaatgatgglaatgat tttattctatgcaactagtgaaagaaaataaggtgtcacaagttaaaataagattcgttaattggtttaaagataagact tggcaaaatagctatctttaaactttatgataaacaagatgtacctgtaagtgaataatcttatcatctacacctcata ttatgaggatggattggtctatgattggcttagttcttllalataatgagaatlltalataaactllggaatgat gglatctggattataatattatgattcattatatttttaaccaccagtaataaattgataactggatttggactgt aggcgatgataaactacttfaatccaatlaattggtgggctgcttcaattggagagacataatgatgacaaaaat tattattcaacaaaagtgaggtgtacaacaggtgatttagtacagaagatggattaaatattttgccccagctaat acacttgatgaaaaccatagaaggaagcaallgatttactggaaaatlaatttagcgaataatlltattllttagat gataattatagggagctgtagaatggaagaatagatggtgaaatgcaactatttagccagaaaacaggttaaagc tttaaggtctaaatcaaataggtgattataaactatttcaatcigtggagattgacaaaaggaattttagatata aatgataataaacactatttgatgattctggtgtatgaaagtaggttactactgaaatagatggcaagcattctacttt gctganaacggagaaatgcaaataggagatlllaalacagaagatgattlaaalattllgctcatataatgaagatt taggaaatgaagaaggggaagaaatcatalctgglatatlaaalltcaataaataaattactattttagatgattcatt acagctgtattggatggaaagatttagaggatggttcaaaatattttagatgaaatagacagagaagcalatala ggtttgcattataaataatgagtcataatfattaatgatgagatgcaatgcaagttggatttgcactataaataa agcttctactctctgactctggaattatagaactggagtacaaaacatagatgacaatttcttatatagatgataa gglatagttcaaatgggttattgatactcagatggatataaataatttgcacctgctaactgtaaatgalaatatt cggacaagcagttgaatataagtttagtttagagttggtagaatgataattttggagaacatatacaatggaga ctggatgataatagatggaatgaaagtataaatattttcaatccagaacataaaaaagcatgcaaaaggtat tattacttlaatgagaatggtaaatgcaattggllatataaatatagaagataagatgcttatttggtagaatgg gtcatgagattgagatttaaacaccagatggatttaataactttgcacatcaaaactttggatgagaattttag ggagaatcaataaactactggttggtagatttagatgaaaagagatatttattacagatgaaatattgacgcaac tggttcagttatttagatgtaggagattattttagctctgatacactcaatattgatttagtaag</p>
<p>Secuencia de aminoácidos de <i>trdB</i> (cepa 630)</p>	<p>8</p>	<p>MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEYHNMSENTVVEKYL KLKDINSLTDIYIDTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLBLKNNLTPVEK NLHFVWIGGQINDTAINYINQWKDVNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKT VVESAINDTLESFRENLNDPRFDYKFFRKRMEIHYDKQKNFINYYKAQR EENPELIIDDIVKTYLSNEYSKIDELENTYIEESLNKIQNSGNDVRNFEFF KNGESFNLYEQELVERWNLAAA SDILRISALKEIGGMYLVDMLPGIQP DLFESIEK PSSVTVDFWEMTKLEAIMK YKEYIPEY TSEHFDMLDEEVQSS FESV LASKSDKSEIFSSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSN LIVKQIENRYKILNNSLNP AISEDNDFNTTNTNFIDSIMAEANADNGRFM MELGKYLRVGFPPDVKTINLSGPEAYAAAYQDLLMFKEGSMNIHLIEA</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
		<p>DLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNYFEGSLGE DDNLDFSQNIIVVDKEYLLEKISSLARSSERYTHYIVQLQGDKISYEAAC NLFKTPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPNGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIK LTFIGHGKDEFNTDIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCN MFSYSINVEETYPGKLLKVKDKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRLINSEG RRELLDHSGEWINKEESIIKDISKEYISFNPKNENKITVKSKNLPELSTLLQ EIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEERIEEAKNLTSDSINYI KDEFKLIESISDALCDLKQQNELEDSESHFISFEDISETDEGFSIRFINKETGES IFVETEKIFSEYANHITTEEISKIKGTIFDTVNGKLKKNLNDTTHEVNTL NAFFIQSLIEYNSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNITTDAAKVVE LVSTALDEIDLLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLROEIA KIGIMAVNLTTATTAITSSSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRD KATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLDDKIMMPQDDL VISEIDFNNNSIVL GKCEIWRMEGGSGHTVTDIDHFFSAPSITYREPHLSIYDVLEVQKEELD LSKDLMVLPNAPNRVFAWETGWTPGLRSLENDGTKLLDRIRDNYEGEF YWRYFAFIADALITLKPREDTNRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYS FYGSGGTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVIIESDKIKKG DLIEGILSTLSIENKIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIIIEVD LLSKSYKLLISGELKILMLNSNHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEK ENGFINGSTKEGLFVSELPDVVLISKVYMDDSKPSFGYYSNNLKDVKIT KDNVNILTYGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLSNVHLDESQVAEILKFMN RKGNTNTSDSLMSFLESMNIK SIFVNFQLSNIKFILDFANFIISGTTTSIQFEE ICDEENDNIQPYFIKFNLTETNYTLVYGNRQNMIVEPNYDLDSDSGDISSTVI NFSQKYLIDSCVNKVVISPNIYDEINIPVYETNNTYPEVIVLDANYSI NEKINVNINDLSIRYVWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKT LANKLSFNFSQKQDVPVSEIILSFTPSY YEDGLIGYDLGLVSLYNEKFIIN NFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASI GETIIDDKNYFNGQSVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFT GKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDY KYFFNSDQVMQKGFVINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFAEN GEMQIGVFNTEGFKYFAHNNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDS FTA VVGWLDLEDGSKY YFDEDTAEAYIGLSLINDGQY YFNDDGIMQVY FVTINDK VYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYK YF APANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWYDMENES DKYYFNPETKACKGINLIDDIKY YFDEK GIMRTGLISFENNNY YFNENG EMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEG ESINYTGWLDLDEKRY YFTDEY IAAATGSVIIDGEEY YFDPDTAQL VISE</p>
Cebador directo	9	caccACTAGTatgaacttagtaactggatggc
Cebador inverso	10	CTCGAGttagccatataatcccaggggc
Cebador directo	11	caccATGCATatgagtttagtaataagaaaacag
Cebador inverso	12	ggcCTCGAGctattcactaatcactaattgagc
Cebador directo	13	AGATCTATGCATGAGCTCctcgagcccaaaaacgaaaggctcagc
Cebador inverso	14	cggtcggggccatataatcccaggggctttactcc
Cebador directo	15	caccCCATTGatggtaacaggagatttaaagga
Cebador inverso	16	CTCGAGctattcactaatcactaattgagctg
C-TADCTB (secuencia de ácidos nucleicos)	17	<p>atggtaacaggagatttaaaggacctaatggattgagattttgcacctgctaatacacaataataacatagaag gtcaggctatagttaccagaacaaatcttaacttgaatggcaaaaaatattattttgataatgactcaaaaagcagtta ctggatggcaaacattgatgglaaaaaatattacttlaacttlaaacactgctgaagcagctactgagtgcaaacat tgatggtaaaaaatattacttlaacttlaaacactgctgaagcagctactgagtgcaaacattgatggtaaaaaatatt acttlaactaactaacttcatagcctcaactggllatacaaglattaaaggtaaacattttatttlaactgatggatta tgcagataggagtttaaaggacctaatggattgaatactttgcacctgctaatacggatgtaacaacatagaag gtaaacattacttaccataataatcttaacttgaatggtaaaaaatattacttggtagtgactcaaaaagcagtta ccggactgcgaactattgatggtaaaaaatattacttlaactaactgcttggcagttactggatggcaaacatt aatggtaaaaaatattacttlaactaacttctatagcttcaactggitatacaattattagtgtaaacattttattt aatactgatggattatgcagataggagtttaaaggacctgatggattgaatactttgcacctgctaatacagatg</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
		<p>ctaacaatagaaggtcaagctatacgttatcaaaatagattcctatatattacatgacaatataatttttggtaaat lcaaaaagcggctactggllggglaactallfagggtaatagatattactlccagcctaatacagctatgggicgcaat ggllataaaactaligataalaaaaallttactlltagaaatgglltaccicagataggagtglltaaaagggictaatggat ttgaatactttgacactgctaatacggatgctaacaatagaaggtcaagctatatacaaaatagattcctacat ttactlggaaaaatatactttggtaataaitcaaaagcagttactggatggcaaacctattaatggtaaaagtataact ttatgccctgatactgctatggctgcagctggggacttttcgagatlgatgggttatataattctttgggtggatggagt aaaagccccctgggatataatggcAGATCTATGCA Taatttgataactggatttggactgtaggcagatgata aatactactttaatccaatgaatggggagctgctcaattggagagacaataatlgacaaaaattattattcaacc aaagtggagtgltacaaacaggtgalttagtacagaagatggattfaaatatttggccccagctaatacactgatga aaacctagaagagagaaagcaatggatttactggaaaatfaatttagcagaaaatattatttttagatataatataga ggagctgtgaatggaaagaatagatggtaaatgcactatttagccccagaacaggttaaagcttttaagggct aaalcaaataggllgallataaatactallcaallctgatggagllalgcaaaaaggalllgltaglalaalgaalaalaa acactattltagatctgggttagaaagtaggttacactgaaaatagatggcaagcattlctactllgctgaaaacg gagaatgcaaalaggatlltaatacagaagatggatlaaatattlctcatcataatgaagalltaggaatga agaaggtgaagaaatctcatattctgtatataaaattcaataaaaaattactatttttagatcattaccagctgtag ttggatggaaagatttagagggatggfcaaaatattttgatgaagatacagcagaagcatatagtttgcactta ataaatgatggcaaatattttatgatgatgaaatagcaagttggalltgcactataaatgataaagctctactt ctctgactcggaaatagaatcggagtaaaaaacatagatgacaattattctataatagatgataatgggtatattca aattgggtattgatacttcagatggatataaatatttgcacctgctaactgtaaatgataatattacggacaangca gtlgaatagtggtlltagtaggtggggaagatglatattattltaggagaacataatacaatggagactggatggat atatgataggaaaatgaaatgataaatattttcaatccagaacataaaaaagcatgcaaaaggtataatttaattg atgataaaaaatattttgatgagaagggcataatgagaacgggcttatatcatttgaaaaataaatattactttaa tgagaatgggtgaaatgcaalltggatataaataatagaagataagatgctctattttggtagaagatggtlcatgcaga ttggagttaataacaccagatggatttaatactttgcacataaaatactlggatgagaatlltagggagaatca ataaactatactggtggtagatttagatgaaaagagatattttacagatgaatattttgcagcaactggtcagtt attltaglgtgaggatattttgatcctgatacagctcaatlagttagtgaactCGAGggatlaatalat attaatgattcattatatttttaaacaccagtaaaatatttgataactggatttggactgtaggcagatgataaatacta ctllaatccaattaaagggtggagctgctcaattggagagacaataatlgatgacaaaaattattllcaaccaagtg gagtgltacaacagggttagtagtacagaagatggatlaaatattttggccccagctaatacactgatgaaaacct gaaggagaagcaatgattttactggaaaatfaatttagcagaaaatattatttttagatataatagaggagct gtagaatggaaagaatagatggtaaatgcactatttagccccagaacaggttaaagcttttaagggictaaatcaa ataggtgatataaatactallcaallctgatggagllalgcaaaaaggalllgltaglalaalgaataaanaactatt ttgatgattcgggttatgaaagtaggttacactgaaatagatggcaagcatttctactttgctgaaaacggagaat gcaaataggatlltaatacagaagatggattaaatatttgcctcatataatgaagatttagaaatgaagaaggt gaagaaatctcalactctgtatallaaallcaataaaaaallactalltagatcattaccagctgtagltaggaggg aaagatttagagatgggtcaaaatattttgatgaagatacagcagaagcatatagtttgcattaataaatga lgtcaatallattltagatgagaatllgcaagllggalltgcactataaatgataaagctlctactctctgact ctgaaatatagaatcggaglacaaaaacatagatgacaattttctataatagataatggatgtagtcaaatgggtg tatttgatactcagatggatataaatatttgcacctgctaactgtaaatgataatattaccgacaagcagttgaata tagtgggttagtaggtggggaagatglatattattltaggagaacataatacaatlgagactggatgatatatgalat ggaaaatgaagtgataaataattttcaatccagaacataaaaaagcatgcaaaaggtattaatlaaitgatgatataa aatattatttgatgagaagggcataatgagaacgggcttatatcattgaaaaataaatattacttttaatgagaatg lgaatgcaalltggatataaataatagaagataagatgllctattttggtagaagatggtlcatgcagatlgagatla ttaatacaccagatggatttaatactttgcacataaaatactlggatgagaatlltagggagaatcaataaactat actggtggtagatttagatgaaaagagatattttacagatgaatattttgcagcaactggtcagttatttagt gtgaggatattattttgatcctgatacagctcaattagtgatttagaagat</p>
C-TADCTB (secuencia de aminoácidos)	18	<p>MVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAIYVQNKFLTLNGKKYYFDN DSKAVTGWQIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEA TGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGTYSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPN GFYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTI DGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASGTYIISGKHFYF NTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIY YFGNNSKAATGWVTDGNRYFEPNTAMGANGYKLTIDNKIFYFRNGLP QIGVFKGSNGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYFGNNS KAVTGWQTINGKYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGI YGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPIINGGAASIGETIIDDKNYFNFQSGV</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
		<p>LQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYR GAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQGIDYKYFNSDGVMMQKGFV SINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYFDDSFYVVGWVKDLEDGSK YFDEDTAEA YIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGII ESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDDGKYFAPANTVNDNIYQAV EYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWYDMENESDKYYFNPETKKACKGI NLIDDIKYFDEKGIMRTGLISFENNNYFNENGENMQFGYINIEDKMFYF GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRY YFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISELEGLIYINDSLYFKPPV NNLITGFVTVGDDKYFNPINGGAASIGETIIDDKNYFNQSGVRLQTVFV STEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGA VEW KELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQGIDYKYFNSDGVMMQKGFVNSINDK HYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNE DLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYFDDSFYVVGWVKDLEDGSKYFDEDT TAEA YIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNI DDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDDGKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVR VGEDVYFGETYTIETGWYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIK YFDEKGIMRTGLISFENNNYFNENGENMQFGYINIEDKMFYFGEDGV MQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRY YFTDE YIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE</p>
C-TANCTB (secuencia de ácidos nucleicos)	19	<p>atgtaacagagagatttaaaggacctaatggattgagattttgcacctgctaatactcacaataataacatagaag gtcaggctatagllaccagaacaaallctlaaclllgaalgcaaaaaatalllllialaalgaactcaaaagcaglla ctggatggcaaacattgatgtaaaaaatattactttaacttaaacactgctgaacagactactggatgcaaacattgatgtaaaaaatatt tgatgtaaaaaatattactttaacttaaacactgctgaacagcactactggatgcaaacattgatgtaaaaaatatt actttaactaactcttcatagcctcaactggttatacaagattaatgtaaacattttattttaactgatggtatta lgcagataggaglltaaaaggacctaattgallgaactllgcacctgctaatacggatgctaacaacatagaag glcaagctalactlaccaaaataaallctlaaclllgaalgtaaaaaatallactllgtaglgaactcaaaagcaglla ccggactgcgaactattgatgtaaaaaatattactttaactaactgctgllgcagllactggatgcaaacatt aatgtaaaaaatattactttaactaactctatagcttcaactggttatacaatattatgtaaacatttttttt aactactgatgattatgcagatagagattgtaaaaggacctgatgattgaactttgcacctgctaatacagatg ctaacaatatagaaggctcaagctatagcttcaaacatagctctatattacatgacaatatattattttgtaataat tcaaaaaggcactggtgggtaactattgatgtaataagatattacttcgagcctaatacagctatgggagcaat ggllataaaaactatgataaiaaaaalllactllagaatgglltaccagatagagattgtaaaaggcctaattggat ttgaalactllgcacctgctaatacggatgtaacaatatagaaggcaagctalactlltaaaaatagattcctacal ttactggaaaatataactttggtaataatcaaaagcagttactggatgcaaacattatattgtaaaatataact ttatgctgatactgctatggctgcagctggggaactllcagatllgatggtllalattllctllggtllgatggat aaaaagccctgggataatggcAGATCTATGCA Taattgataactggattgtgactgtaggcagataga aataactactttaatccaatattgtaggagctgctcaattggagagacaataattgatgcaaaaaattattttaacc aaagtggagtgtaacaacaggtgatttagtacagaagatggatttaaatatttccccagctaatacactgatga aaacclagaaggagaagcaattgalltactggaaaatlaattllgacgaaaatalllallllgatgataallataga ggagctgagaatggaagaatlagatggllgaatgcaactalltagccagaacaaggtaaaagctllaaaggct aatcaaatagggtattataaactattcaactctgatggagttatgcaaaaaggattggtatataaatgataataa acactattttgatgattctggtttatgaagtaggttacactgaaatagatggcaagcatttactttctgtaaaagc gagaalgaatagagattlltaacagaagatggalltaaatatttgcctacalaaatgagaatllagaaatga agaagggaagaatcicalactllctglalalaaallcaataalaaaalllactallllgatgallcatllacagctgag ttgatggaagatttagagagattcaaaagtattttgatgaagatacagcagaagcatatataaggttgcaltta aaaaatgatggicaatattallltaagatgaggaatllgcaagllgattllgactataaatgataaaagctctact ctctgacictggaattatagaactggagtaacaacatagatgacaattattctatataagatgataatggtatagttca aattggtatttgatactcagatgataataatatttgcacctgctaatactgtaaatgataatatttacggacaagca gllgaalataaglltaglltagagllggggaagatglatattlllgagaacaalatacaatllgagactggatgat atatgatafgaaaatgaaagatgataaataatttcaatccagaactaaaaagcatgcaaaaggtatfaatttaattg atgalataaaaatattttgatgagaaggcataatgagaacgggcttatactttgaaaaataaattactlltaa tgagaatggtaaatgcaattggttatataaataatagaagataagatttctattllggtaagatggtgicactgaga ttgagatttaataccagatgatttaaaccttgcacatcaaaactttggatgagaattttgaggagaatca ataactatactggtgllagalltagatgaaaagagatalllltacagatgaaatattgcagcaactggttcagtt</p>

Nombre	SEC ID NOs:	Secuencias
		<p>attattgatggtaggagattattttgatcctgatacagctcaattagtgattagtgaaCTCGAGggattaatatata ataatgattcattatatttttaaaccaccagtaataatttgataactggatttgactgtaggcgatgataaacta cttaataccaattaatggtaggagctctcaattggagagacaataatgatgacaaaaattatttcaaccaaaagt gtaggttacaacagggtatttagtacagaagatggattaaatatttggcccagctaatacacttgatgaaaaccta gaaggagaagcaattgatttactggaaaatlaatttagcggaaaatattattttgatgalaattalagaggagct gtagaatggaaaagaattagatggtagaatgcactatttagcccagaacaggtaaagcttttaaaggctaaatcaa ataggtgattataaatactattcaaffctgatggagttatgcaaaaaggattttagtataaatgataaataaacactatt ttgatgattctgggttatgaaagtaggttacactgaaatagatggcaagcatttclactttgctgaaaacggagaaat gcaaataggagatttaatacagaagatggattaaatatttgcctcatcataatgaagatttaggaaatgaagaaggt gaagaaatcctatattct</p>
C-TANCTB (secuencia de aminoácidos)	20	<p>MVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNNIEGQAIIVYQNKFLTLNGKKYYFDN DSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAA TGWQTIDGKKYYFNTNFIASSTGYTSINGKHFYFNTDGMQIGVFKGPN GFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTI DGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIASSTGYTIISGKHFYF NTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIY YFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTIIDNKNFYFRNGLP QIGVFKGSDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNS KAVTGWQTINGKVYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVPKAPI YGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPNINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGV LQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYR GAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMMQKGFV SINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY FAHHNEDLGNEEGEISYSGILNFNKIYYFDDSFATAVVGWLDLEDGSK YFDEDTAEA YIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGII ESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSYGKYFAPANTVNDNIYQAV EYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGI NLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGENMFGYINIEDKMFYF GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRY YFTDEYIAATGSVIIDGEEY YFDPDTAQLVISELEGLIYINDSLY YFKPPV NNLITGFVTVGDDKYYFNPNINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVF STEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGA VEW KELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMMQKGFVSINDNK HYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNE DLGNEEGEISYS</p>

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Intercell AG Intercell USA, Inc.	
	<120> Polipéptido aislado de las proteínas toxina A y toxina B de <i>C. Difficile</i> y sus usos.	
	<130> ICP091/PCT	
10	<150> US 61/379,892 <151> 03-09-2010	
	<160> 20	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1 <211> 2877 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> ADN de fusión de C-TAB.G5 ADN	
25	<400> 1	
	atggtaaacag gagtatttaa aggacctaata ggatttgagt attttgcacc tgctaataact	60
	cacaataata acatagaagg tcaggctata gtttaccaga acaaattctt aactttgaat	120
	ggcaaaaaat attattttga taatgactca aaagcagtta ctggatggca aaccattgat	180
	ggtaaaaaat attactttaa tcttaacact gctgaagcag ctactggatg gcaaactatt	240
	gatggtaaaa aatattactt taatcttaac actgctgaag cagctactgg atggcaaact	300
	attgatggta aaaaatatta ctttaataact aacactttca tagcctcaac tggttataca	360
	agtattaatg gtaaacattt ttattttaat actgatggta ttatgcagat aggagtgttt	420
	aaaggaccta atggatttga atactttgca cctgctaata ctcataataa caacatagaa	480
	ggtcaagcta tactttacca aaataaattc ttaactttga atggtaaaaa atattacttt	540
	ggtagtgact caaaagcagt taccggattg cgaactattg atggtaaaaa atattacttt	600
	aatactaaca ctgctgttgc agttactgga tggcaaaacta ttaatggtaa aaaatactac	660
	tttaatacta acacttctat agcttcaact ggttatacaa ttattagtgg taaacatfff	720
	tattttaata ctgatggat tatgcagata ggagtgttta aaggacctga tggatttgaa	780
	tactttgcac ctgctaatac agatgctaac aatatagaag gtcaagctat acgttatcaa	840
	aatagattcc tatatttaca tgacaatata tattatfff gtaataattc aaaagcagct	900
	actggtggg taactattga tggtaataga tattacttcg agcctaatac agctatgggt	960
	gcgaatggtt ataaaactat tgataataaa aatfffact ttagaaatgg tttacctcag	1020
	ataggagtgt ttaaagggtc taatggattt gaactacttg cacctgctaa tacggatgct	1080
	aacaatatag aaggtcaagc tatacgttat caaaatagat tctacattt acttggaaaa	1140

ES 2 631 032 T3

atatattact ttggaataa ttcaaaagca gttactggat ggcaaaactat taatggtaaa 1200
 gtatattact ttatgcctga tactgctatg gctgcagctg gtggactttt cgagattgat 1260
 ggtgttatat atttctttgg tgttgatgga gtaaaagccc ctgggatata tggcagatct 1320
 atgcataatt tgataactgg atttgtgact gtaggcgatg ataaatacta ctttaatcca 1380
 attaatggtg gagctgcttc aattggagag acaataattg atgacaaaaa ttattatttc 1440
 aaccaaagtg gagtgttaca aacaggtgta tttagtagag aagatggatt taaatatttt 1500
 gccccagcta atacacttga tgaaaaccta gaaggagaag caattgattt tactggaaaa 1560
 ttaattattg acgaaaatat ttattatttt gatgataatt atagaggagc tgtagaatgg 1620
 aaagaattag atggtgaaat gcactatttt agcccagaaa caggtaaagc ttttaaagg 1680
 ctaaataaaa taggtgatta taaatactat ttcaattctg atggagtatt gcaaaaagga 1740
 tttgttagta taaatgataa taaacactat tttgatgatt ctggtgttat gaaagtaggt 1800
 tacactgaaa tagatggcaa gcatttctac tttgctgaaa acggagaaat gcaaatagga 1860
 gtatttaata cagaagatgg atttaaatat tttgctcatc ataataaga tttaggaat 1920
 gaagaaggtg aagaaatctc atattctggt atattaaatt tcaataataa aatttactat 1980
 tttgatgatt catttacagc tgtagttgga tggaaagatt tagaggatgg ttcaaagtat 2040
 tattttgatg aagatacagc agaagcatat ataggtttgt cattaataaa tgatggtaaa 2100
 tattatttta atgatgatgg aattatgcaa gttggatttg tcaactataaa tgataaagtc 2160
 ttctacttct ctgactctgg aattatagaa tctggagtac aaaacataga tgacaattat 2220
 ttctatatag atgataatgg tatagttcaa attggtgat ttgatacttc agatggatat 2280
 aatattttg cacctgctaa tactgtaaat gataatattt acggacaagc agttgaatat 2340
 agtggtttag ttagagttgg ggaagatgta tattattttg gagaaacata tacaattgag 2400
 actggatgga tatatgatat ggaaaatgaa agtgataaat attatttcaa tccagaaact 2460
 aaaaaagcat gcaaaggtat taatttaatt gatgatataa aatattattt tgatgagaag 2520
 ggcataatga gaacgggtct tatatcattt gaaaataata attattactt taatgagaat 2580
 ggtgaaatgc aatttgggta tataaatata gaagataaga tgttctattt tggggaagat 2640
 ggtgtcatgc agattggagt atttaataca ccagatggat ttaaatactt tgcacatcaa 2700
 aatactttgg atgagaattt tgaggagaa tcaataaact atactggttg gttagattta 2760
 gatgaaaaga gatattattt tacagatgaa tatattgcag caactgggtc agttattatt 2820
 gatggtgagg agtattattt tgatcctgat acagctcaat tagtgattag tgaatag 2877

<210> 2
 <211> 958
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de C-TAB.G5

10

<400> 2

ES 2 631 032 T3

Met Val Thr Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala
 1 5 10 15

Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr
 20 25 30

Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn
 35 40 45

Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr
 50 55 60

Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile
 65 70 75 80

Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr
 85 90 95

Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr
 100 105 110

Phe Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr
 115 120 125

Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn
 130 135 140

Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu
 145 150 155 160

Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys
 165 170 175

Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu Arg Thr
 180 185 190

Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Val Ala Val
 195 200 205

Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn
 210 215 220

ES 2 631 032 T3

Thr Ser Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Ser Gly Lys His Phe
 225 230 235 240
 Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro
 245 250 255
 Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile
 260 265 270
 Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu Tyr Leu His Asp
 275 280 285
 Asn Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Ala Thr Gly Trp Val
 290 295 300
 Thr Ile Asp Gly Asn Arg Tyr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ala Met Gly
 305 310 315 320
 Ala Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Asn Lys Asn Phe Tyr Phe Arg Asn
 325 330 335
 Gly Leu Pro Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Ser Asn Gly Phe Glu Tyr
 340 345 350
 Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile
 355 360 365
 Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr Tyr Phe
 370 375 380
 Gly Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys
 385 390 395 400
 Val Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu
 405 410 415
 Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val Lys
 420 425 430
 Ala Pro Gly Ile Tyr Gly Arg Ser Met His Asn Leu Ile Thr Gly Phe
 435 440 445
 Val Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly
 450 455 460
 Ala Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe
 465 470 475 480

ES 2 631 032 T3

Asn Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly
 485 490 495
 Phe Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly
 500 505 510
 Glu Ala Ile Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr
 515 520 525
 Tyr Phe Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp
 530 535 540
 Gly Glu Met His Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly
 545 550 555 560
 Leu Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly Val
 565 570 575
 Met Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr Phe Asp
 580 585 590
 Asp Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp Gly Lys His
 595 600 605
 Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr
 610 615 620
 Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn Glu Asp Leu Gly Asn
 625 630 635 640
 Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Leu Asn Phe Asn Asn
 645 650 655
 Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe Thr Ala Val Val Gly Trp Lys
 660 665 670
 Asp Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Asp Thr Ala Glu
 675 680 685
 Ala Tyr Ile Gly Leu Ser Leu Ile Asn Asp Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn
 690 695 700
 Asp Asp Gly Ile Met Gln Val Gly Phe Val Thr Ile Asn Asp Lys Val
 705 710 715 720
 Phe Tyr Phe Ser Asp Ser Gly Ile Ile Glu Ser Gly Val Gln Asn Ile
 725 730 735

ES 2 631 032 T3

Asp Asp Asn Tyr Phe Tyr Ile Asp Asp Asn Gly Ile Val Gln Ile Gly
740 745 750

Val Phe Asp Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr
755 760 765

Val Asn Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val Glu Tyr Ser Gly Leu Val
770 775 780

Arg Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly Glu Thr Tyr Thr Ile Glu
785 790 795 800

Thr Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu Ser Asp Lys Tyr Tyr Phe
805 810 815

Asn Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly Ile Asn Leu Ile Asp Asp
820 825 830

Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr Gly Leu Ile
835 840 845

Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn Gly Glu Met Gln
850 855 860

Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe Tyr Phe Gly Glu Asp
865 870 875 880

Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr Pro Asp Gly Phe Lys Tyr
885 890 895

Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu Asn Phe Glu Gly Glu Ser Ile
900 905 910

Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr
915 920 925

Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu
930 935 940

Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu
945 950 955

<210> 3
<211> 2885
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> ADN de fusión de C-TAB.G5.1

<400> 3

ES 2 631 032 T3

ccatggttac aggtgtttcc aaaggtccga acggctttga atatthttgca cgggcaaata 60
 cccacaataa taatattgaa ggccaggcca tctgtatca gaataaattt ctgacctga 120
 acggcaaaaa atactatttc gataacgata gcaaagcagt taccggttgg caaacattg 180
 atggcaaaaa atattacttc aacctgaata ccgcagaagc agcaaccggc tggcagacga 240
 tgcacggtaa aaagtactat tttaacctga acacagccga agccgctaca ggctggcaga 300
 caatagatgg gaagaagtat tttttaata ccaatacctt tattgccagc accggctata 360
 ccagcattaa tggcaaacac ttctatttta acaccgatgg tattatgcag atcgggtgtg 420
 ttaagggccc taatggtttt gagtacttcc ctccggctaa taccgatgca aataacatcg 480
 aaggtcaggg aattctgtac cagaacaaat ttttaacgct gaacggtaag aaatattact 540
 ttggtagcga ttcaaaagcc gttaccggtc tgcgtacgat cgacggcaag aaatattatt 600
 tcaatacaaa caccgcagtt gccgtgacag gttggcagac gataaatggt aagaagtact 660
 acttcaaac caataccagc attgcaagta ccggttatac cattatcagc ggcaaacact 720
 tttacttcaa tacagacggc attatgcaga ttggcgtttt caaaggctcc gatggtttcc 780
 agtactttgc ccctgcaaat acagatgcaa acaatattga gggacaggca attcgtatc 840
 agaatcgttt tctgtatctg cacgataaca tctattactt cggcaataat tcaaaagcag 900
 ccaccggttg ggttacaatt gatggtaatc gttattactt tgagccgaat accgcaatgg 960
 gtgcaaatgg ttataaaacc atcgataaca aaaatthttt tttccgcaac ggtctgccgc 1020
 agattggtgt tthtaagggg agcaatggct tccagatatt tgcgccagcc aacaccgatg 1080
 ccaacaacat tgaaggccaa gogattcgtt atcaaaaccg ctttctgcat ctgctgggca 1140
 aaatttatta ctttggcaac aatagcaaag cgggtgacggg ctggcaaac attaacggta 1200
 aagtttatta tttcatgccg gataccgcta tggcagcagc cgggtggtctg tttgaaattg 1260
 atggcgtgat ttatthttttt ggcgtggatg gtgttaaagc accgggtatt tatggtcgta 1320
 gcatgcataa tctgattacc ggtthttgta ccgtgggcca cgataaatac tactthaatc 1380
 cgattaatgg tgggtgcagca agcattggtg aaaccattat cgatgacaaa aactattatt 1440
 ttaaccagag cgggtgttctg cagacaggtg tthttagcac cgaagatggc ttcaaatatt 1500
 ttgctcctgc gaatacactg gatgaaaatc tgggaaggtga agcaattgat tttaccggca 1560
 aactgatcat cgacgagaac atctactatt ttgatgataa ttatcgcggt gccgtggaat 1620
 ggaaagaact ggatggtgaa atgcactatt ttagtccgga aaccggtaaa gcctthaaag 1680
 gtctgaatca gatcggcgat tacaagtatt actthaatc agatggcgtg atgcagaaag 1740
 gctthgtgag cattaacgac aacaacact atthtgacga cagcgggtgt atgaaagtgg 1800

ES 2 631 032 T3

gttataccga aatcgacggg aaacattttt attttgccga aaacggcga atgcagattg 1860
gagtatttaa taccgaggac ggctttaaat actttgccca tcataatgaa gatctgggta 1920
atgaagaagg cgaagaaatt agctatagcg gcattctgaa ttttaataac aagatctatt 1980
atctcgatga tagcttcacc gcagttgttg gttgaaaga tctggaagat ggcagcaaat 2040
attattttga tgaagatacc gcagaggcct atattggtct gagoctgatt aatgatggcc 2100
agtattattht caacgatgat ggtatcatgc aggttggttt tgtgaccatc aacgataaag 2160
tgttctattht cagcgatagc ggcattattg aaagcgggtg tcagaacatc gacgataact 2220
atctctacat cgatgataac ggtattgttc agattggcgt gtttgatacc tccgatggtt 2280
ataaatattht cgcaccagcc aataccgtga acgataatat ttatggtcag gcagttgaat 2340
atcaggtct ggttcgtggt ggcgaagatg tttattattht tggcgaacc tataccattg 2400
aaaccggctg gatctatgat atggaaaacg agagcgacaa gtactattht aatccggaaa 2460
cgaaaaaagc ctgcaaaggc attaactctga tcgacgatat taagtactac tttgacgaaa 2520
aaggcattat gcgtaccggt ctgattagct ttgagaacaa caactattac ttcaatgaga 2580
acggtgagat gcagtttggc tatatcaaca tcgaggacaa aatgttttat tttggtgagg 2640
acggtgtgat gcagataggg gtttttaata caccggatgg gtttaagtat tttgcacatc 2700
agaacaccct ggatgaaaac tttgaaggcg aaagcattaa ttataccggt tggctggatc 2760
tggatgagaa acgttattat ttcaccgacg aatacattgc agcaaccggt agcgttatta 2820
ttgatggtga ggaatattac ttcgatccgg atacagcaca gctggttatt agcgaataac 2880
tcgag 2885

<210> 4
<211> 957
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Proteína de fusión de C-TAB.G5.1

<400> 4
Val Thr Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro
1 5 10 15
Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln
20 25 30
Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn Asp
35 40 45
Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr

ES 2 631 032 T3

Ile Asp Gly Asn Arg Tyr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ala Met Gly Ala
 305 310 315 320

Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Asn Lys Asn Phe Tyr Phe Arg Asn Gly
 325 330 335

Leu Pro Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Ser Asn Gly Phe Glu Tyr Phe
 340 345 350

Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Arg
 355 360 365

Tyr Gln Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr Tyr Phe Gly
 370 375 380

Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Val
 385 390 395 400

Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu Phe
 405 410 415

Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val Lys Ala
 420 425 430

Pro Gly Ile Tyr Gly Arg Ser Met His Asn Leu Ile Thr Gly Phe Val
 435 440 445

Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly Ala
 450 455 460

Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe Asn
 465 470 475 480

Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly Phe
 485 490 495

Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly Glu
 500 505 510

Ala Ile Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr Tyr
 515 520 525

Phe Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp Gly
 530 535 540

Glu Met His Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly Leu
 545 550 555 560

ES 2 631 032 T3

Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly Val Met
 565 570 575

Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr Phe Asp Asp
 580 585 590

Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp Gly Lys His Phe
 595 600 605

Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr Glu
 610 615 620

Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn Glu Asp Leu Gly Asn Glu
 625 630 635 640

Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Leu Asn Phe Asn Asn Lys
 645 650 655

Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe Thr Ala Val Val Gly Trp Lys Asp
 660 665 670

Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Asp Thr Ala Glu Ala
 675 680 685

Tyr Ile Gly Leu Ser Leu Ile Asn Asp Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn Asp
 690 695 700

Asp Gly Ile Met Gln Val Gly Phe Val Thr Ile Asn Asp Lys Val Phe
 705 710 715 720

Tyr Phe Ser Asp Ser Gly Ile Ile Glu Ser Gly Val Gln Asn Ile Asp
 725 730 735

Asp Asn Tyr Phe Tyr Ile Asp Asp Asn Gly Ile Val Gln Ile Gly Val
 740 745 750

Phe Asp Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val
 755 760 765

Asn Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val Glu Tyr Ser Gly Leu Val Arg
 770 775 780

Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly Glu Thr Tyr Thr Ile Glu Thr
 785 790 795 800

Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu Ser Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn
 805 810 815

ES 2 631 032 T3

Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly Ile Asn Leu Ile Asp Asp Ile
 820 825 830

Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr Gly Leu Ile Ser
 835 840 845

Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn Gly Glu Met Gln Phe
 850 855 860

Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe Tyr Phe Gly Glu Asp Gly
 865 870 875 880

Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr Pro Asp Gly Phe Lys Tyr Phe
 885 890 895

Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu Asn Phe Glu Gly Glu Ser Ile Asn
 900 905 910

Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr Asp
 915 920 925

Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu Tyr
 930 935 940

Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu
 945 950 955

<210> 5

<211> 8133

5 <212> DNA

<213> Clostridium difficile cepa 630

<400> 5

atgtctttaa tatctaaaga agagttaata aaactgcgat atagcattag accaagagaa	60
aatgagtata aaactatact aactaattta gacgaatata ataagttaac tacaacaat	120
aatgaaaata aatatttaca attaaaaaaaa ctaaataaat caattgatgt ttttatgaat	180
aaatataaaa cttcaagcag aaatagagca ctctctaatac taaaaaaga tatattaata	240
gaagtaattc ttattaataaaa ttccaataca agccctgtag aaaaaaattt acattttgta	300
tggataggtg gagaagtcag tgatattgct cttgaatata taaaacaatg ggctgatatt	360
aatgcagaat ataataataa actgtggtat gatagtgaag cattcttagt aaatacacta	420
aaaaaggcta tagttgaatc ttctaccact gaagcattac agctactaga ggaagagatt	480
caaaatcctc aatttgataa tatgaaattt tacaataaaa ggatggaatt tatatatgat	540
agacataaaa ggtttataaa ttattataaa tctcaaatca ataacctac agtacctaca	600

10

ES 2 631 032 T3

atagatgata ttataaagtc tcatctagta tctgaatata atagagatga aactgtatta	660
gaatcatata gaacaaattc tttgagaaaa ataaatagta atcatgggat agatatcagg	720
gctaatagtt tgtttacaga acaagagtta ttaaataatt atagtcagga gttgttaaat	780
cgtggaaatt tagctgcagc atctgacata gtaagattat tagccctaaa aaatthtggc	840
ggagtatatt tagatgttga tatgcttcca ggtattcact ctgatttatt taaaacaata	900
tctagacctg gctctattgg actagaccgt tgggaaatga taaaattaga ggctattatg	960
aagtataaaa aatatataaa taattataca tcagaaaact ttgataaact tgatcaacaa	1020
ttaaaagata atthttaaact cattatagaa agtaaaagtg aaaaatctga gatathtct	1080
aaattagaaa atthtaagt atctgatctt gaaatthaaa tagctthtgc tthtaggcagt	1140
gttataaatc aagccttgat atcaaaacaa ggttcatatc ttactaacct agtaatagaa	1200
caagtaaaaa atagatatca atthttaaac caacacctta acccagccat agagtctgat	1260
aataacttca cagatactac taaaattht catgattcat tathtaattc agctaccgca	1320
gaaaactcta tgthtthaac aaaaatagca ccatacttac aagtaggtth tatgccagaa	1380
gctcgtcca caataagtht aagtggcca ggagcttatg cgtcagctta ctatgattc	1440
ataatthtac aagaaaatc tatagaaaa actthtaaaag catcagattt aatagaattt	1500
aaattcccag aaaataatct atctcaattg acagaacaag aataaatag tctatggagc	1560
thtgatcaag caagtgcaa atatcaattt gagaaatag taagagatta tactgtgga	1620
tctctthctg aagacaatgg ggtagactth aataaaaata ctgccctcga caaaaactat	1680
ttattaaata aaaaattcc atcaacaat gtagaagaag ctggaagtaa aaattatgtt	1740
cattatatca tacagttaca aggagatgat ataagttatg aagcaacatg caatthattt	1800
tctaaaaatc ctaaaaatag tattattata caacgaaata tgaatgaaag tgcaaaaagc	1860
tactthttaa gtgatgatgg agaactat ttagaattaa aataatag gataacctgaa	1920
agattaaaaa ataaggaaaa agtaaaagta acctthattg gacatggtaa agatgaattc	1980
aacacaagcg aatthgctag attaagtgtg gattcactth ccaatgagat aagttcattt	2040
ttagatacca taaaattaga tatatcacct aaaaatgtag aagtaaacct acttgatgt	2100
aatatgttht gttatgattt taatgtgaa gaaacttatc ctgggaagtt gctattaagt	2160
attatggaca aaattactc cactthacct gatgtaaaata aaaattctat tactatagga	2220
gcaaatcaat atgaagtaag aattaatagt gagggaaaga aagaacttct ggctcactca	2280
ggtaaatgga taaataaaga agaagctatt atgagcgatt tatctagtaa agaatacatt	2340
thtthtgatt ctatagataa taagctaaaa gcaaagtcca agaatttcc aggattagca	2400
tcaatatcag aagatataaa aacattatta cttagtcaa gtgttagtcc tgatacaaaa	2460

ES 2 631 032 T3

tttattttaa ataactctaa gcttaaatatt gaactctcta ttggtgatta cattttattat 2520
 gaaaaattag agcctgttaa aatataaatt cacaattcta tagatgattt aatagatgag 2580
 ttcaatctac ttgaaaatgt atctgatgaa ttatatgaat taaaaaaatt aaataatcta 2640
 gatgagaagt atttaatatc ttttgaagat atctcaaaaa ataattcaac ttactctgta 2700
 agattttatta acaaaaagtaa tgggtgagtca gtttatgtag aaacagaaaa agaaattttt 2760
 tcaaaatata gcgaacatat tacaaaagaa ataagtacta taaagaatag tataattaca 2820
 gatgttaatg gtaattttatt ggataatata cagtttagatc atacttctca agttaataca 2880
 ttaaaocgag cattctttat tcaatcatta atagattata gtagcaataa agatgtactg 2940
 aatgatttaa gtacctcagt taaggttcaa ctttatgctc aactatttag tacaggttta 3000
 aatactatat atgactctat ccaattagta aatttaatat caaatgcagt aaatgatact 3060
 ataaatgtac tacctacaat aacagagggg atacctattg tatctactat attagacgga 3120
 ataaacttag gtgcagcaat taaggaatta ctagacgaac atgaccatt actaaaaaa 3180
 gaattagaag ctaagggtggg tgttttagca ataaatatgt cattatctat agctgcaact 3240
 gtagcttcaa ttgttggaaat aggtgctgaa gttactattt tcttattacc tatagctggt 3300
 atatctgcag gaatacctc attagttaat aatgaattaa tattgcatga taaggcaact 3360
 tcagtggtaa actattttaa tcatttgtct gaactcaaaa aatatggccc tcttaaaaca 3420
 gaagatgata aaattttagt tcctattgat gatttagtaa tatcagaaat agattttaat 3480
 aataattcga taaaactagg aacatgtaat atattagcaa tggagggggg atcaggacac 3540
 acagtgactg gtaatataga tcacttttcc tcatctccat ctataagttc tcatattcct 3600
 tcattatcaa tttattctgc aataggtata gaaacagaaa atctagattt ttcaaaaaaa 3660
 ataatgatgt tacctaagtc tccttcaaga gtgttttggg gggaaactgg agcagttcca 3720
 ggtttaagat cattggaaaa tgacggaact agattacttg attcaataag agatttatac 3780
 ccaggtaaat tttactggag attctatgct tttttcgatt atgcaataac tacattaaaa 3840
 ccagtttatg aagacactaa tattaaaatt aaactagata aagatactag aaacttcata 3900
 atgccaacta taactactaa cgaaattaga aacaaattat cttattcatt tgatggagca 3960
 ggaggaactt actctttatt attatcttca tatccaatat caacgaatat aaatttatct 4020
 aaagatgatt tatggatatt taatattgat aatgaagtaa gagaaatato tatagaaaat 4080
 ggtactatta aaaaaggaaa gtttaataaaa gatgttttaa gtaaaattga tataaataaa 4140
 aataaactta ttataggcaa tcaacaata gatttttcag gcgatataga taataaagat 4200
 agatatatat tcttgacttg tgagttagat gataaaatta gttaataat agaaataaat 4260
 cttgttgcaa aatcttatag tttgttattg tctggggata aaaattattt gatatccaat 4320
 ttatctaata ttattgagaa aatcaatact ttaggcctag atagtaaaaa tatagcgtac 4380

ES 2 631 032 T3

aattacactg atgaatctaa taataaatat tttggagcta tatctaaaac aagtcaaaaa	4440
agcataatac attataaaaa agacagtaaa aatatattag aattttataa tgacagtaca	4500
ttagaattta acagtaaaga ttttattgct gaagatataa atgtatttat gaaagatgat	4560
attaatacta taacagggaaa atactatggt gataataata ctgataaaag tatagatttc	4620
tctatttcct tagttagtaa aaatcaagta aaagtaaatg gattatattt aaatgaatcc	4680
gtatactcat cttaccttga ttttgtgaaa aattcagatg gacaccataa tacttctaata	4740
tttatgaatt tatttttggg caatataagt ttctggaaat tgtttggggt tgaaaatata	4800
aattttgtaa tcgataaata ctttaccctt gttggtaaaa ctaactcttg atagttagaa	4860
tttatttggg acaataataa aaatatagat atatatattg gtgaatggaa aacatcgtca	4920
tctaaaagca ctatatttag cggaaatggt agaaatggtg tagtagagcc tatatataat	4980
cctgatacgg gtgaagatat atctacttca ctagattttt cctatgaacc tctctatgga	5040
atagatagat atatcaataa agtattgata gcacctgatt tatatacaag ttttaataaat	5100
attaatacca attattatc aaatgagtac taccctgaga ttatagttct taaccctaat	5160
acattccaca aaaaagtaaa tataaattta gatagttcct cttttgagta taaatggtct	5220
acagaaggaa gtgactttat tttagttaga tactttagaag aaagtaataa aaaaatatta	5280
caaaaaataa gaatcaaagg tatcttatct aatactcaat catttaataa aatgagtata	5340
gattttaaag atattaaaa actatcatta ggatatataa tgagtaattt taaatcattt	5400
aattctgaaa atgaattaga tagagatcat ttaggattta aaataataga taataaaact	5460
tattactatg atgaagatag taaattagtt aaaggattaa tcaatataaa taattcatta	5520
ttctattttg atcctataga atttaactta gtaactggat ggcaaaactat caatggtaaa	5580
aaatattatt ttgatataaa tactggagca gctttaatta gttataaaat tattaatggt	5640
aaacactttt attttaataa tgatggtgtg atgcagttgg gagtatttaa aggacctgat	5700
ggatttgaat attttgacc tgccaatact caaaataata acatagaagg tcaggctata	5760
gtttatcaaa gtaaattcct aactttgaat ggcaaaaaat attattttga taatgactca	5820
aaagcagtca ctggatggag aattattaac aatgagaaat attactttaa tcctaataat	5880
gctattgctg cagtcggatt gcaagtaatt gacaataata agtattattt caatcctgac	5940
actgctatca tctcaaaaagg ttggcagact gttaatggta gtagatacta ctttgatact	6000
gataaccgcta ttgcctttaa tggttataaa actattgatg gtaaactt ttattttgat	6060
agtgattgtg tagtgaaaat aggtgtgttt agtacctcta atggatttga atattttgca	6120
cctgctaata cttataataa taacatagaa ggtcaggcta tagtttatca aagtaaatc	6180
ttaactttga atggtaaaaa atattacttt gataataact caaaagcagt taccggatgg	6240

ES 2 631 032 T3

caaactattg atagtaaaaa atattacttt aataactaaca ctgctgaagc agctactgga 6300
 tggcaaaacta ttgatggtaa aaaatattac ttttaacta acaactgctga agcagctact 6360
 ggatggcaaa ctattgatgg taaaaaatat tactttaata ctaacactgc tatagcttca 6420
 actggttata caattattaa tggtaaacat ttttatttta atactgatgg tattatgcag 6480
 ataggagtgt ttaaaggacc taatggattt gaatattttg cacctgctaa tacggatgct 6540
 aacaacatag aaggcaagc tatactttac caaaatgaat tcttaacttt gaatggtaaa 6600
 aatattact ttggtagtga ctcaaaagca gttactggat ggagaattat taacaataag 6660
 aatattact ttaatcctaa taatgctatt gctgcaattc atctatgcac tataaataat 6720
 gacaagtatt actttagtta tgatggaatt cttcaaaatg gatataatc tattgaaaga 6780
 aataatttct attttgatgc taataatgaa tctaaaatgg taacaggagt atttaagga 6840
 cctaattggat ttgagtattt tgcacctgct aatactcaca ataataacat agaaggctcag 6900
 gctatagttt accagaacaa attcttaact ttgaatggca aaaaatatta ttttgataat 6960
 gactcaaaag cagttactgg atggcaaac attgatggta aaaaatatta cttaactctt 7020
 aacactgctg aagcagctac tggatggcaa actattgatg gtaaaaaata ttactttaat 7080
 cttaacactg ctgaagcagc tactggatgg caaactattg atggtaaaaa atattacttt 7140
 aatactaaca ctttcatagc ctcaactggt tatacaagta ttaatggtaa acatttttat 7200
 ttttaactg atggtattat gcagatagga gtgtttaaag gacctaatgg attgaatac 7260
 tttgcacctg ctaatactca taataataac atagaaggtc aagctatact ttacccaaat 7320
 aaattcttaa ctttgaatgg taaaaaatat tactttggtg gtgactcaa agcagttacc 7380
 ggattgcaaa ctattgatgg taaaaaatat tactttaata ctaacactgc tgttgcagtt 7440
 actggatggc aaactattaa tggtaaaaa tactacttta atactaacac ttctatagct 7500
 tcaactggtt atacaattat tagtggtaaa catttttatt ttaactga tggattatg 7560
 cagataggag tgtttaaagg acctgatgga tttgaatact ttgcacctgc taatacagat 7620
 gctaacaata tagaaggctc agctatacgt tatcaaaata gattcctata ttacatgac 7680
 aatataatatt attttggtaa taattcaaaa gcagctactg gttgggtaac tattgatggt 7740
 aatagatatt acttcgagcc taatacagct atgggtgcca atggttataa aactattgat 7800
 aataaaaatt tttactttag aatggttta cctcagatag gagtgtttaa agggtctaat 7860
 ggatttgaat actttgcacc tgctaatacg gatgctaaca atatagaagg tcaagctata 7920
 cgttatcaaa atagattcct acatttactt ggaaaaaatat attactttgg taataattca 7980
 aaagcagtta ctggatggca aactattaat ggtaaagtat attactttat gcctgatact 8040
 gctatggctg cagctgggtg acttttcgag attgatggtg ttatatattt ctttgggtgtt 8100
 gatggagtaa aagcccctgg gatatatggc taa 8133

<210> 6
 <211> 2710
 <212> PRT
 <213> Clostridium difficile cepa 630
 <400> 6

5

ES 2 631 032 T3

Met Ser Leu Ile Ser Lys Glu Glu Leu Ile Lys Leu Ala Tyr Ser Ile
 1 5 10 15

Arg Pro Arg Glu Asn Glu Tyr Lys Thr Ile Leu Thr Asn Leu Asp Glu
 20 25 30

Tyr Asn Lys Leu Thr Thr Asn Asn Asn Glu Asn Lys Tyr Leu Gln Leu
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asp Val Phe Met Asn Lys Tyr Lys Thr
 50 55 60

Ser Ser Arg Asn Arg Ala Leu Ser Asn Leu Lys Lys Asp Ile Leu Lys
 65 70 75 80

Glu Val Ile Leu Ile Lys Asn Ser Asn Thr Ser Pro Val Glu Lys Asn
 85 90 95

Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Glu Val Ser Asp Ile Ala Leu Glu
 100 105 110

Tyr Ile Lys Gln Trp Ala Asp Ile Asn Ala Glu Tyr Asn Ile Lys Leu
 115 120 125

Trp Tyr Asp Ser Glu Ala Phe Leu Val Asn Thr Leu Lys Lys Ala Ile
 130 135 140

Val Glu Ser Ser Thr Thr Glu Ala Leu Gln Leu Leu Glu Glu Glu Ile
 145 150 155 160

Gln Asn Pro Gln Phe Asp Asn Met Lys Phe Tyr Lys Lys Arg Met Glu
 165 170 175

Phe Ile Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Phe Ile Asn Tyr Tyr Lys Ser Gln
 180 185 190

Ile Asn Lys Pro Thr Val Pro Thr Ile Asp Asp Ile Ile Lys Ser His
 195 200 205

Leu Val Ser Glu Tyr Asn Arg Asp Glu Thr Val Leu Glu Ser Tyr Arg
 210 215 220

ES 2 631 032 T3

Thr Asn Ser Leu Arg Lys Ile Asn Ser Asn His Gly Ile Asp Ile Arg
 225 230 235 240
 Ala Asn Ser Leu Phe Thr Glu Gln Glu Leu Leu Asn Ile Tyr Ser Gln
 245 250 255
 Glu Leu Leu Asn Arg Gly Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Val Arg
 260 265 270
 Leu Leu Ala Leu Lys Asn Phe Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp Met
 275 280 285
 Leu Pro Gly Ile His Ser Asp Leu Phe Lys Thr Ile Ser Arg Pro Ser
 290 295 300
 Ser Ile Gly Leu Asp Arg Trp Glu Met Ile Lys Leu Glu Ala Ile Met
 305 310 315 320
 Lys Tyr Lys Lys Tyr Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Glu Asn Phe Asp Lys
 325 330 335
 Leu Asp Gln Gln Leu Lys Asp Asn Phe Lys Leu Ile Ile Glu Ser Lys
 340 345 350
 Ser Glu Lys Ser Glu Ile Phe Ser Lys Leu Glu Asn Leu Asn Val Ser
 355 360 365
 Asp Leu Glu Ile Lys Ile Ala Phe Ala Leu Gly Ser Val Ile Asn Gln
 370 375 380
 Ala Leu Ile Ser Lys Gln Gly Ser Tyr Leu Thr Asn Leu Val Ile Glu
 385 390 395 400
 Gln Val Lys Asn Arg Tyr Gln Phe Leu Asn Gln His Leu Asn Pro Ala
 405 410 415
 Ile Glu Ser Asp Asn Asn Phe Thr Asp Thr Thr Lys Ile Phe His Asp
 420 425 430
 Ser Leu Phe Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asn Ser Met Phe Leu Thr Lys
 435 440 445
 Ile Ala Pro Tyr Leu Gln Val Gly Phe Met Pro Glu Ala Arg Ser Thr
 450 455 460
 Ile Ser Leu Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Ala Ser Ala Tyr Tyr Asp Phe

ES 2 631 032 T3

Ile Met Asp Lys Ile Thr Ser Thr Leu Pro Asp Val Asn Lys Asn Ser
725 730 735

Ile Thr Ile Gly Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Ser Glu Gly
740 745 750

Arg Lys Glu Leu Leu Ala His Ser Gly Lys Trp Ile Asn Lys Glu Glu
755 760 765

Ala Ile Met Ser Asp Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ile Phe Phe Asp Ser
770 775 780

Ile Asp Asn Lys Leu Lys Ala Lys Ser Lys Asn Ile Pro Gly Leu Ala
785 790 795 800

Ser Ile Ser Glu Asp Ile Lys Thr Leu Leu Leu Asp Ala Ser Val Ser
805 810 815

Pro Asp Thr Lys Phe Ile Leu Asn Asn Leu Lys Leu Asn Ile Glu Ser
820 825 830

Ser Ile Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Glu Lys Leu Glu Pro Val Lys Asn
835 840 845

Ile Ile His Asn Ser Ile Asp Asp Leu Ile Asp Glu Phe Asn Leu Leu
850 855 860

Glu Asn Val Ser Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Lys Lys Leu Asn Asn Leu
865 870 875 880

Asp Glu Lys Tyr Leu Ile Ser Phe Glu Asp Ile Ser Lys Asn Asn Ser
885 890 895

Thr Tyr Ser Val Arg Phe Ile Asn Lys Ser Asn Gly Glu Ser Val Tyr
900 905 910

Val Glu Thr Glu Lys Glu Ile Phe Ser Lys Tyr Ser Glu His Ile Thr
915 920 925

Lys Glu Ile Ser Thr Ile Lys Asn Ser Ile Ile Thr Asp Val Asn Gly
930 935 940

Asn Leu Leu Asp Asn Ile Gln Leu Asp His Thr Ser Gln Val Asn Thr
945 950 955 960

Leu Asn Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Asp Tyr Ser Ser Asn
965 970 975

ES 2 631 032 T3

Lys Asp Val Leu Asn Asp Leu Ser Thr Ser Val Lys Val Gln Leu Tyr
 980 985 990
 Ala Gln Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Tyr Asp Ser Ile Gln
 995 1000 1005
 Leu Val Asn Leu Ile Ser Asn Ala Val Asn Asp Thr Ile Asn Val
 1010 1015 1020
 Leu Pro Thr Ile Thr Glu Gly Ile Pro Ile Val Ser Thr Ile Leu
 1025 1030 1035
 Asp Gly Ile Asn Leu Gly Ala Ala Ile Lys Glu Leu Leu Asp Glu
 1040 1045 1050
 His Asp Pro Leu Leu Lys Lys Glu Leu Glu Ala Lys Val Gly Val
 1055 1060 1065
 Leu Ala Ile Asn Met Ser Leu Ser Ile Ala Ala Thr Val Ala Ser
 1070 1075 1080
 Ile Val Gly Ile Gly Ala Glu Val Thr Ile Phe Leu Leu Pro Ile
 1085 1090 1095
 Ala Gly Ile Ser Ala Gly Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu
 1100 1105 1110
 Ile Leu His Asp Lys Ala Thr Ser Val Val Asn Tyr Phe Asn His
 1115 1120 1125
 Leu Ser Glu Ser Lys Lys Tyr Gly Pro Leu Lys Thr Glu Asp Asp
 1130 1135 1140
 Lys Ile Leu Val Pro Ile Asp Asp Leu Val Ile Ser Glu Ile Asp
 1145 1150 1155
 Phe Asn Asn Asn Ser Ile Lys Leu Gly Thr Cys Asn Ile Leu Ala
 1160 1165 1170
 Met Glu Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr Gly Asn Ile Asp His
 1175 1180 1185
 Phe Phe Ser Ser Pro Ser Ile Ser Ser His Ile Pro Ser Leu Ser
 1190 1195 1200
 Ile Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Glu Thr Glu Asn Leu Asp Phe Ser
 1205 1210 1215

ES 2 631 032 T3

Lys Lys Ile Met Met Leu Pro Asn Ala Pro Ser Arg Val Phe Trp
 1220 1225 1230

Trp Glu Thr Gly Ala Val Pro Gly Leu Arg Ser Leu Glu Asn Asp
 1235 1240 1245

Gly Thr Arg Leu Leu Asp Ser Ile Arg Asp Leu Tyr Pro Gly Lys
 1250 1255 1260

Phe Tyr Trp Arg Phe Tyr Ala Phe Phe Asp Tyr Ala Ile Thr Thr
 1265 1270 1275

Leu Lys Pro Val Tyr Glu Asp Thr Asn Ile Lys Ile Lys Leu Asp
 1280 1285 1290

Lys Asp Thr Arg Asn Phe Ile Met Pro Thr Ile Thr Thr Asn Glu
 1295 1300 1305

Ile Arg Asn Lys Leu Ser Tyr Ser Phe Asp Gly Ala Gly Gly Thr
 1310 1315 1320

Tyr Ser Leu Leu Leu Ser Ser Tyr Pro Ile Ser Thr Asn Ile Asn
 1325 1330 1335

Leu Ser Lys Asp Asp Leu Trp Ile Phe Asn Ile Asp Asn Glu Val
 1340 1345 1350

Arg Glu Ile Ser Ile Glu Asn Gly Thr Ile Lys Lys Gly Lys Leu
 1355 1360 1365

Ile Lys Asp Val Leu Ser Lys Ile Asp Ile Asn Lys Asn Lys Leu
 1370 1375 1380

Ile Ile Gly Asn Gln Thr Ile Asp Phe Ser Gly Asp Ile Asp Asn
 1385 1390 1395

Lys Asp Arg Tyr Ile Phe Leu Thr Cys Glu Leu Asp Asp Lys Ile
 1400 1405 1410

Ser Leu Ile Ile Glu Ile Asn Leu Val Ala Lys Ser Tyr Ser Leu
 1415 1420 1425

Leu Leu Ser Gly Asp Lys Asn Tyr Leu Ile Ser Asn Leu Ser Asn
 1430 1435 1440

Ile Ile Glu Lys Ile Asn Thr Leu Gly Leu Asp Ser Lys Asn Ile

ES 2 631 032 T3

1445		1450		1455
Ala Tyr	Asn Tyr Thr Asp	Glu Ser Asn Asn Lys	Tyr Phe Gly Ala	
1460		1465	1470	
Ile Ser	Lys Thr Ser Gln Lys	Ser Ile Ile His	Tyr Lys Lys Asp	
1475		1480	1485	
Ser Lys	Asn Ile Leu Glu Phe	Tyr Asn Asp Ser Thr	Leu Glu Phe	
1490		1495	1500	
Asn Ser	Lys Asp Phe Ile Ala	Glu Asp Ile Asn Val	Phe Met Lys	
1505		1510	1515	
Asp Asp	Ile Asn Thr Ile Thr	Gly Lys Tyr Tyr Val	Asp Asn Asn	
1520		1525	1530	
Thr Asp	Lys Ser Ile Asp Phe	Ser Ile Ser Leu Val	Ser Lys Asn	
1535		1540	1545	
Gln Val	Lys Val Asn Gly Leu	Tyr Leu Asn Glu Ser	Val Tyr Ser	
1550		1555	1560	
Ser Tyr	Leu Asp Phe Val Lys	Asn Ser Asp Gly His	His Asn Thr	
1565		1570	1575	
Ser Asn	Phe Met Asn Leu Phe	Leu Asp Asn Ile Ser	Phe Trp Lys	
1580		1585	1590	
Leu Phe	Gly Phe Glu Asn Ile	Asn Phe Val Ile Asp	Lys Tyr Phe	
1595		1600	1605	
Thr Leu	Val Gly Lys Thr Asn	Leu Gly Tyr Val Glu	Phe Ile Cys	
1610		1615	1620	
Asp Asn	Asn Lys Asn Ile Asp	Ile Tyr Phe Gly Glu	Trp Lys Thr	
1625		1630	1635	
Ser Ser	Ser Lys Ser Thr Ile	Phe Ser Gly Asn Gly	Arg Asn Val	
1640		1645	1650	
Val Val	Glu Pro Ile Tyr Asn	Pro Asp Thr Gly Glu	Asp Ile Ser	
1655		1660	1665	
Thr Ser	Leu Asp Phe Ser Tyr	Glu Pro Leu Tyr Gly	Ile Asp Arg	
1670		1675	1680	

ES 2 631 032 T3

Tyr Ile Asn Lys Val Leu Ile Ala Pro Asp Leu Tyr Thr Ser Leu
 1685 1690 1695

 Ile Asn Ile Asn Thr Asn Tyr Tyr Ser Asn Glu Tyr Tyr Pro Glu
 1700 1705 1710

 Ile Ile Val Leu Asn Pro Asn Thr Phe His Lys Lys Val Asn Ile
 1715 1720 1725

 Asn Leu Asp Ser Ser Ser Phe Glu Tyr Lys Trp Ser Thr Glu Gly
 1730 1735 1740

 Ser Asp Phe Ile Leu Val Arg Tyr Leu Glu Glu Ser Asn Lys Lys
 1745 1750 1755

 Ile Leu Gln Lys Ile Arg Ile Lys Gly Ile Leu Ser Asn Thr Gln
 1760 1765 1770

 Ser Phe Asn Lys Met Ser Ile Asp Phe Lys Asp Ile Lys Lys Leu
 1775 1780 1785

 Ser Leu Gly Tyr Ile Met Ser Asn Phe Lys Ser Phe Asn Ser Glu
 1790 1795 1800

 Asn Glu Leu Asp Arg Asp His Leu Gly Phe Lys Ile Ile Asp Asn
 1805 1810 1815

 Lys Thr Tyr Tyr Tyr Asp Glu Asp Ser Lys Leu Val Lys Gly Leu
 1820 1825 1830

 Ile Asn Ile Asn Asn Ser Leu Phe Tyr Phe Asp Pro Ile Glu Phe
 1835 1840 1845

 Asn Leu Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr
 1850 1855 1860

 Phe Asp Ile Asn Thr Gly Ala Ala Leu Ile Ser Tyr Lys Ile Ile
 1865 1870 1875

 Asn Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn Asn Asp Gly Val Met Gln Leu
 1880 1885 1890

 Gly Val Phe Lys Gly Pro Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala
 1895 1900 1905

 Asn Thr Gln Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln
 1910 1915 1920

ES 2 631 032 T3

Ser Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn
 1925 1930 1935

Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Arg Ile Ile Asn Asn Glu Lys
 1940 1945 1950

Tyr Tyr Phe Asn Pro Asn Asn Ala Ile Ala Ala Val Gly Leu Gln
 1955 1960 1965

Val Ile Asp Asn Asn Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Asp Thr Ala Ile
 1970 1975 1980

Ile Ser Lys Gly Trp Gln Thr Val Asn Gly Ser Arg Tyr Tyr Phe
 1985 1990 1995

Asp Thr Asp Thr Ala Ile Ala Phe Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp
 2000 2005 2010

Gly Lys His Phe Tyr Phe Asp Ser Asp Cys Val Val Lys Ile Gly
 2015 2020 2025

Val Phe Ser Thr Ser Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn
 2030 2035 2040

Thr Tyr Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln Ser
 2045 2050 2055

Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn
 2060 2065 2070

Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Ser Lys Lys Tyr
 2075 2080 2085

Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr
 2090 2095 2100

Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Glu Ala
 2105 2110 2115

Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn
 2120 2125 2130

Thr Asn Thr Ala Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Asn Gly
 2135 2140 2145

Lys His Phe Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val
 2150 2155 2160

ES 2 631 032 T3

Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr
 2165 2170 2175
 Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Glu
 2180 2185 2190
 Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser
 2195 2200 2205
 Lys Ala Val Thr Gly Trp Arg Ile Ile Asn Asn Lys Lys Tyr Tyr
 2210 2215 2220
 Phe Asn Pro Asn Asn Ala Ile Ala Ala Ile His Leu Cys Thr Ile
 2225 2230 2235
 Asn Asn Asp Lys Tyr Tyr Phe Ser Tyr Asp Gly Ile Leu Gln Asn
 2240 2245 2250
 Gly Tyr Ile Thr Ile Glu Arg Asn Asn Phe Tyr Phe Asp Ala Asn
 2255 2260 2265
 Asn Glu Ser Lys Met Val Thr Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly
 2270 2275 2280
 Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu
 2285 2290 2295
 Gly Gln Ala Ile Val Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly
 2300 2305 2310
 Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp
 2315 2320 2325
 Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala
 2330 2335 2340
 Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr
 2345 2350 2355
 Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile
 2360 2365 2370
 Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Phe Ile Ala Ser
 2375 2380 2385
 Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn Thr

ES 2 631 032 T3

2390		2395		2400
Asp Gly	Ile Met Gln Ile	Gly Val Phe Lys Gly	Pro Asn Gly Phe	
2405		2410	2415	
Glu Tyr	Phe Ala Pro Ala	Asn Thr His Asn Asn Asn	Ile Glu Gly	
2420		2425	2430	
Gln Ala	Ile Leu Tyr Gln	Asn Lys Phe Leu Thr	Leu Asn Gly Lys	
2435		2440	2445	
Lys Tyr	Tyr Phe Gly Ser	Asp Ser Lys Ala Val	Thr Gly Leu Arg	
2450		2455	2460	
Thr Ile	Asp Gly Lys Lys	Tyr Tyr Phe Asn Thr	Asn Thr Ala Val	
2465		2470	2475	
Ala Val	Thr Gly Trp Gln	Thr Ile Asn Gly Lys	Lys Tyr Tyr Phe	
2480		2485	2490	
Asn Thr	Asn Thr Ser Ile	Ala Ser Thr Gly Tyr	Thr Ile Ile Ser	
2495		2500	2505	
Gly Lys	His Phe Tyr Phe	Asn Thr Asp Gly Ile	Met Gln Ile Gly	
2510		2515	2520	
Val Phe	Lys Gly Pro Asp	Gly Phe Glu Tyr Phe	Ala Pro Ala Asn	
2525		2530	2535	
Thr Asp	Ala Asn Asn Ile	Glu Gly Gln Ala Ile	Arg Tyr Gln Asn	
2540		2545	2550	
Arg Phe	Leu Tyr Leu His	Asp Asn Ile Tyr Tyr	Phe Gly Asn Asn	
2555		2560	2565	
Ser Lys	Ala Ala Thr Gly	Trp Val Thr Ile Asp	Gly Asn Arg Tyr	
2570		2575	2580	
Tyr Phe	Glu Pro Asn Thr	Ala Met Gly Ala Asn	Gly Tyr Lys Thr	
2585		2590	2595	
Ile Asp	Asn Lys Asn Phe	Tyr Phe Arg Asn Gly	Leu Pro Gln Ile	
2600		2605	2610	
Gly Val	Phe Lys Gly Ser	Asn Gly Phe Glu Tyr	Phe Ala Pro Ala	
2615		2620	2625	

ES 2 631 032 T3

Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr Gln
2630 2635 2640

Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn
2645 2650 2655

Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Val
2660 2665 2670

Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu
2675 2680 2685

Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val
2690 2695 2700

Lys Ala Pro Gly Ile Tyr Gly
2705 2710

<210> 7

<211> 7101

5 <212> ADN

<213> Clostridium difficile cepa 630

<400> 7

atgagtttag ttaatagaaa acagttagaa aaaatggcaa atgtaagatt tcgtactcaa	60
gaagatgaat atgttgcaat attggatgct ttagaagaat atcataatat gtcagagaat	120
actgtagtgc aaaaatattt aaaattaaaa gatataaata gtttaacaga tatttatata	180
gatacatata aaaaatctgg tagaaataaa gccttaaaaa aatttaagga atatctagtt	240
acagaagtat tagagctaaa gaataataat ttaactccag ttgagaaaaa tttacatttt	300
gtttggattg gaggtcaaat aaatgacact gctattaatt atataaatca atggaaagat	360
gtaaatagtg attataatgt taatgttttt tatgatagta atgcattttt gataaacaca	420
ttgaaaaaaaa ctgtagtaga atcagcaata aatgatacac ttgaatcatt tagagaaaac	480
ttaaatagacc ctagatttga ctataataaa ttcttcagaa aacgtatgga aataatttat	540
gataaacaga aaaatttcat aaactactat aaagctcaaa gagaagaaaa tcctgaactt	600
ataattgatg atattgtaaa gacatatctt tcaaatagag attcaaagga gatagatgaa	660
cttaatacct atattgaaga atccttaaat aaaattacac agaatagtgg aatgatggtt	720
agaaactttg aagaatttaa aatggagag tcattcaact tatatgaaca agagttggta	780
gaaaggtgga atttagctgc tgcttctgac atattaagaa tatctgcatt aaaagaaatt	840
ggtggtatgt atttagatgt tgatatgtta ccaggaatac aaccagactt attgagtct	900
atagagaaac ctagttcagt aacagtggat ttttgggaaa tgacaaagtt agaagctata	960
atgaaataca aagaatatat accagaatat acctcagaac attttgacat gttagacgaa	1020

10

ES 2 631 032 T3

gaagttcaaa gtagttttga atctgttcta gcttctaagt cagataaatc agaaatattc 1080
 tcatcacttg gtgatatgga ggcatcacca ctagaagtta aaattgcatt taatagtaag 1140
 ggtattataa atcaagggct aatttctgtg aaagactcat attgtagcaa tttaatagta 1200
 aaacaaatcg agaatagata taaaatattg aataatagtt taaatccagc tattagcgag 1260
 gataatgatt ttaatactac aacgaatacc tttattgata gtataatggc tgaagctaatt 1320
 gcagataatg gtagatttat gatggaacta ggaaagtatt taagagttgg tttcttcca 1380
 gatgttaaaa ctactattaa cttaagtggc cctgaagcat atgcggcagc ttatcaagat 1440
 ttattaatgt ttaaagaagc cagtatgaat atccatttga tagaagctga ttttaagaaac 1500
 tttgaaatct ctaaaactaa tttttctcaa tcaactgaac aagaaatggc tagcttatgg 1560
 tcatttgacg atgcaagagc taaagctcaa tttgaagaat ataaaaggaa ttattttgaa 1620
 ggttctcttg gtgaagatga taatcttgat ttttctcaaa atatagtagt tgacaaggag 1680
 tatcttttag aaaaaatato ttcattagca agaagttcag agagaggata tatacactat 1740
 attgttcagt tacaaggaga taaaattagt tatgaagcag catgtaactt atttgcaaag 1800
 actccttatg atagtgtact gtttcagaaa aatatagaag attcagaaat tgcataattat 1860
 tataatcctg gagatggtga aatacaagaa atagacaagt ataaaattcc aagtataatt 1920
 tctgatagac ctaagattaa attaacattt attggctatg gtaaagatga atttaatact 1980
 gatataattg caggttttga tgtagattca ttatccacag aaatagaagc agcaatagat 2040
 ttagctaaag aggatatttc tcttaagtca atagaaataa atttattagg atgtaatatg 2100
 tttagctact ctatcaactg agaggagact tatcctggaa aattattact taaagttaa 2160
 gataaaatat cagaattaat gccatctata agtcaagact ctattatagt aagtgcaaat 2220
 caatatgaag ttagaataaa tagtgaagga agaagagaat tattggatca ttctggtgaa 2280
 tggataaata aagaagaaag tattataaag gatatttcat caaaagaata tatatcattt 2340
 aatcctaaag aaaataaaat tacagtaaaa tctaaaaatt tacctgagct atctacatta 2400
 ttacaagaaa ttagaaataa ttctaattca agtgatattg aactagaaga aaaagtaatg 2460
 ttaacagaat gtgagataaa tgttatttca aatatagata cgcaaattgt tgaggaaagg 2520
 attgaagaag ctaagaattt aacttctgac tctattaatt atataaaaga tgaatttaa 2580
 ctaatagaat ctatttctga tgcactatgt gacttaaac aacagaatga attagaagat 2640
 tctcatttta tatcttttga ggacatatca gagactgatg agggatttag tataagattt 2700
 attaataaag aaactggaga atctatattt gtagaaactg aaaaaacaat attctctgaa 2760
 tatgctaate atataactga agagatttct aagataaaag gtactatatt tgatactgta 2820
 aatggttaagt tagtaaaaaa agtaaattha gatactacac acgaagtaaa tactttaaat 2880

ES 2 631 032 T3

gctgcatttt ttatacaatc attaatagaa tataatagtt ctaaagaatc tcttagtaat 2940
ttaaagtgtag caatgaaagt ccaagtttac gctcaattat ttagtactgg tttaaatact 3000
attacagatg cagccaaagt tgttgaatta gtatcaactg cattagatga aactatagac 3060
ttacttccta cattatctga aggattacct ataattgcaa ctattataga tggtgtaagt 3120
ttaggtgcag caatcaaaga gctaagtgaa acgagtgacc cattattaag acaagaaata 3180
gaagctaaga taggtataat ggcagtaaat ttaacaacag ctacaactgc aatcattact 3240
tcactctttg ggatagctag tggatttagt ataccttttag ttccttttagc aggaatttca 3300
gcaggtatac caagcttagt aaacaatgaa cttgtacttc gagataaggc aacaaaggtt 3360
gtagattatt ttaaacaatgt ttcattagtt gaaactgaag gagtatttac tttattagat 3420
gataaaataa tgatgccaca agatgattta gtgatatcag aaatagattt taataataat 3480
tcaatagttt taggtaaatg tgaaatctgg agaatggaag gtggttcagg tcatactgta 3540
actgatgata tagatcactt cttttcagca ccatcaataa catatagaga gccacactta 3600
tctatatatg acgtattgga agtacaaaa gaagaacttg atttgtcaaa agatttaatg 3660
gtattaccta atgctccaaa tagagtattt gcttgggaaa caggatggac accaggttta 3720
agaagcttag aaaatgatgg cacaaaactg ttagaccgta taagagataa ctatgaaggt 3780
gagttttatt ggagatattt tgcttttata gctgatgctt taataacaac attaaaacca 3840
agatataag atactaatat aagaataaat ttagatagta atactagaag ttttatagtt 3900
ccaataataa ctacagaata tataagagaa aaattatcat attctttcta tggttcagga 3960
ggaacttatg cattgtctct ttctcaatat aatatgggta taaatataga attaagttaa 4020
agtgatgttt ggattataga tgttgataat gttgtgagag atgtaactat agaactctgat 4080
aaaattaaaa aagggtattt aatagaagggt attttatcta cactaagtat tgaagagaat 4140
aaaattatct taaatagcca tgagattaat ttttctggg aggtaaatgg aagtaatgga 4200
tttgtttctt taacattttc aattttagaa ggaataaatg caattataga agttgattta 4260
ttatctaaat catataaatt acttatttct ggccaattaa aaatattgat gttaaattca 4320
aatcatattc aacagaaaat agattatata ggattcaata gcgaattaca gaaaaatata 4380
ccatatagct ttgtagatag tgaaggaaaa gagaatgggt ttattaatgg ttcaacaaaa 4440
gaaggtttat ttgtatctga attacctgat gtagtcttta taagtaaggt ttatatggat 4500
gatagtaagc cttcatttgg atattatagt aataatttga aagatgtcaa agttataact 4560
aaagataatg ttaatatatt aacaggttat tatcttaagg atgatataaa aatctctctt 4620
tctttgactc tacaagatga aaaaactata aagttaaata gtgtgcattt agatgaaagt 4680
ggagtagctg agattttgaa gttcatgaat agaaaaggta atacaaatac ttcagattct 4740
ttaatgagct ttttagaaag tatgaatata aaaagtattt tcgttaattt cttacaatct 4800

ES 2 631 032 T3

aatattaagt ttatattaga tgctaatttt ataataagt gtactacttc tattggccaa 4860
tttgagttta tttgtgatga aaatgataat atacaacat atttcattaa gtttaataca 4920
ctagaaacta attatacttt atatgtagga aatagacaaa atatgatagt ggaaccaaat 4980
tatgatttag atgattctgg agatatatct tcaactgtta tcaatttctc tcaaaagtat 5040
ctttatggaa tagacagttg tgtaataaaa gttgtaattt caccaaataat ttatacagat 5100
gaaataaata taacgcctgt atatgaaaca aataaactt atccagaagt tattgtatta 5160
gatgcaaatt atataaatga aaaaataaat gttaatatca atgatctatc tatacgatat 5220
gtatggagta atgatggtaa tgattttatt cttatgtcaa ctagtgaaga aaataagggtg 5280
tcacaagtta aaataagatt cgtaaatggt tttaaagata agactttggc aaataagcta 5340
tcttttaact ttagtataa acaagatgta cctgtaagtg aaataatctt atcatttaca 5400
ccttcatatt atgaggatgg attgattggc tatgatttgg gtctagtttc tttatataat 5460
gagaaatfff atattaataa ctttggaaatg atggatctct gattaatata tattaatgat 5520
tcattatatt attttaaac accagtaa attttgataa ctggatttgt gactgtaggc 5580
gatgataaat actacttta tccaattaat ggtggagctg cttcaattgg agagacaata 5640
attgatgaca aaaattatta tttcaaccaa agtggaggtg tacaacagc tgtatttagt 5700
acagaagatg gatttaataa ttttcccc gctaatacac ttgatgaaa cctagaagga 5760
gaagcaattg attttactgg aaaattaatt attgacgaaa atatttatta ttttgatgat 5820
aattatagag gagctgtaga atggaagaa ttagatgggtg aaatgcacta ttttagccca 5880
gaaacaggta aagcttttaa aggtctaaat caaatagggtg attataaata ctatttcaat 5940
tctgatggag ttatgcaaaa aggatttgtt agtataaatg ataataaaca ctattttgat 6000
gattctgggtg ttatgaaagt aggttact gaaatagatg gcaagcattt ctactttgct 6060
gaaaacggag aaatgcaaat aggagtattt aatacagaag atggatttaa atattttgct 6120
catcataatg aagatttagg aaatgaagaa ggtgaagaaa tctcatattc tggatatta 6180
aatttcaata ataaaattta ctattttgat gattcattta cagctgtagt tggatggaaa 6240
gatttagagg atggttcaaa gtattatfff gatgaagata cagcagaagc atatatagg 6300
ttgtcattaa taaatgatgg tcaatattat tttaatgatg atggaattat gcaagtggga 6360
tttgtcacta taaatgataa agtcttctac ttctctgact ctggaattat agaactgga 6420
gtacaaaaca tagatgacaa ttatttctat atagatgata atggtatagt tcaaatgggt 6480
gtatttgata cttcagatgg atataaatat tttgcacctg ctaatactgt aaatgataat 6540
attacggac aagcagttga atagtggtg ttagttagag ttggtgaaga tgtatattat 6600
tttgagaaa catatacaat tgagactgga tggatatatg atatggaaa tgaagtgat 6660

ES 2 631 032 T3

aaatattatt tcaatccaga aactaaaaaa gcatgcaaag gtattaattt aattgatgat 6720
 ataaaaatatt attttgatga gaagggcata atgagaacgg gtcttatatc atttgaaaat 6780
 aataattatt actttaatga gaatggtgaa atgcaatttg gttatataaa tatagaagat 6840
 aagatgttct attttggtga agatggtgtc atgcagattg gagtatttaa tacaccagat 6900
 ggatttaaat actttgcaca tcaaaatact ttggatgaga attttgaggg agaatcaata 6960
 aactatactg gttggttaga tttagatgaa aagagatatt attttacaga tgaatatatt 7020
 gcagcaactg gttcagttat tattgatggt gaggagtatt attttgatcc tgatacagct 7080
 caattagtga ttagtgaata g 7101

<210> 8

<211> 2366

<212> PRT

<213> Clostridium difficile cepa 630

5

<400> 8

Met Ser Leu Val Asn Arg Lys Gln Leu Glu Lys Met Ala Asn Val Arg
 1 5 10 15

Phe Arg Thr Gln Glu Asp Glu Tyr Val Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu
 20 25 30

Glu Tyr His Asn Met Ser Glu Asn Thr Val Val Glu Lys Tyr Leu Lys
 35 40 45

Leu Lys Asp Ile Asn Ser Leu Thr Asp Ile Tyr Ile Asp Thr Tyr Lys
 50 55 60

Lys Ser Gly Arg Asn Lys Ala Leu Lys Lys Phe Lys Glu Tyr Leu Val
 65 70 75 80

Thr Glu Val Leu Glu Leu Lys Asn Asn Asn Leu Thr Pro Val Glu Lys
 85 90 95

Asn Leu His Phe Val Trp Ile Gly Gly Gln Ile Asn Asp Thr Ala Ile
 100 105 110

Asn Tyr Ile Asn Gln Trp Lys Asp Val Asn Ser Asp Tyr Asn Val Asn
 115 120 125

Val Phe Tyr Asp Ser Asn Ala Phe Leu Ile Asn Thr Leu Lys Lys Thr
 130 135 140

Val Val Glu Ser Ala Ile Asn Asp Thr Leu Glu Ser Phe Arg Glu Asn
 145 150 155 160

10

ES 2 631 032 T3

Leu Asn Asp Pro Arg Phe Asp Tyr Asn Lys Phe Phe Arg Lys Arg Met
 165 170 175
 Glu Ile Ile Tyr Asp Lys Gln Lys Asn Phe Ile Asn Tyr Tyr Lys Ala
 180 185 190
 Gln Arg Glu Glu Asn Pro Glu Leu Ile Ile Asp Asp Ile Val Lys Thr
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Asn Glu Tyr Ser Lys Glu Ile Asp Glu Leu Asn Thr Tyr
 210 215 220
 Ile Glu Glu Ser Leu Asn Lys Ile Thr Gln Asn Ser Gly Asn Asp Val
 225 230 235 240
 Arg Asn Phe Glu Glu Phe Lys Asn Gly Glu Ser Phe Asn Leu Tyr Glu
 245 250 255
 Gln Glu Leu Val Glu Arg Trp Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Leu
 260 265 270
 Arg Ile Ser Ala Leu Lys Glu Ile Gly Gly Met Tyr Leu Asp Val Asp
 275 280 285
 Met Leu Pro Gly Ile Gln Pro Asp Leu Phe Glu Ser Ile Glu Lys Pro
 290 295 300
 Ser Ser Val Thr Val Asp Phe Trp Glu Met Thr Lys Leu Glu Ala Ile
 305 310 315 320
 Met Lys Tyr Lys Glu Tyr Ile Pro Glu Tyr Thr Ser Glu His Phe Asp
 325 330 335
 Met Leu Asp Glu Glu Val Gln Ser Ser Phe Glu Ser Val Leu Ala Ser
 340 345 350
 Lys Ser Asp Lys Ser Glu Ile Phe Ser Ser Leu Gly Asp Met Glu Ala
 355 360 365
 Ser Pro Leu Glu Val Lys Ile Ala Phe Asn Ser Lys Gly Ile Ile Asn
 370 375 380
 Gln Gly Leu Ile Ser Val Lys Asp Ser Tyr Cys Ser Asn Leu Ile Val
 385 390 395 400
 Lys Gln Ile Glu Asn Arg Tyr Lys Ile Leu Asn Asn Ser Leu Asn Pro
 405 410 415

ES 2 631 032 T3

Ala Ile Ser Glu Asp Asn Asp Phe Asn Thr Thr Thr Asn Thr Phe Ile
 420 425 430

Asp Ser Ile Met Ala Glu Ala Asn Ala Asp Asn Gly Arg Phe Met Met
 435 440 445

Glu Leu Gly Lys Tyr Leu Arg Val Gly Phe Phe Pro Asp Val Lys Thr
 450 455 460

Thr Ile Asn Leu Ser Gly Pro Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Tyr Gln Asp
 465 470 475 480

Leu Leu Met Phe Lys Glu Gly Ser Met Asn Ile His Leu Ile Glu Ala
 485 490 495

Asp Leu Arg Asn Phe Glu Ile Ser Lys Thr Asn Ile Ser Gln Ser Thr
 500 505 510

Glu Gln Glu Met Ala Ser Leu Trp Ser Phe Asp Asp Ala Arg Ala Lys
 515 520 525

Ala Gln Phe Glu Glu Tyr Lys Arg Asn Tyr Phe Glu Gly Ser Leu Gly
 530 535 540

Glu Asp Asp Asn Leu Asp Phe Ser Gln Asn Ile Val Val Asp Lys Glu
 545 550 555 560

Tyr Leu Leu Glu Lys Ile Ser Ser Leu Ala Arg Ser Ser Glu Arg Gly
 565 570 575

Tyr Ile His Tyr Ile Val Gln Leu Gln Gly Asp Lys Ile Ser Tyr Glu
 580 585 590

Ala Ala Cys Asn Leu Phe Ala Lys Thr Pro Tyr Asp Ser Val Leu Phe
 595 600 605

Gln Lys Asn Ile Glu Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Tyr Tyr Asn Pro Gly
 610 615 620

Asp Gly Glu Ile Gln Glu Ile Asp Lys Tyr Lys Ile Pro Ser Ile Ile
 625 630 635 640

Ser Asp Arg Pro Lys Ile Lys Leu Thr Phe Ile Gly His Gly Lys Asp
 645 650 655

Glu Phe Asn Thr Asp Ile Phe Ala Gly Phe Asp Val Asp Ser Leu Ser

ES 2 631 032 T3

660	665	670																				
Thr	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Glu	Asp	Ile	Ser	Pro							
	675						680					685										
Lys	Ser	Ile	Glu	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Cys	Asn	Met	Phe	Ser	Tyr	Ser							
	690					695					700											
Ile	Asn	Val	Glu	Glu	Thr	Tyr	Pro	Gly	Lys	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Lys							
705					710					715					720							
Asp	Lys	Ile	Ser	Glu	Leu	Met	Pro	Ser	Ile	Ser	Gln	Asp	Ser	Ile	Ile							
				725					730					735								
Val	Ser	Ala	Asn	Gln	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Asn	Ser	Glu	Gly	Arg	Arg							
			740					745					750									
Glu	Leu	Leu	Asp	His	Ser	Gly	Glu	Trp	Ile	Asn	Lys	Glu	Glu	Ser	Ile							
	755						760					765										
Ile	Lys	Asp	Ile	Ser	Ser	Lys	Glu	Tyr	Ile	Ser	Phe	Asn	Pro	Lys	Glu							
	770					775					780											
Asn	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Ser	Lys	Asn	Leu	Pro	Glu	Leu	Ser	Thr	Leu							
785					790					795					800							
Leu	Gln	Glu	Ile	Arg	Asn	Asn	Ser	Asn	Ser	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Glu							
				805					810					815								
Glu	Lys	Val	Met	Leu	Thr	Glu	Cys	Glu	Ile	Asn	Val	Ile	Ser	Asn	Ile							
			820					825					830									
Asp	Thr	Gln	Ile	Val	Glu	Glu	Arg	Ile	Glu	Glu	Ala	Lys	Asn	Leu	Thr							
		835					840					845										
Ser	Asp	Ser	Ile	Asn	Tyr	Ile	Lys	Asp	Glu	Phe	Lys	Leu	Ile	Glu	Ser							
	850					855					860											
Ile	Ser	Asp	Ala	Leu	Cys	Asp	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Glu	Leu	Glu	Asp							
865					870					875					880							
Ser	His	Phe	Ile	Ser	Phe	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Thr	Asp	Glu	Gly	Phe							
				885					890					895								
Ser	Ile	Arg	Phe	Ile	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Glu	Ser	Ile	Phe	Val	Glu							
			900					905						910								

ES 2 631 032 T3

Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ser Glu Tyr Ala Asn His Ile Thr Glu Glu
 915 920 925
 Ile Ser Lys Ile Lys Gly Thr Ile Phe Asp Thr Val Asn Gly Lys Leu
 930 935 940
 Val Lys Lys Val Asn Leu Asp Thr Thr His Glu Val Asn Thr Leu Asn
 945 950 955 960
 Ala Ala Phe Phe Ile Gln Ser Leu Ile Glu Tyr Asn Ser Ser Lys Glu
 965 970 975
 Ser Leu Ser Asn Leu Ser Val Ala Met Lys Val Gln Val Tyr Ala Gln
 980 985 990
 Leu Phe Ser Thr Gly Leu Asn Thr Ile Thr Asp Ala Ala Lys Val Val
 995 1000 1005
 Glu Leu Val Ser Thr Ala Leu Asp Glu Thr Ile Asp Leu Leu Pro
 1010 1015 1020
 Thr Leu Ser Glu Gly Leu Pro Ile Ile Ala Thr Ile Ile Asp Gly
 1025 1030 1035
 Val Ser Leu Gly Ala Ala Ile Lys Glu Leu Ser Glu Thr Ser Asp
 1040 1045 1050
 Pro Leu Leu Arg Gln Glu Ile Glu Ala Lys Ile Gly Ile Met Ala
 1055 1060 1065
 Val Asn Leu Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ile Ile Thr Ser Ser Leu
 1070 1075 1080
 Gly Ile Ala Ser Gly Phe Ser Ile Leu Leu Val Pro Leu Ala Gly
 1085 1090 1095
 Ile Ser Ala Gly Ile Pro Ser Leu Val Asn Asn Glu Leu Val Leu
 1100 1105 1110
 Arg Asp Lys Ala Thr Lys Val Val Asp Tyr Phe Lys His Val Ser
 1115 1120 1125
 Leu Val Glu Thr Glu Gly Val Phe Thr Leu Leu Asp Asp Lys Ile
 1130 1135 1140
 Met Met Pro Gln Asp Asp Leu Val Ile Ser Glu Ile Asp Phe Asn
 1145 1150 1155

ES 2 631 032 T3

Asn Asn Ser Ile Val Leu Gly Lys Cys Glu Ile Trp Arg Met Glu
 1160 1165 1170

 Gly Gly Ser Gly His Thr Val Thr Asp Asp Ile Asp His Phe Phe
 1175 1180 1185

 Ser Ala Pro Ser Ile Thr Tyr Arg Glu Pro His Leu Ser Ile Tyr
 1190 1195 1200

 Asp Val Leu Glu Val Gln Lys Glu Glu Leu Asp Leu Ser Lys Asp
 1205 1210 1215

 Leu Met Val Leu Pro Asn Ala Pro Asn Arg Val Phe Ala Trp Glu
 1220 1225 1230

 Thr Gly Trp Thr Pro Gly Leu Arg Ser Leu Glu Asn Asp Gly Thr
 1235 1240 1245

 Lys Leu Leu Asp Arg Ile Arg Asp Asn Tyr Glu Gly Glu Phe Tyr
 1250 1255 1260

 Trp Arg Tyr Phe Ala Phe Ile Ala Asp Ala Leu Ile Thr Thr Leu
 1265 1270 1275

 Lys Pro Arg Tyr Glu Asp Thr Asn Ile Arg Ile Asn Leu Asp Ser
 1280 1285 1290

 Asn Thr Arg Ser Phe Ile Val Pro Ile Ile Thr Thr Glu Tyr Ile
 1295 1300 1305

 Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Ser Phe Tyr Gly Ser Gly Gly Thr Tyr
 1310 1315 1320

 Ala Leu Ser Leu Ser Gln Tyr Asn Met Gly Ile Asn Ile Glu Leu
 1325 1330 1335

 Ser Glu Ser Asp Val Trp Ile Ile Asp Val Asp Asn Val Val Arg
 1340 1345 1350

 Asp Val Thr Ile Glu Ser Asp Lys Ile Lys Lys Gly Asp Leu Ile
 1355 1360 1365

 Glu Gly Ile Leu Ser Thr Leu Ser Ile Glu Glu Asn Lys Ile Ile
 1370 1375 1380

 Leu Asn Ser His Glu Ile Asn Phe Ser Gly Glu Val Asn Gly Ser
 1385 1390 1395

ES 2 631 032 T3

Asn Gly Phe Val Ser Leu Thr Phe Ser Ile Leu Glu Gly Ile Asn
 1400 1405 1410

Ala Ile Ile Glu Val Asp Leu Leu Ser Lys Ser Tyr Lys Leu Leu
 1415 1420 1425

Ile Ser Gly Glu Leu Lys Ile Leu Met Leu Asn Ser Asn His Ile
 1430 1435 1440

Gln Gln Lys Ile Asp Tyr Ile Gly Phe Asn Ser Glu Leu Gln Lys
 1445 1450 1455

Asn Ile Pro Tyr Ser Phe Val Asp Ser Glu Gly Lys Glu Asn Gly
 1460 1465 1470

Phe Ile Asn Gly Ser Thr Lys Glu Gly Leu Phe Val Ser Glu Leu
 1475 1480 1485

Pro Asp Val Val Leu Ile Ser Lys Val Tyr Met Asp Asp Ser Lys
 1490 1495 1500

Pro Ser Phe Gly Tyr Tyr Ser Asn Asn Leu Lys Asp Val Lys Val
 1505 1510 1515

Ile Thr Lys Asp Asn Val Asn Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Leu Lys
 1520 1525 1530

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Leu Ser Leu Thr Leu Gln Asp Glu Lys
 1535 1540 1545

Thr Ile Lys Leu Asn Ser Val His Leu Asp Glu Ser Gly Val Ala
 1550 1555 1560

Glu Ile Leu Lys Phe Met Asn Arg Lys Gly Asn Thr Asn Thr Ser
 1565 1570 1575

Asp Ser Leu Met Ser Phe Leu Glu Ser Met Asn Ile Lys Ser Ile
 1580 1585 1590

Phe Val Asn Phe Leu Gln Ser Asn Ile Lys Phe Ile Leu Asp Ala
 1595 1600 1605

Asn Phe Ile Ile Ser Gly Thr Thr Ser Ile Gly Gln Phe Glu Phe
 1610 1615 1620

Ile Cys Asp Glu Asn Asp Asn Ile Gln Pro Tyr Phe Ile Lys Phe

ES 2 631 032 T3

Tyr Tyr Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly Ala Ala Ser Ile Gly Glu
 1865 1870 1875

 Thr Ile Ile Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe Asn Gln Ser Gly Val
 1880 1885 1890

 Leu Gln Thr Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe
 1895 1900 1905

 Ala Pro Ala Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly Glu Ala Ile
 1910 1915 1920

 Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr Tyr Phe
 1925 1930 1935

 Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp Gly
 1940 1945 1950

 Glu Met His Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly
 1955 1960 1965

 Leu Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly
 1970 1975 1980

 Val Met Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr
 1985 1990 1995

 Phe Asp Asp Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp
 2000 2005 2010

 Gly Lys His Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly
 2015 2020 2025

 Val Phe Asn Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn
 2030 2035 2040

 Glu Asp Leu Gly Asn Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly
 2045 2050 2055

 Ile Leu Asn Phe Asn Asn Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe
 2060 2065 2070

 Thr Ala Val Val Gly Trp Lys Asp Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr
 2075 2080 2085

 Tyr Phe Asp Glu Asp Thr Ala Glu Ala Tyr Ile Gly Leu Ser Leu
 2090 2095 2100

ES 2 631 032 T3

Ile Asn Asp Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn Asp Asp Gly Ile Met Gln
 2105 2110 2115

Val Gly Phe Val Thr Ile Asn Asp Lys Val Phe Tyr Phe Ser Asp
 2120 2125 2130

Ser Gly Ile Ile Glu Ser Gly Val Gln Asn Ile Asp Asp Asn Tyr
 2135 2140 2145

Phe Tyr Ile Asp Asp Asn Gly Ile Val Gln Ile Gly Val Phe Asp
 2150 2155 2160

Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn
 2165 2170 2175

Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val Glu Tyr Ser Gly Leu Val Arg
 2180 2185 2190

Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly Glu Thr Tyr Thr Ile Glu
 2195 2200 2205

Thr Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu Ser Asp Lys Tyr Tyr
 2210 2215 2220

Phe Asn Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly Ile Asn Leu Ile
 2225 2230 2235

Asp Asp Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr
 2240 2245 2250

Gly Leu Ile Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn
 2255 2260 2265

Gly Glu Met Gln Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe
 2270 2275 2280

Tyr Phe Gly Glu Asp Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr
 2285 2290 2295

Pro Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu
 2300 2305 2310

Asn Phe Glu Gly Glu Ser Ile Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu
 2315 2320 2325

Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr
 2330 2335 2340

Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp
 2345 2350 2355

Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu
 2360 2365

5 <210> 9
 <211> 32
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> Cebador directo
 5 <400> 9
 caccactagt atgaacttag taactggatg gc 32
 <210> 10
 10 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> Cebador inverso
 <400> 10
 ctcgagttag ccatatatcc caggggc 27
 20 <210> 11
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo
 <400> 11
 30 caccatgcat atgagtttag ttaatagaaa acag 34
 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso
 <400> 12
 40 ggctcgagc tattcactaa tcactaattg agc 33
 <210> 13
 <211> 44
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador directo
 50 <400> 13
 agatctatgc atgagctcct cgagcccaaa acgaaaggct cagc 44
 <210> 14
 <211> 36
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso
 60 <400> 14
 cggtcgggg ccatatatcc caggggcttt tactcc 36
 <210> 15
 65 <211> 34

ES 2 631 032 T3

<212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 15
 cacccattg atgtaacag gagtattaa agga 34

10 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 16
 ctcgagctat tcactaatca ctaattgagc tg 32

20 <210> 17
 <211> 4482
 <212> ADN
 <213> artificial

25 <220>
 <223> ADN de fusión de C-TADCTB

<400> 17
 atgtaacag gagtatttaa aggacctaag ggatttgagt attttgcacc tgctaatact 60
 cacaataata acatagaagg tcaggctata gtttaccaga acaaattctt aactttgaat 120
 ggcaaaaaat attatattga taatgactca aaagcagtta ctggatggca aaccattgat 180
 ggtaaaaaat attactttaa tcttaacact gctgaagcag ctactggatg gcaaactatt 240
 gatggtaaaa aatattactt taatcttaac actgctgaag cagctactgg atggcaaact 300
 30 attgatggta aaaaatatta cttaataact aacactttca tagcctcaac tggttataca 360

ES 2 631 032 T3

agtattaatg gtaaacatth ttatthtaat actgatggta ttatgcagat aggagtgttt 420
 aaaggaccta atggatttga atactttgca cctgctaata cggatgctaa caacatagaa 480
 ggtcaagcta tactttacca aaataaatc ttaactttga atggtaaaaa atattacttt 540
 ggtagtgact caaaagcagt taccggactg cgaactattg atggtaaaaa atattacttt 600
 aatactaaca ctgctgttgc agttactgga tggcaacta ttaatggtaa aaaatactac 660
 ttaatacta acacttctat agcttcaact gggtatacaa ttattagtgg taacatthtt 720
 taththtaata ctgatggat tatgcagata ggagtgttta aaggacctga tggatttga 780
 tactttgcac ctgctaatac agatgctaac aatatagaag gtcaagctat acgttatcaa 840
 aatagattcc tatathhaca tgacaatata taththttg gtaataatc aaaagcggct 900
 actggttggg taactattga tggtaataga tathcttgc agcctaatac agctatgggt 960
 gcgaatggtt ataaaactat tgataataaa aaththtact ttagaaatg tttacctcag 1020
 ataggagtgt ttaaagggtc taatggattt gaactthttg cacctgctaa tacggatgct 1080
 aacaatatag aaggccaagc tatacgttat caaaatagat tcctacatth acttggaana 1140
 atathact ttggaataa ttcaaaagca gttactggat ggcaactat taatggtaa 1200
 gtathact ttatgcctga tactgctatg gctgcagctg gtggactthtt cgagattgat 1260
 ggtgttatat atthcttgg tgttgatgga gtaaaagccc ctgggatata tggcagatct 1320
 atgcataath tgataactgg atthgtgact gtaggcgatg ataaatacta cthtaatcca 1380
 ataatggtg gagctgctc aattggagag acaataatg atgacaaaa thaththttc 1440
 aaccaaagtg gagtgttaca aacaggtgta thtagtacag aagatggatt taaaththtt 1500
 gccccagcta atacacttga tgaaaaccta gaaggagaag caattgatt tactggaana 1560
 ttaathattg acgaaaatath thaththtt gatgataath atagaggagc tgtagaatgg 1620
 aaagaattag atggtgaaath gcactaththt agcccagaaa caggtaaacg tthtaaggt 1680
 ctaaatcaaa taggtgatta taaatactath thcaathctg atggagttat gcaaaaagga 1740
 thtgtagta taaatgataa taaacactath thtgatgatt ctggtgttat gaaagtaggt 1800
 tacttgaaa tagatggcaa gcaththctac thtgctgaaa acggagaaath gcaaatagga 1860
 gtathtaata cagaagatgg atthaaatath thtgctcath ataatgaaga thtaggaaath 1920
 gaagaaggtg aagaathctc atathctggat atathaaath tcaataataa aaththactath 1980
 thtgatgatt caththacagc tgtagttgga tggaaagatt tagaggatgg thcaagatath 2040
 thththgatg aagatacagc agaagcathath ataggtthgt cathhaataa tgatggtcaa 2100
 thathththath atgatgatgg aathatgcaa gthggattthg thactataaa tgataaagtc 2160
 thctactthct ctgactctgg aathatagaa thtggtgathc aaaacathaga tgacaathath 2220

ES 2 631 032 T3

ttctatatag atgataatgg tatagttcaa attggtgtat ttgatacttc agatggatat 2280
 aaatattttg cacctgctaa tactgtaaat gataatattt acggacaagc agttgaatat 2340
 agtggtttag ttagagttgg ggaagatgta tattattttg gagaaacata tacaattgag 2400
 actggatgga tatatgatat ggaaaatgaa agtgataaat attatttcaa tccagaaaact 2460
 aaaaaagcat gcaaaggat taatttaatt gatgatataa aatattattt tgatgagaag 2520
 ggcataatga gaacgggtct tatatcattt gaaaataata attattactt taatgagaat 2580
 ggtgaaatgc aatttgggta tataaatata gaagataaga tgttctattt tggggaagat 2640
 ggtgtcatgc agattggagt atttaataca ccagatggat ttaaatactt tgcacatcaa 2700
 aatacttttg atgagaatth tgaggagaa tcaataaact atactggttg gttagattta 2760
 gatgaaaaga gatattattt tacagatgaa tatattgcag caactggttc agttattatt 2820
 gatggtgagg agtattattt tgatcctgat acagctcaat tagtgattag tgaactcgag 2880
 ggattaatat atattaatga ttcattatat tattttaaac caccagtaa taatttgata 2940
 actggatttg tgactgtagg cgatgataaa tactacttta atccaattaa tggggagct 3000
 gcttcaattg gagagacaat aattgatgac aaaaattatt atttcaacca aagtggagtg 3060
 ttacaaacag gtgtatttag tacagaagat ggatttaaat attttgcccc agctaataka 3120
 cttgatgaaa acctagaagg agaagcaatt gattttactg gaaaattaat tattgacgaa 3180
 aatatttatt atttgatga taattataga ggagctgtag aatggaaaga attagatggt 3240
 gaaatgcact attttagccc agaaacaggt aaagctttha aaggctaaa tcaaataagt 3300
 gattataaat actatttcaa ttctgatgga gttatgcaaa aaggatttgt tagtataaat 3360
 gataataaac actattttga tgattctggt gttatgaaag taggttacac tgaatatagat 3420
 ggcaagcatt tctactttgc tgaaaacgga gaaatgcaaa taggagtatt taatacagaa 3480
 gatggattta aatattttgc tcatcataat gaagatttag gaaatgaaga aggtgaagaa 3540
 atctcatatt ctggtatatt aaatttcaat aataaaattt actattttga tgattcattt 3600
 acagctgtag ttggatggaa agatttagag gatggttcaa agtattattt tgatgaagat 3660
 acagcagaag catatatagg tttgtcatta ataatgatg gtcaatatta ttttaatgat 3720
 gatggaatta tgcaagttgg atttgcact ataatgata aagtcttcta cttctctgac 3780
 tctggaatta tagaatctgg agtacaaaac atagatgaca attatttcta tatagatgat 3840
 aatggtatag ttcaaattgg tgtatttgat acttcagatg gatataaata ttttgcacct 3900
 gctaactg taaatgataa ttttacgga caagcagttg aatatagtgg ttagttaga 3960
 gttggggaag atgtatatta ttttgagaa acatatacaa ttgagactgg atggatatat 4020
 gatatggaaa atgaaagtga taaatattat ttcaatccag aactaaaaa agcatgcaaa 4080
 ggtattaatt taattgatga tataaaatat tattttgatg agaagggcat aatgagaacg 4140

ES 2 631 032 T3

ggctttatat catttgaaaa taataattat tactttaatg agaatggtga aatgcaattt 4200
 ggttatataa atatagaaga taagatgttc tattttggtg aagatggtgt catgcagatt 4260
 ggagtattta atacaccaga tggatttaaa tactttgcac atcaaaatac tttggatgag 4320
 aattttgagg gagaatcaat aaactatact ggttggttag atttagatga aaagagatat 4380
 tattttacag atgaatatat tgcagcaact ggttcagtta ttattgatgg tgaggagtat 4440
 tattttgatc ctgatacagc tcaattagtg attagtgaat ag 4482

<210> 18
 <211> 1493
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de C-TADCTB

10

<400> 18
 Met Val Thr Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr
 20 25 30
 Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn
 35 40 45
 Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr
 50 55 60
 Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile
 65 70 75 80
 Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr
 85 90 95
 Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr
 100 105 110
 Phe Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr
 115 120 125
 Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn
 130 135 140
 Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu
 145 150 155 160

ES 2 631 032 T3

Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys
 165 170 175

Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu Arg Thr
 180 185 190

Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Val Ala Val
 195 200 205

Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn
 210 215 220

Thr Ser Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Ser Gly Lys His Phe
 225 230 235 240

Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro
 245 250 255

Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile
 260 265 270

Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu Tyr Leu His Asp
 275 280 285

Asn Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Ala Thr Gly Trp Val
 290 295 300

Thr Ile Asp Gly Asn Arg Tyr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ala Met Gly
 305 310 315 320

Ala Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Asn Lys Asn Phe Tyr Phe Arg Asn
 325 330 335

Gly Leu Pro Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Ser Asn Gly Phe Glu Tyr
 340 345 350

Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile
 355 360 365

Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr Tyr Phe
 370 375 380

Gly Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys
 385 390 395 400

Val Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu
 405 410 415

ES 2 631 032 T3

Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val Lys
 420 425 430
 Ala Pro Gly Ile Tyr Gly Arg Ser Met His Asn Leu Ile Thr Gly Phe
 435 440 445
 Val Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly
 450 455 460
 Ala Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe
 465 470 475 480
 Asn Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly
 485 490 495
 Phe Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly
 500 505 510
 Glu Ala Ile Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr
 515 520 525
 Tyr Phe Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp
 530 535 540
 Gly Glu Met His Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly
 545 550 555 560
 Leu Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly Val
 565 570 575
 Met Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr Phe Asp
 580 585 590
 Asp Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp Gly Lys His
 595 600 605
 Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr
 610 615 620
 Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn Glu Asp Leu Gly Asn
 625 630 635 640
 Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Leu Asn Phe Asn Asn
 645 650 655
 Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe Thr Ala Val Val Gly Trp Lys

ES 2 631 032 T3

660	665	670																			
Asp	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Glu						
		675					680					685									
Ala	Tyr	Ile	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Asn						
	690					695					700										
Asp	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Val	Gly	Phe	Val	Thr	Ile	Asn	Asp	Lys	Val						
705					710					715					720						
Phe	Tyr	Phe	Ser	Asp	Ser	Gly	Ile	Ile	Glu	Ser	Gly	Val	Gln	Asn	Ile						
				725					730					735							
Asp	Asp	Asn	Tyr	Phe	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Gly	Ile	Val	Gln	Ile	Gly						
			740					745					750								
Val	Phe	Asp	Thr	Ser	Asp	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr						
		755					760					765									
Val	Asn	Asp	Asn	Ile	Tyr	Gly	Gln	Ala	Val	Glu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Val						
	770					775					780										
Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Val	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu						
785					790					795					800						
Thr	Gly	Trp	Ile	Tyr	Asp	Met	Glu	Asn	Glu	Ser	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Phe						
				805					810					815							
Asn	Pro	Glu	Thr	Lys	Lys	Ala	Cys	Lys	Gly	Ile	Asn	Leu	Ile	Asp	Asp						
			820					825					830								
Ile	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Glu	Lys	Gly	Ile	Met	Arg	Thr	Gly	Leu	Ile						
		835					840					845									
Ser	Phe	Glu	Asn	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Glu	Asn	Gly	Glu	Met	Gln						
	850					855					860										
Phe	Gly	Tyr	Ile	Asn	Ile	Glu	Asp	Lys	Met	Phe	Tyr	Phe	Gly	Glu	Asp						
865					870					875					880						
Gly	Val	Met	Gln	Ile	Gly	Val	Phe	Asn	Thr	Pro	Asp	Gly	Phe	Lys	Tyr						
				885					890					895							
Phe	Ala	His	Gln	Asn	Thr	Leu	Asp	Glu	Asn	Phe	Glu	Gly	Glu	Ser	Ile						
			900					905						910							

ES 2 631 032 T3

Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr
 915 920 925
 Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu
 930 935 940
 Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu Leu Glu
 945 950 955 960
 Gly Leu Ile Tyr Ile Asn Asp Ser Leu Tyr Tyr Phe Lys Pro Pro Val
 965 970 975
 Asn Asn Leu Ile Thr Gly Phe Val Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr
 980 985 990
 Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly Ala Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile
 995 1000 1005
 Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe Asn Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr
 1010 1015 1020
 Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala Pro Ala
 1025 1030 1035
 Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly Glu Ala Ile Asp Phe Thr
 1040 1045 1050
 Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Asn
 1055 1060 1065
 Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp Gly Glu Met His
 1070 1075 1080
 Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly Leu Asn Gln
 1085 1090 1095
 Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly Val Met Gln
 1100 1105 1110
 Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr Phe Asp Asp
 1115 1120 1125
 Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp Gly Lys His
 1130 1135 1140
 Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly Val Phe Asn
 1145 1150 1155

ES 2 631 032 T3

Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn Glu Asp Leu
 1160 1165 1170
 Gly Asn Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Leu Asn
 1175 1180 1185
 Phe Asn Asn Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe Thr Ala Val
 1190 1195 1200
 Val Gly Trp Lys Asp Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr Tyr Phe Asp
 1205 1210 1215
 Glu Asp Thr Ala Glu Ala Tyr Ile Gly Leu Ser Leu Ile Asn Asp
 1220 1225 1230
 Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn Asp Asp Gly Ile Met Gln Val Gly Phe
 1235 1240 1245
 Val Thr Ile Asn Asp Lys Val Phe Tyr Phe Ser Asp Ser Gly Ile
 1250 1255 1260
 Ile Glu Ser Gly Val Gln Asn Ile Asp Asp Asn Tyr Phe Tyr Ile
 1265 1270 1275
 Asp Asp Asn Gly Ile Val Gln Ile Gly Val Phe Asp Thr Ser Asp
 1280 1285 1290
 Gly Tyr Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn Asp Asn Ile
 1295 1300 1305
 Tyr Gly Gln Ala Val Glu Tyr Ser Gly Leu Val Arg Val Gly Glu
 1310 1315 1320
 Asp Val Tyr Tyr Phe Gly Glu Thr Tyr Thr Ile Glu Thr Gly Trp
 1325 1330 1335
 Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu Ser Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro
 1340 1345 1350
 Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly Ile Asn Leu Ile Asp Asp Ile
 1355 1360 1365
 Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr Gly Leu Ile
 1370 1375 1380
 Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn Gly Glu Met
 1385 1390 1395

ES 2 631 032 T3

Gln Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe Tyr Phe Gly
 1400 1405 1410

Glu Asp Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr Pro Asp Gly
 1415 1420 1425

Phe Lys Tyr Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu Asn Phe Glu
 1430 1435 1440

Gly Glu Ser Ile Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu Lys
 1445 1450 1455

Arg Tyr Tyr Phe Thr Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val
 1460 1465 1470

Ile Ile Asp Gly Glu Glu Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln
 1475 1480 1485

Leu Val Ile Ser Glu
 1490

<210> 19
 <211> 3552
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> ADN de fusión de C-TANCTB

<400> 19
 atggtaacag gagtatttaa aggacctaat ggatttgagt attttgcacc tgctaatact 60
 cacaataata acatagaagg tcaggctata gtttaccaga acaaattctt aactttgaat 120
 ggcaaaaaat attattttga taatgactca aaagcagtta ctggatggca aaccattgat 180
 ggtaaaaaat attactttta tottaacact gctgaagcag ctactggatg gcaaactatt 240
 gatggtaaaa aatattactt taatcttaac actgctgaag cagctactgg atggcaaact 300
 attgatggta aaaaatatta ctttaatact aacactttca tagcctcaac tggttataca 360
 agtattaatg gtaaacattt ttattttaat actgatggta ttatgcagat aggagtgttt 420
 aaaggaccta atggatttga atactttgca cctgctaata cggatgctaa caacatagaa 480
 ggtcaagcta tactttacca aaataaatc ttaactttga atggtaaaaa atattacttt 540
 ggtagtgact caaaagcagt taccggactg cgaactattg atggtaaaaa atattacttt 600
 aatactaaca ctgctgttgc agttactgga tggcaaaacta ttaatggtaa aaaatactac 660
 ttaataacta acacttctat agcttcaact ggttatataca ttattagtgg taaacatttt 720

ES 2 631 032 T3

tattttaata ctgatggtat tatgcagata ggagtgttta aaggacctga tggatttgaa 780
tactttgcac ctgctaatac agatgctaac aatatagaag gtcaagctat acgttatcaa 840
aatagattcc tatatttaca tgacaatata tattattttg gtaataattc aaaagcggct 900
actggttggg taactattga tggtaataga tattacttcg agcctaatac agctatgggt 960
gcgaatggtt ataaaactat tgataataaa aatttttact ttagaaatgg tttacctcag 1020
ataggagtgt ttaaagggtc taatggattt gaatactttg cacctgctaa tacggatgct 1080
aacaatatag aaggccaagc tatacgttat caaaatagat tcctacattht acttggaana 1140
atatattact ttggtataaa ttcaaaagca gttactggat ggcaaaactat taatggtaaa 1200
gtatattact ttatgcctga tactgctatg gctgcagctg gtggactttt cgagattgat 1260
ggtgttatat atttcttttg tgttgatgga gtaaaagccc ctgggatata tggcagatct 1320
atgcataatt tgataactgg atttgtgact gtaggcagatg ataaatacta ctthaatcca 1380
attaatggtg gagctgcttc aattggagag acaataattg atgacaaaa ttattatttc 1440
aaccaaaagt gagtgttaca aacaggtgta tttagtagag aagatggatt taaatatttt 1500
gccccagcta atacacttga tgaaaaccta gaaggagaag caattgattt tactggaaaa 1560
ttaattattg acgaaaatat ttattatttt gatgataatt atagaggagc tgtagaatgg 1620
aaagaattag atggtgaaat gcactatttt agcccagaaa caggtaaacg ttttaaggt 1680
ctaaatcaaa taggtgatta taaatactat ttcaattctg atggagtat gcaaaaagga 1740
tttgtagta taaatgataa taaacactat tttgatgatt ctggtgttat gaaagtaggt 1800
tacctgaaa tagatggcaa gcatttctac tttgctgaaa acggagaaat gcaaatagga 1860
gtattttaata cagaagatgg atttaaatat tttgctcacc ataataaga tttaggaaat 1920
gaagaagggt aagaaatctc atattctggg atattaaatt tcaataataa aatttactat 1980
tttgatgatt catttacagc tgtagtggga tggaaagatt tagaggatgg ttcaaagtat 2040
tattttgatg aagatacagc agaagcatat ataggtttgt cattaataaa tgatgggtcaa 2100
tattatttta atgatgatgg aattatgcaa gttggatttg tcaataaaa tgataaagtc 2160
ttctacttct ctgactctgg aattatagaa tctggagtac aaaacataga tgacaattat 2220
ttctatatag atgataatgg tatagttcaa attggtgtat ttgatacttc agatggatat 2280
aaatattttg cacctgctaa tactgtaaaat gataatattt acggacaagc agttgaatat 2340
agtggtttag ttagagttgg ggaagatgta tattattttg gagaaacata tacaattgag 2400
actggatgga tatatgatat ggaaaatgaa agtgataaat attatttcaa tccagaaact 2460
aaaaaagcat gcaaaggtat taatttaatt gatgatataa aatattattt tgatgagaag 2520
ggcataatga gaacgggtct tatatcattt gaaaataata attattactt taatgagaat 2580
ggtgaaatgc aatttggtta tataaatata gaagataaga tgttctattt tggatgaagat 2640

ES 2 631 032 T3

ggtgtcatgc agattggagt atttaataca ccagatggat ttaaatactt tgcacatcaa 2700
 aatactttgg atgagaatth tgagggagaa tcaataaact atactggttg gttagattta 2760
 gatgaaaaga gatattatth tacagatgaa tatattgcag caactggttc agttattatt 2820
 gatggtgagg agtattatth tgatcctgat acagctcaat tagtgattag tgaactcgag 2880
 ggattaatat atattaatga ttcattatat tattttaaac caccagtaaa taatttgata 2940
 actggatttg tgactgtagg cgatgataaa tactacttta atccaattaa tgggtggagct 3000
 gcttcaattg gagagacaat aattgatgac aaaaattatt atttcaacca aagtggagtg 3060
 ttacaaaacg gtgtatttag tacagaagat ggatttaaat attttgcccc agctaataca 3120
 cttgatgaaa acctagaagg agaagcaatt gattttactg gaaaattaat tattgacgaa 3180
 aatatttatt attttgatga taattataga ggagctgtag aatggaaaga attagatggt 3240
 gaaatgcact attttagccc agaaacaggt aaagctttha aaggtctaaa tcaaataggt 3300
 gattataaat actatttcaa ttctgatgga gttatgcaaa aaggatttgt tagtataaat 3360
 gataataaac actattttga tgattctggt gttatgaaag taggttacac tgaaatagat 3420
 ggcaagcatt tctactttgc tgaaaacgga gaaatgcaaa taggagtatt taatacagaa 3480
 gatggattta aatattttgc tcatcataat gaagatttag gaaatgaaga aggtgaagaa 3540
 atctcatatt ct 3552

<210> 20
 <211> 1184
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de C-TANCTB

10

<400> 20
 Met Val Thr Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe Glu Tyr Phe Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Asn Thr His Asn Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile Val Tyr
 20 25 30
 Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asp Asn
 35 40 45
 Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr
 50 55 60
 Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr Gly Trp Gln Thr Ile
 65 70 75 80

ES 2 631 032 T3

Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Leu Asn Thr Ala Glu Ala Ala Thr
 85 90 95
 Gly Trp Gln Thr Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr
 100 105 110
 Phe Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr
 115 120 125
 Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn
 130 135 140
 Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu
 145 150 155 160
 Gly Gln Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Lys Tyr Tyr Phe Gly Ser Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu Arg Thr
 180 185 190
 Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Val Ala Val
 195 200 205
 Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn
 210 215 220
 Thr Ser Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Ser Gly Lys His Phe
 225 230 235 240
 Tyr Phe Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro
 245 250 255
 Asp Gly Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile
 260 265 270
 Glu Gly Gln Ala Ile Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu Tyr Leu His Asp
 275 280 285
 Asn Ile Tyr Tyr Phe Gly Asn Asn Ser Lys Ala Ala Thr Gly Trp Val
 290 295 300
 Thr Ile Asp Gly Asn Arg Tyr Tyr Phe Glu Pro Asn Thr Ala Met Gly
 305 310 315 320
 Ala Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Asn Lys Asn Phe Tyr Phe Arg Asn
 325 330 335

ES 2 631 032 T3

Gly Leu Pro Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Ser Asn Gly Phe Glu Tyr
 340 345 350

Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln Ala Ile
 355 360 365

Arg Tyr Gln Asn Arg Phe Leu His Leu Leu Gly Lys Ile Tyr Tyr Phe
 370 375 380

Gly Asn Asn Ser Lys Ala Val Thr Gly Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys
 385 390 395 400

Val Tyr Tyr Phe Met Pro Asp Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Gly Leu
 405 410 415

Phe Glu Ile Asp Gly Val Ile Tyr Phe Phe Gly Val Asp Gly Val Lys
 420 425 430

Ala Pro Gly Ile Tyr Gly Arg Ser Met His Asn Leu Ile Thr Gly Phe
 435 440 445

Val Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly
 450 455 460

Ala Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe
 465 470 475 480

Asn Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly
 485 490 495

Phe Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly
 500 505 510

Glu Ala Ile Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr
 515 520 525

Tyr Phe Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp
 530 535 540

Gly Glu Met His Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly
 545 550 555 560

Leu Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly Val
 565 570 575

Met Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr Phe Asp

ES 2 631 032 T3

580					585					590					
Asp	Ser	Gly	Val	Met	Lys	Val	Gly	Tyr	Thr	Glu	Ile	Asp	Gly	Lys	His
		595					600					605			
Phe	Tyr	Phe	Ala	Glu	Asn	Gly	Glu	Met	Gln	Ile	Gly	Val	Phe	Asn	Thr
	610					615					620				
Glu	Asp	Gly	Phe	Lys	Tyr	Phe	Ala	His	His	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Asn
625					630					635					640
Glu	Glu	Gly	Glu	Glu	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Leu	Asn	Phe	Asn	Asn
				645					650					655	
Lys	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Gly	Trp	Lys
			660					665						670	
Asp	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Glu
		675					680					685			
Ala	Tyr	Ile	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Asn
	690					695					700				
Asp	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Val	Gly	Phe	Val	Thr	Ile	Asn	Asp	Lys	Val
705					710					715					720
Phe	Tyr	Phe	Ser	Asp	Ser	Gly	Ile	Ile	Glu	Ser	Gly	Val	Gln	Asn	Ile
				725					730					735	
Asp	Asp	Asn	Tyr	Phe	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Gly	Ile	Val	Gln	Ile	Gly
			740					745					750		
Val	Phe	Asp	Thr	Ser	Asp	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ala	Asn	Thr
		755					760					765			
Val	Asn	Asp	Asn	Ile	Tyr	Gly	Gln	Ala	Val	Glu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Val
	770					775					780				
Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Val	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu
785					790					795					800
Thr	Gly	Trp	Ile	Tyr	Asp	Met	Glu	Asn	Glu	Ser	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Phe
				805					810					815	
Asn	Pro	Glu	Thr	Lys	Lys	Ala	Cys	Lys	Gly	Ile	Asn	Leu	Ile	Asp	Asp
			820					825					830		

ES 2 631 032 T3

Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Thr Gly Leu Ile
835 840 845

Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn Glu Asn Gly Glu Met Gln
850 855 860

Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met Phe Tyr Phe Gly Glu Asp
865 870 875 880

Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr Pro Asp Gly Phe Lys Tyr
885 890 895

Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu Asn Phe Glu Gly Glu Ser Ile
900 905 910

Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr
915 920 925

Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val Ile Ile Asp Gly Glu Glu
930 935 940

Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Leu Val Ile Ser Glu Leu Glu
945 950 955 960

Gly Leu Ile Tyr Ile Asn Asp Ser Leu Tyr Tyr Phe Lys Pro Pro Val
965 970 975

Asn Asn Leu Ile Thr Gly Phe Val Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr
980 985 990

Phe Asn Pro Ile Asn Gly Gly Ala Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile
995 1000 1005

Asp Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe Asn Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr
1010 1015 1020

Gly Val Phe Ser Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala Pro Ala
1025 1030 1035

Asn Thr Leu Asp Glu Asn Leu Glu Gly Glu Ala Ile Asp Phe Thr
1040 1045 1050

Gly Lys Leu Ile Ile Asp Glu Asn Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Asn
1055 1060 1065

Tyr Arg Gly Ala Val Glu Trp Lys Glu Leu Asp Gly Glu Met His
1070 1075 1080

ES 2 631 032 T3

Tyr Phe Ser Pro Glu Thr Gly Lys Ala Phe Lys Gly Leu Asn Gln
 1085 1090 1095

 Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr Phe Asn Ser Asp Gly Val Met Gln
 1100 1105 1110

 Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp Asn Lys His Tyr Phe Asp Asp
 1115 1120 1125

 Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr Glu Ile Asp Gly Lys His
 1130 1135 1140

 Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln Ile Gly Val Phe Asn
 1145 1150 1155

 Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His Asn Glu Asp Leu
 1160 1165 1170

 Gly Asn Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser
 1175 1180

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena o de vacuna que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID N.º: 4 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido proporciona 100 % de supervivencia de hámsteres vacunados con dicho polipéptido tras administración intragástrica de una dosis de 10^2 , 10^3 o 10^4 de esporas de *Clostridium difficile*.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el polipéptido comprende 19 unidades repetitivas derivadas del dominio del extremo C de la toxina A de *Clostridium difficile*.
- 10 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipéptido comprende 23 unidades repetitivas derivadas del dominio del extremo C de la toxina B de *Clostridium difficile*.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido tiene al menos 90 %, más preferiblemente 95 %, lo más preferiblemente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID N.º: 4.
- 15 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el polipéptido tiene la secuencia establecida en la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 4.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende un adyuvante.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que el adyuvante comprende alumbre.
- 20 9. Un polipéptido aislado que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID N.º: 4, o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD).
10. El polipéptido o composición para uso de la reivindicación 9, para uso en la prevención de EACD en un sujeto en riesgo de padecer una EACD.
- 25 11. El polipéptido o composición para uso en la reivindicación 10, en el que dicho sujeto en riesgo de padecer una EACD es: i) un sujeto anciano; ii) un sujeto con SIDA; iii) un sujeto que toma o planea tomar fármacos inmunosupresores; iv) un sujeto con una hospitalización planeada o un sujeto que está en un hospital; v) un sujeto que está o se espera que vaya a una unidad de cuidados intensivos; vi) un sujeto que se está sometiendo o planea someterse a cirugía gastrointestinal; vii) un sujeto que está o planea ir a un centro de asistencia para una estancia prologada, tal como una residencia de ancianos; viii) un sujeto con comorbilidades que requiere un uso frecuente y/o prolongado de antibióticos; ix) un sujeto con EACD recurrente; x) un sujeto menor de 18 años; xi) un sujeto de 18 a 30 65 años; o xii) un sujeto mayor de 65 años.
12. El polipéptido o composición para uso de la reivindicación 10, en el que dicho sujeto en riesgo de padecer una EACD es mayor de 65 años.
- 35 13. El polipéptido o composición para uso de la reivindicación 9, en el que el tratamiento de EACD incluye reducir la gravedad y/o la duración de la enfermedad, mejorar los síntomas de la enfermedad o sus combinaciones.
14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además un antígeno adicional.
15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en anestésicos, analgésicos, antiinflamatorios, esteroides, antibióticos, antiartríticos, anorexígenos, antihistamínicos y antineoplásicos.

Figura 1 (cont.)

B. aminoácidos de C-TAB.G5

MVTGVFKGPNGFYFAPANTHNNIEGQAIYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
 KKYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNLNTAEATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASGTYSING
 KHFYNTDGMQIGVFKGPNGFYFAPANTHNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKA
 VTGLRTIDGKKYYFNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASGTYSIISGKHFYFNTDGMQI
 GVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYFGNNSKAA TGWWTIDGNRY
 FEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNR
 LHLGKIYFGNNSKAVTGWQTINGKYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVGVDGKAPGIY
 GRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQ TGVFSTEDGFKYF
 APANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNYRGAVEWKELDGENMHYFSPETGKAFKGLN
 QIGDYKYFNSDGMQKGFVSINDNKHYYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGENMQIGVFN
 TEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEESYSGILNFNKKIYFDDSTAVGWKDLLEDGSKYYFDED
 TAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIDDNFYIDDNGIVQ
 IGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQQAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGMWYDMENESD
 KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNYYFNENGENMQFGYINIEDKMFY
 FGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSV
 IIDGEEYYFDPDPTAQLVISE*

Figura 2

A. ácidos nucleicos de C-TAB.G5.1

ATGTTACAGGTGTTTTCAAAGGTCCGGAACGGCTTTGAATAATTTTGCACCGGGCAATACCCACAATAATAATTTGAAGGCCAGGGC
 ATCGTGATCAGAAATAAATTTCTGACCCTGAACGGCAAAAATACATAATTCGATAACGATAGCAAAAGCAGTTACCGGTTGGCAAAACC
 ATTGATGGCAAAAATAATTACTTCAACCTGAATACCGCAGAAAGCAGCAACCGGCTGGCAGACCGATCGACGGTAAAAAAGTACTATTTT
 AACCCTGAACACAGCCGGAAGCCGCTACAGGCTGGCAGACAATAGATGGGAAGAATATTTAATACCAATACCCTTTATTGCCAGC
 ACCGGCTATACCAGCATTAAATGGCAAAACACTTCATTTTAAACACCAGATGTAATTCAGATCGGTGTTTTAAGGGCCCTAAATGGT
 TTTGAGTACTTCGCTCCGGCTAATACCGGATGCAAAATAACATCGAAGGTCAGGCAATTCGTACAGAAACAATTTTTAAACGCTGAAC
 GGTAAGAAATAATTACTTTGGTAGCGATTCAAAAAGCCGTTACCGGCTCGGTACGATCGACGGCAAGAAATAATTAATTTCAATACAAC
 ACCGGAGTTGCGGTGACAGGTTGGCAGACGATAAATGGTAAGAAGTACTACTTCAACACGCAATACCGGATTCGAAGTACCGGTTA
 TACCATTATCAGCCGGCAAAACACTTTTACTTCAATACAGACGGCAATATGCAGATTGGGTTTTCAAAAGTCCGGATGGTTTCGAGTA
 CTTTGGCCCTGCAAAATACAGATGCAAAACAATAATTGAGGGACAGGCAATTCGCTATCAGAAATCGTTTTCTGTATCTGCACGATAACAT
 CTATTACTTCGGCAATAATCAAAAAGCAGCCACCGGTTGGTTACAATTGATGGTAATCGTTATTACTTTGAGCCGAATACCGCAAT
 GGGTGCAAAATGGTTATAAAAACCATCGATAACAAAAATTTTATTCGGCAACGGCTGCGGCAGATTGGTGTTTTTAAGGGTAGCAAT
 GGCCTCGAGTATTTTGGCCAGCCAAACCCGATGCCAACACATTTGAAGGCCAAAGCAATTCGTTATCAAAAACCGCTTCTGCACTC
 GCTGGCCAAAATTTTACTTTTGGCAACAATAGCAAAAGGGTGACGGGCTGGCAAAACCAATTAACGGTAAAGTTATATTTCAATGCC
 GGATACCGCTATGGCAGCAGCCGGTGTCTGTTGAAAATTGATGGGTGATTTATTTTTTGGCGTGGATGGTAAAGCACCGG
 GATTTATGGTCGTAGCATGATAATCTGATACCAGTTTGTACCCTGGCCAGCATAAATACTACTTTAATCCGATTAATGGTGG
 TGCAGCAAGCATTGGTGAACCATTCGATGACAAAACATAATTTTAAACCAGAGCCGGTCTGCAAGACAGGTGTTTTTAGCAC
 CAGAGATGGCTTCAAAATATTTGGCTCCCGCAATACACTGGATGAAAACTGGAAGGTGAAACCAATGATTTTACCGGCAAACTGAT
 CATCGACGAGAACATCTACTATTTTGATGATAATATCGCCGTTGCCGTGGAATGGAAAGAACTGGAATGGTGAATGCACTATTTTAG
 TCCGAAACCGGTAAGCCTTTAAAGTCTGAATCAGATCGGCGATTACAAGTATTACTTTAATCAGATGGCGTGCAGAAAGG
 CTTTGTGAGCATTAAAGCAACAACACTATTTTGAACAGCCGGTGTGTAAGTGGTTATACCGAAATCGACGGGAAACAATTT
 TTAATTTGCCGAAACGGGAAATGCAGATTGGAGTATTAATACCAGGAGCGGCTTAAATACTTGCCCATCAATGAAGATCTG
 GGTAAATGAAGAGCCGGAAGAAATAGCTATAGCGGCAATCTGAAATTTAATAACAAGATCTATAATTCGATGATAGCTTACCCGAC
 TTGTTGGTTGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAATATTTTGAAGAATACCAGAGGCGCTATAATGGTCTGAGCCTGATTA
 ATGATGGCCAGTATTTTCAACGATGATGTTATCATGCAAGTTGGTTTTGTGACCAATCAACGATAAAGTGTCTTATTTACGGGATAG
 CGGCATTAATGAAAGCGGTTCAGAACATCGACGATAACTATTTCTACATCGATGAACGGTATTAACGGTATGGCGTGTGTTGAT
 ACCTCGGATGGTTATAAATAATTCGGCACCGCCAAATACCGTGAACCGATAATTTATGGTCAGGCGATGTAATTCAGGCTCTGGTT
 GTGTTGGCCGAAAGATGTTTATTTTGGGAAACCTTACCGTGAACCGGCTGGATCTGATGAAACCGGCTGATGATGGAAACGAGAGGCAAGT
 ACTATTTCAATCCGGAAACGAAAAAGCCCTGCAAAAGGCAATTAATCTGATCGACGATTAATGAGTACTACTTTGACGAAAAAGGCAAT
 GCGTACCGGCTGATAGCTTTGAGAAACAACACTATTACTTCAATGAGAACGGTGAGATGCAGTTTGGCTATATCAACATCGAGGA
 CAAAATGTTTTATTTTGGTGAGGACGGTGTGATCGCAGATAGGGGTTTTTAAATACACCGGATGGGTTAAGTATTTTGCACATCAGAAC
 ACCCTGGATGAAAACCTTGAAGGGCAAGCATAATATACCGGTTGGCTGGATCGAATGAGAAACGTTATTTTACACCGACGAA
 TACATTGCAGCAACCCGTAGCGTTATTTGATGGTGAAGGAAATATTACTTCGATCCGGATACAGCACAGCTGGTTATTAGCGAATAA

Figura 2 (cont.)

B. aminoácidos de C-TAB.G5.1

(M^h)VTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNIEGQAIYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQQTID
 GKYYFNLNTAEAAATGWQQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQQTIDGKKYYFNNTFIASTGYTSIN
 GKHFYFNTDGMIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSK
 AVTGLRTIDGKKYYFNNTAVAVTGWQTINGKYYFNNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGMIMQ
 IGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNRFLYLHDNIYFNGNSKAAATGWVVTIDGNRY
 YFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAIYQNR
 FLHLLGKIYFNGNSKAVTGWQTINGKYYFMPD TAMAAAGLFEIDGVIYFFGVGVKAPGI
 YGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVFSTEDGFKY
 FAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNRYGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLN
 QIGDYKYFNSDGMQKGFVSINDNKH YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFN
 TEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYFDDSF TAVGWKDLLEDGSKYYFDED
 TAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIIDNIFYIDNGIV
 QIGVFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGOAVEYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWYDMENES
 DKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNNIYFNENGENMQFGYINIEDKMF
 YFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGS
 VIIDGEEYFDPPDTAQLVISE

*El Met del extremo N se extrajo por escisión durante la expresión

Figura 3

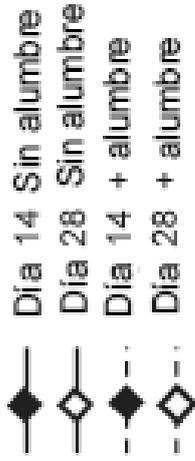
Títulos de anticuerpos el día 14 (1ª inmunización) y el día 28 (2ª inmunización) en ratones

Inmunización con C-TAB	Anti-C-TAB			Antitoxina A			Antitoxina B		
	Pre*	Día 14	Día 28	Pre	Día 14	Día 28	Pre	Día 14	Día 28
0	2	1	1	1	2	1	1	1	1
100 (154) ng	5	4	4	4	8	122	1	1	4
300 (462) ng	4	4	5	3	4	530	1	1	5
1.000 (1.540) ng	5	14	4	9	100	2.382	1	1	4
3.000 (4.320) ng	3	1.105	284	7	655	11.563	1	1	284
10.000 (15.400) ng	5	11.195	2.724	9	6980	48.595	2	48	2.724
PBS + 50 µg alumbre	9	3	2	3	1	1	1	2	2
10 (15,4) ng + 50 µg alumbre	6	45.375	436	13	21.157	87.429	1	1	436
30 (46,2) ng + 50 µg alumbre	5	42.410	3.835	14	18.691	111.424	1	1	3.335
100 (154) ng + 50 µg alumbre	2	44.777	13.568	15	34.660	150.931	1	4	13.368
300 (462) ng + 50 µg alumbre	2	97.667	20.955	10	23.167	234.546	1	154	20.355
1.000 (1.540) ng + 50 µg alumbre	8	110.18	31.088	15	26.864	188.545	1	1.558	31.388

* Toma de sangre previa

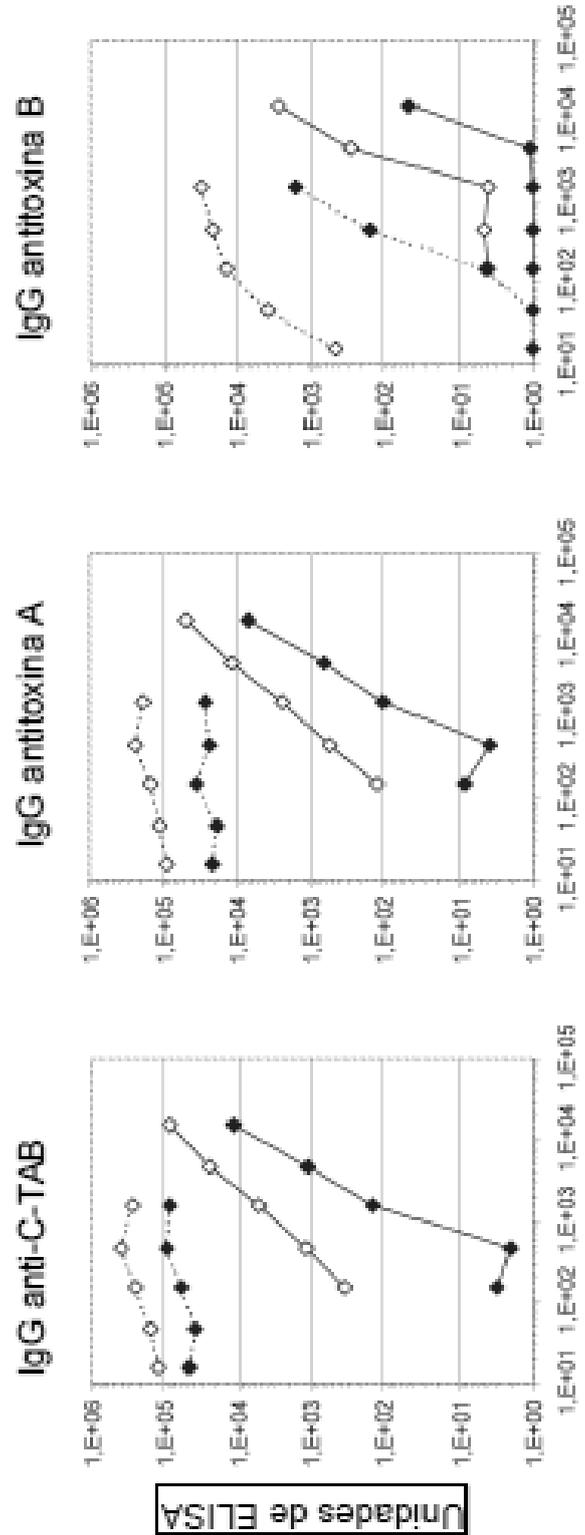
Figura 4

Comparación de títulos de anticuerpos en ratones



Intervalo de dosis de C-TAB.G5:

Sin alumbre 100 – 10.000 ng
 50 µg de alumbre 10 – 1.000 ng



C-TAB.G5, ng

Figura 5

Títulos de anticuerpos el día 28 (posterior a la 2ª inmunización) en ratones

GP	Vacuna		Títulos de anticuerpo		
	C-TAB.G5	Adyuvante	Anti-C-TAB	Antitoxina A	Antitoxina B
1	PBS	---	0	0	0
2	3 µg	Sin adyuvante	27.930	19.001	422
3	10 µg	Sin adyuvante	51.518	34.058	1.464
4	30 µg	Sin adyuvante	69.936	50.907	1.801
5	3 µg	50 µg alumbre	584.447	241.362	45.181
6	10 µg	50 µg alumbre	789.145	311.657	67.462
7	30 µg	50 µg alumbre	1.081.219	404.399	53.349

Figura 6

ANT y protección contra exposición con toxina A o toxina B en ratones

Vacuna	Toxina A		Toxina B	
	ANT	Protección*, %	ANT	Protección*, %
PBS	0	16,6	0	0
3 µg C-TAB.G5	103	100	0	0
10 µg C-TAB.G5	171	100	0	12,5
30 µg C-TAB.G5	150	100	0	50
3 µg C-TAB.G5 + alumbre	683	100	339	100
10 µg C-TAB.G5 + alumbre	778	100	300	100
30 µg C-TAB.G5 + alumbre	1010	100	669	87,5

*Dosis de exposición:
 toxina A: 25 ng/ratón
 toxina B: 50 ng/ratón

Figura 7

Comparación de la inmunogenicidad de C-TAB.G5 en ratones jóvenes con respecto a adultos

Edad	Inmunización con C-TAB.5	Títulos de IgG			ANT			Protección*, %	
		C-TAB	Toxina A	Toxina B	Toxina A	Toxina B	Toxina A	Toxina B	
J	PBS	0	1	1	0	0	25	0	
A	PBS	25	4	1	0	0	0	25	
J	10 µg	48.911	34.519	2.338	184	0	0	0	
J	30 µg	91.110	47.559	3.722	285	0	100	0	
A	10 µg	3.186	2.970	6	6	0	100	71	
A	30 µg	19.336	8.924	151	58	0	62,5	25	
J	10 µg+alumbre	580.987	302.148	41.603	779	1.428	100	85	
J	30 µg+alumbre	747.339	451.541	55.705	682	1.042	100	100	
A	10 µg+alumbre	99.981	61.105	2.455	283	0	100	75	
A	30 µg+alumbre	351.373	134.531	11.211	682	0	100	100	

*Dosis de exposición:

toxina A: 25 ng/ratón

toxina B: 50 ng/ratón

Figura 8
Cinética de desarrollo de anticuerpo anti-C-TAB en ratones jóvenes con respecto a adultos

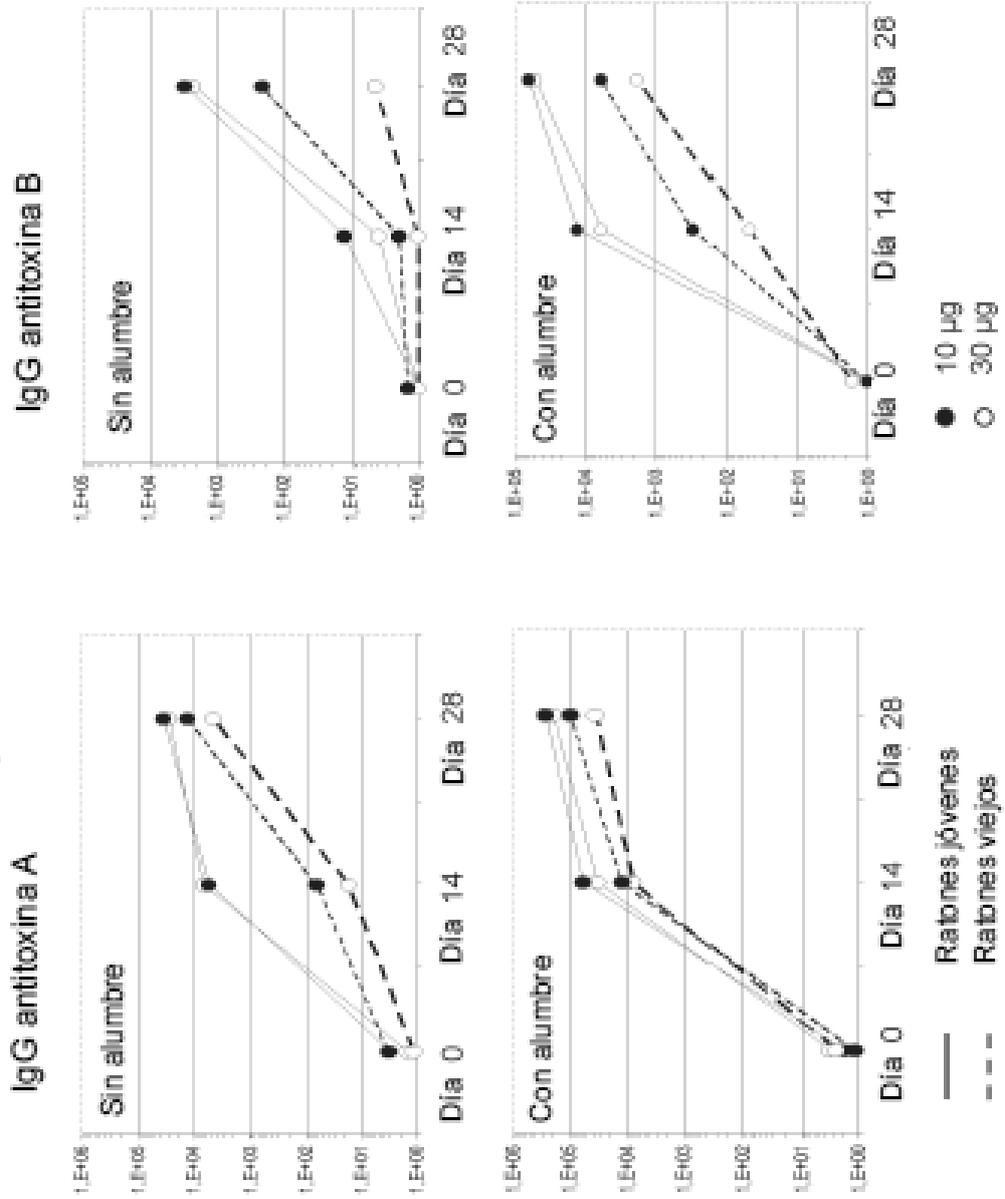


Figura 9

Comparación de la inmunogenicidad de C-TAB.G5.1 y anatoxina A y B de C.
difficile

Antígeno	Dosis, µg	Día de estudio	Anti-C-TAB		Antitoxina A *		Antitoxina B *	
			Sin alumbre	Alumbre	Sin alumbre	Alumbre	Sin alumbre	Alumbre
C-TAB	10	14	4	30.271	1	2.238	1	10
		28	987	574.975	1.249	1.134.277	2	15.081
	30	14	1.274	64.228	1.391	31.391	2	3.836
Anatoxina		28	23.301	898.554	44.069	1.055.061	379	53.063
	10	14	6.902	48.496	9.275	48.081	19	2.359
		28	20.140	978.277	72.954	1.128.721	380	40.295
	30	14	17.310	86.595	22.319	64.214	70	5.833
		28	65.536	731.416	348.019	1.292.560	4.967	43.098

*La inmunización con la anatoxina induce anticuerpos para la porción del extremo N de la molécula de toxina que se recoge en el ELISA antitoxina, mientras que la inmunización con C-TAB induce anticuerpos para la porción del extremo C de la molécula de toxina.

Figura 10

ANT y datos de protección en estudio comparativo entre C-TAB.G5.1 y anatoxina A/B

Antígeno	Dosis, µg	Alumbre	Exposición a toxina A		Exposición a toxina B	
			ANT	Protección, %	ANT	Protección, %
PBS	-	-	0	12,5	0	7,1
C-TAB	10	-	0	100	0	12,5
		+	532	100	0	100
	30	-	98	100	0	25
Anatoxina	10	+	735	100	487	100
		-	362	100	0	0
	30	+	769	100	261	100
		-	1291	100	0	37,5
		+	1330	100	692	100

*Dosis de exposición:

toxina A: 25 ng/ratón

toxina B: 50 ng/ratón

Figura 11

A. Respuesta de anticuerpo IgG anti-C-TAB en hámsteres

Grupo	Vacuna	Pre*	Día 14	Día 28	Día 35
1	PBS	12	18	8	6
2	10 µg C-TAB.G5.1	44	320	16.105	15.100
3	10 µg C-TAB.G5.1 + alumbre	30	25.958	227.632	257.474
4	30 µg G5.1	35	745	20.377	56.476
5	30 µg C-TAB.G5.1 + alumbre	54	101.331	602.397	411.660
6	100 µg C-TAB. G5.1	19	2.508	31.978	42.131
7	100 µg C-TAB.G5.1+alumbre	9	156.909	1.021.300	789.369

* Toma de sangre previa

Figura 11

B. Respuesta de anticuerpo IgG antitoxina A en hámsteres

Grupo	Vacuna	Pre*	Día 14	Día 28	Día 35
1	PBS	5	15	6	3
2	10 µg C-TAB.G5.1	5	117	2.988	3.233
3	10 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	10	32.375	294.613	226.237
4	30 µg C-TAB.G5.1	6	486	6.872	16.336
5	30 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	4	89.773	517.244	276.755
6	100 µg C-TAB.G5.1	10	224	2.053	2.375
7	100 µg C-TAB.G5.1+alumbre	3	88.889	412.352	277.145

C. Respuesta de anticuerpo IgG antitoxina B en hámsteres

Grupo	Vacuna	Pre*	Día 14	Día 28	Día 35
1	PBS	10	9	5	6
2	10 µg C-TAB.G5.1	25	271	9.527	16.104
3	10 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	6	5.046	69.084	75.377
4	30 µg C-TAB.G5.1	18	375	14.521	47.542
5	30 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	17	15.204	270.035	191.430
6	100 µg C-TAB.G5.1	8	263	5.029	32.928
7	100 µg C-TAB.G5.1+alumbre	22	48.726	1.912.238	757.756

* Toma de sangre previa

Figura 12
Cinética del desarrollo de anticuerpo anti-C-TAB en hámsteres

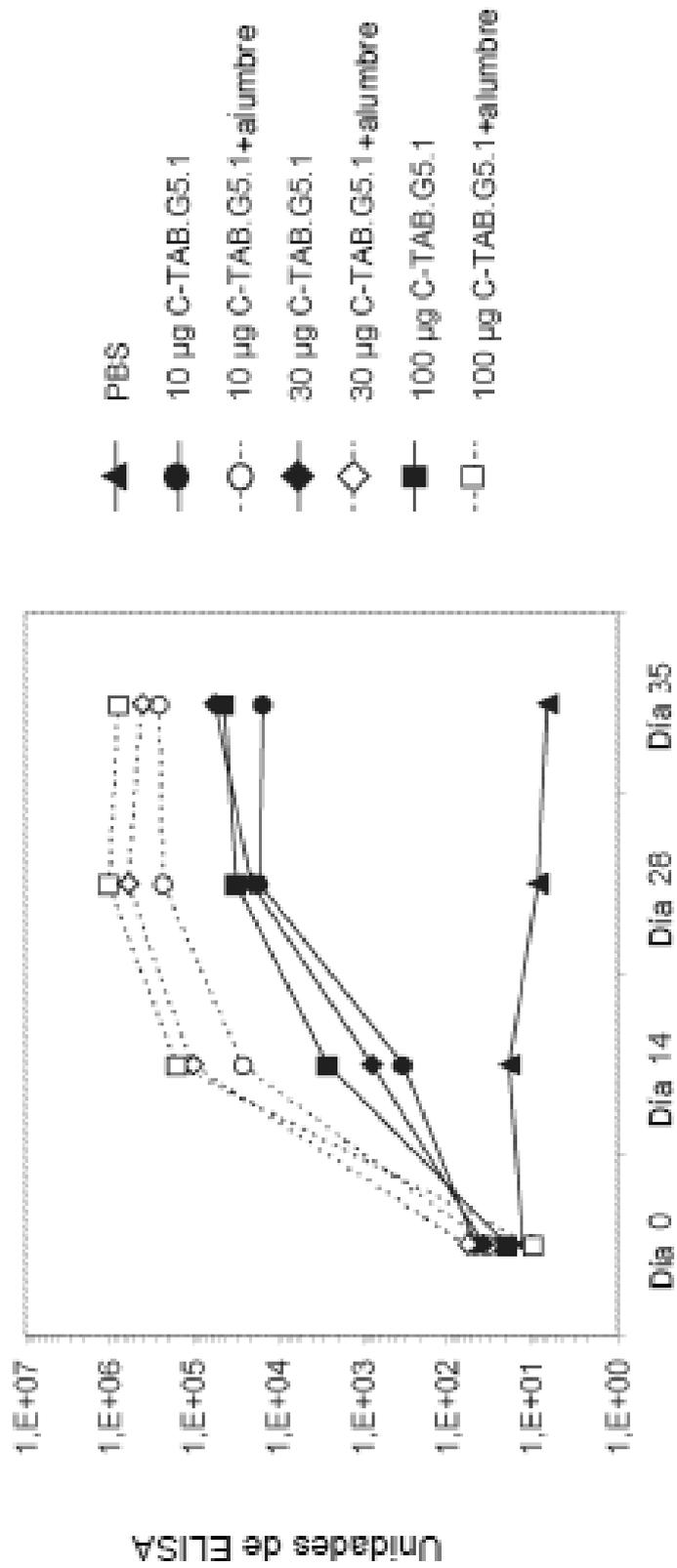


Figura 13

ANT y protección contra exposición a toxina *in vivo* en hámster

Vacuna	Exposición a toxina A*		Exposición a toxina B*	
	ANT	Protección, %	ANT	Protección, %
PBS	0	16,5	0	50
10 µg C-TAB.G5.1	267	100	0	83
30 µg C-TAB.G5.1	509	100	0	100
100 µg C-TAB.G5.1	179	83	0	50
10 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	5.325	100	2.361	100
30 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	2.824	100	4598	100
100 µg C-TAB.G5.1+alumbre	3.262	100	16214	100

*Dosis de exposición:

toxina A: 75 ng/hámster

toxina B: 125 ng/hámster

Figura 14
Curvas de supervivencia de estudio de exposición a esporas de *C. difficile* en hámsteres

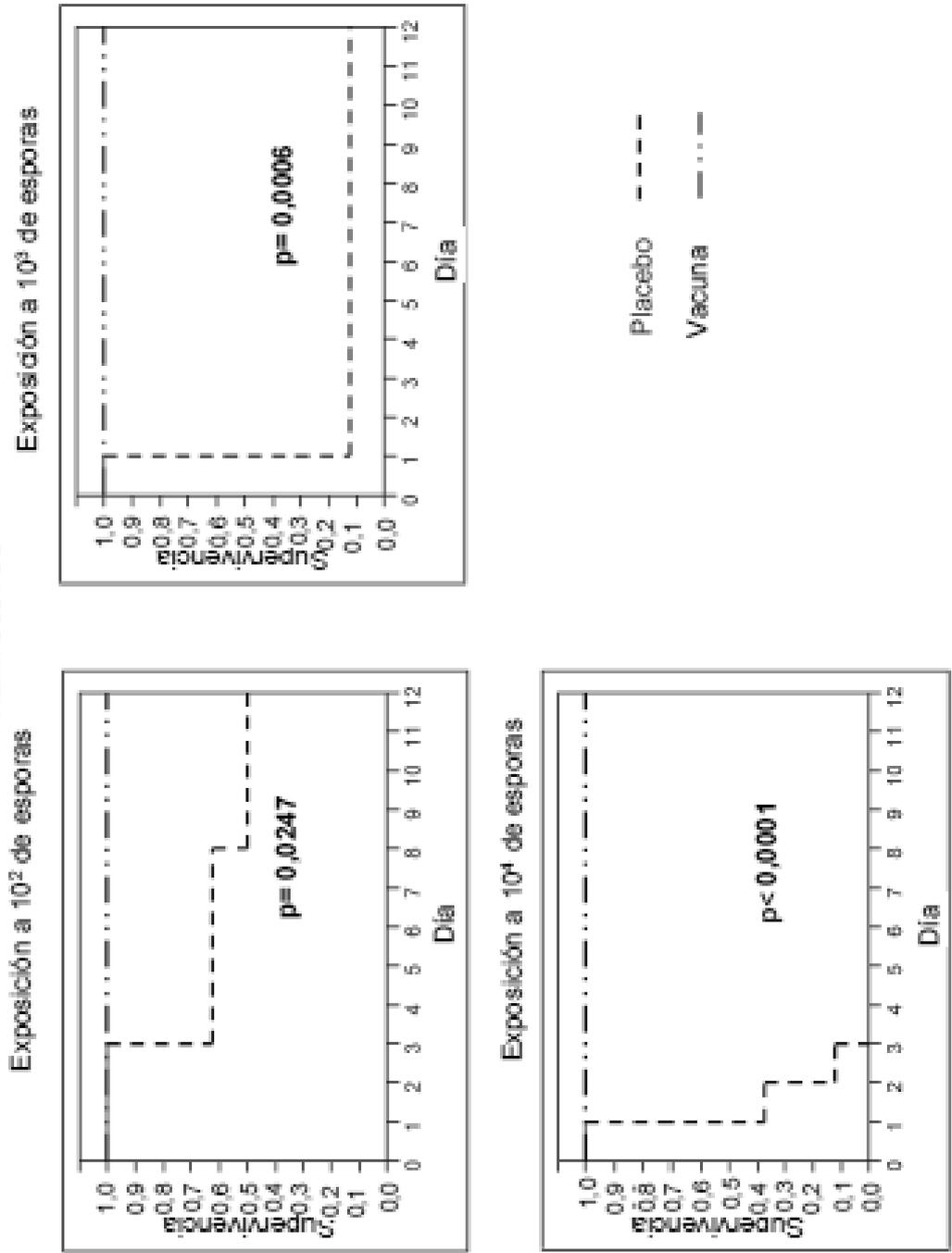


Figura 15**Respuestas de anticuerpo anti-C-TAB en monos**

Día de estudio	+Alumbre		+Alumbre		+Alumbre	
	Anti-C-TAB	486	Antitoxina A	1.751	Antitoxina B	744
Toma de sangre previa	330	486	1.222	1.751	566	744
Día 14	1.179	463.164	2.670	278.162	872	17.992
Día 28	31.518	2.388.109	23.726	1.128.521	10.104	176.050
Día 42	344.025	1.975.902	137.221	2.331.556	166.415	517.139

Figura 16
Comparación de la inmunogenicidad de C-TAB.G5 y C-TAB.G5.1

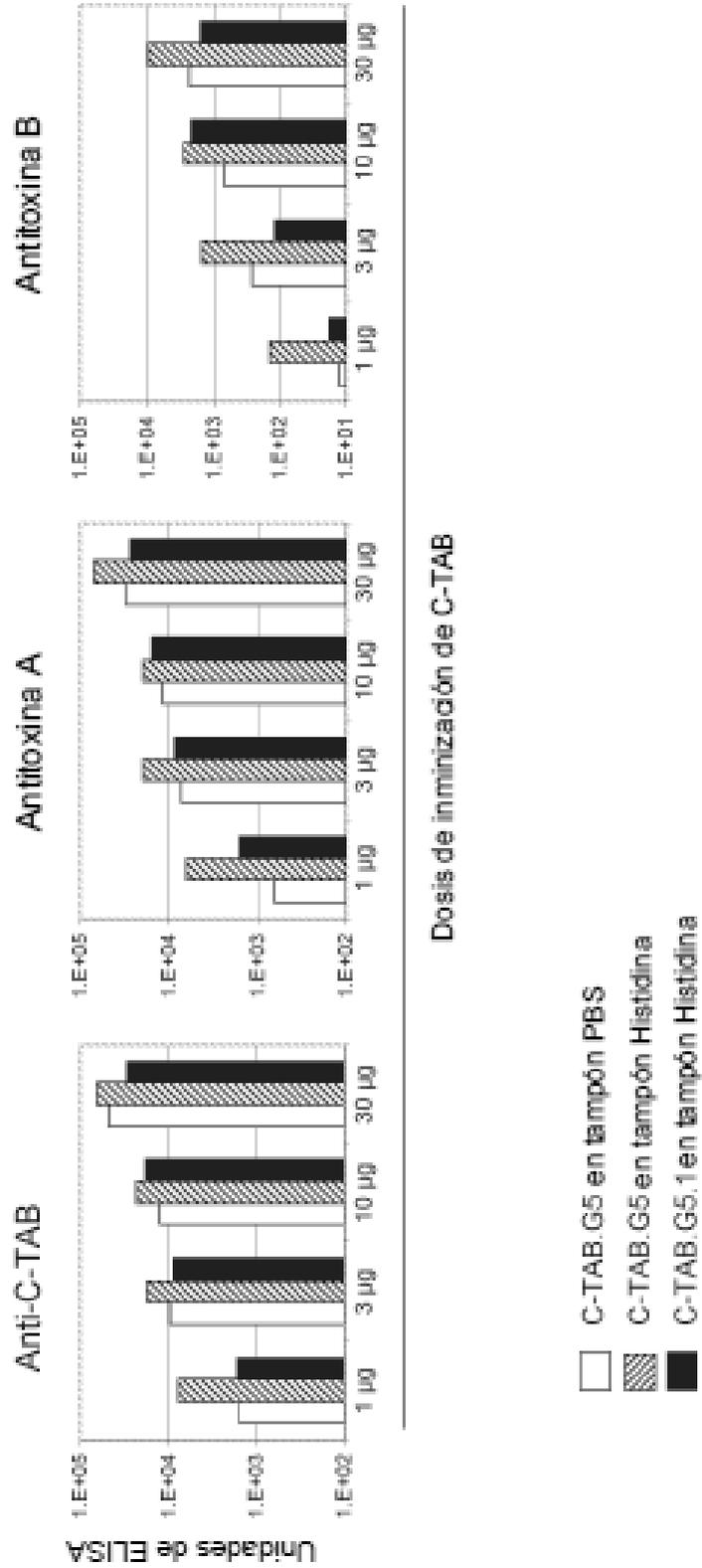


Figura 17
Inmunogenicidad de C-TAB.G5, C-TABNCTB y C-TADCTB en ratones

Anti-C-TAB			
Dosis	C-TAB.G5	C-TANCTB	C-TADCTB
0,3 µg	2.397	2.196	2.062
1 µg	5.030	15.933	2.396
3 µg	37.542	20.699	27.717
10 µg	58.132	87.783	92.496
30 µg	95.179	278.713	278.534

Antitoxina A			
Dosis	C-TAB.G5	C-TANCTB	C-TADCTB
0,3 µg	2.127	1.235	1.464
1 µg	3.960	10.644	1.257
3 µg	28.701	13.178	13.590
10 µg	40.992	55.013	32.597
30 µg	64.063	152.425	163.932

Antitoxina B			
Dosis	C-TAB.G5	C-TANCTB	C-TADCTB
0,3 µg	31	23	266
1 µg	122	175	269
3 µg	2.170	1.284	4.241
10 µg	1.409	5.004	17.926
30 µg	4.616	8.327	138.098

Figura 18
Protección contra exposición con toxina B* en ratones

Vacuna §	C-TAB.G5		C-TABNCTB		C-TADCTB	
	Supervivencia/ total	Protección, %	Supervivencia/ total	Protección, %	Supervivencia/ total	Protección, %
0,33 µg	2/6	33	1/6	17	4/6	67
1 µg	4/6	67	2/6	33	2/6	33
3,3 µg	2/6	33	3/6	50	4/6	67
10 µg	3/6	50	2/6	33	5/6	83
33 µg	2/5	33	2/6	33	6/6	100

*Dosis de exposición: 50 ng/ratón

§ Testigo negativo - vacunación con PBS: 2/6, 33 % de protección

Figura 19

Comparación de ANT y eficacia protectora de C-TAB.G5.1 y C-TADCTB en hámsteres

Vacuna	Exposición a toxina A*		Exposición a toxina B*	
	ANT	Protección, %	ANT	Protección, %
PBS	0	16,6	0	50
10 µg C-TAB.G5.1	267	100	0	83
10 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	5.325	100	2.061	100
30 µg C-TAB.G5.1	509	100	0	100
30 µg C-TAB.G5.1 +alumbre	2.324	100	4.598	100
100 µg C-TAB.G5.1	3.262	83	0	30
100 µg C-TAB.G5.1+alumbre	3.262	100	16.214	100
30 µg C-TADCTB	159	100	2.886	100
30 µg C-TADCTB+alumbre	1.101	100	5.614	100

*Dosis de exposición:

toxina A - 75 ng/hámster

toxina B - 125 ng/hámster

Figura 20

ANT y protección contra exposición con toxina A o B en ratones inmunizados en diferentes regimenes

Inmunización con C-TAB.5.1, días	Exposición a toxina A §		Exposición a toxina B §	
	ANT*	Protección, %	ANT**	Protección, %
PBS	0	25	0	0
0/3/14	51	75	0	12,5
0/3/14 +alumbre	742	100	399	28,3
0/7/21	71	100	9	12,5
0/7/21 +alumbre	1316	100	1318	37,5
0/14/28	107	100	24	37,5
0/14/28 +alumbre	1798	100	1275	87,5

§ Dosis de exposición:
 toxina A: 28 ng/ratón
 toxina B: 50 ng/ratón

*Media geométrica de un experimento, n=2
 **Media geométrica de tres experimentos, n=6

A.

Figura 20

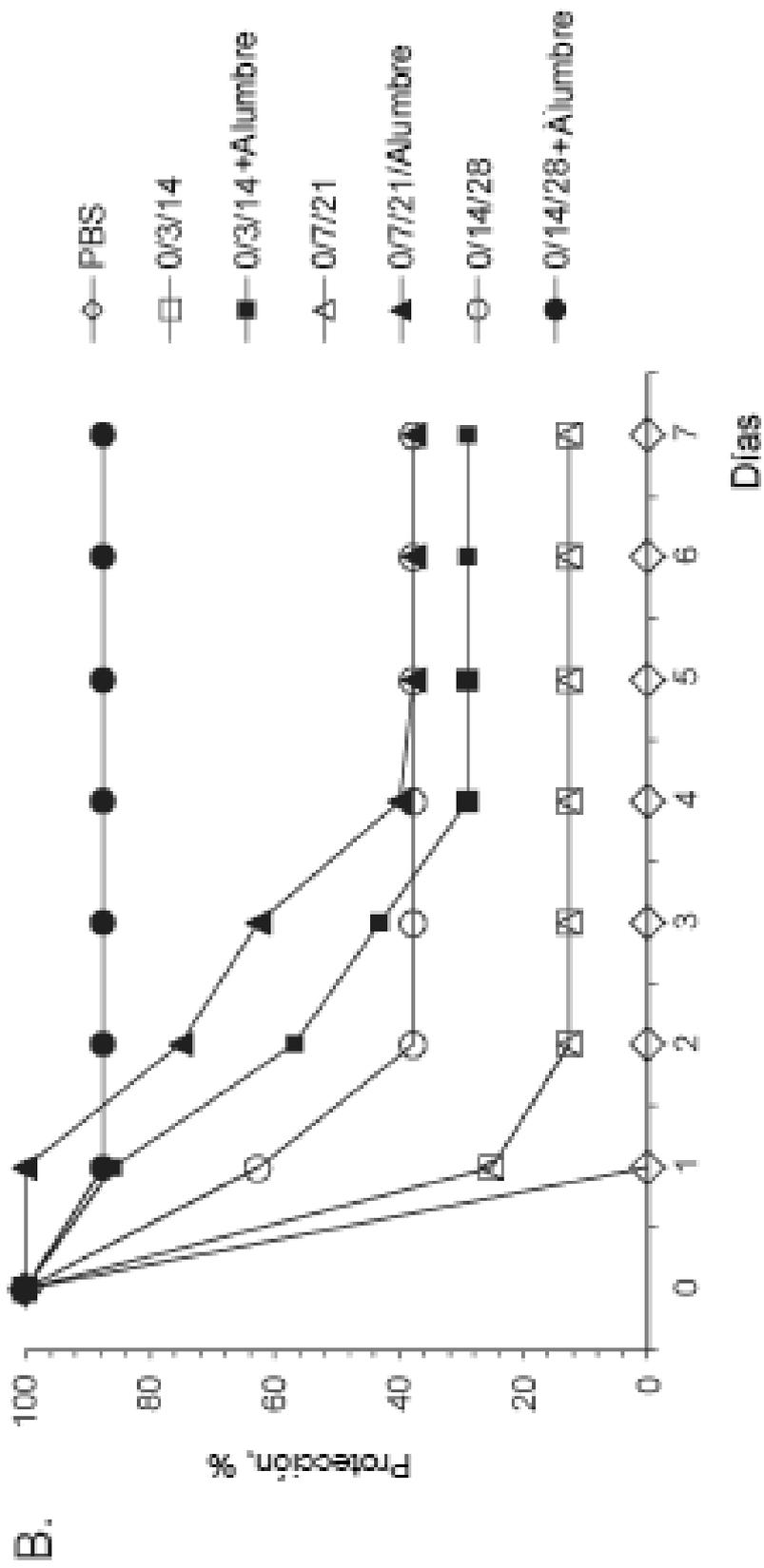


Figura 21

Protección contra exposición con toxina A en ratones que recibieron una dosis de la vacuna

Grupo de inmunización	Exposición con toxina A	
	Supervivencia/total	Protección, %
Natural	3/12	25
Día 21	6/8	75
Día 35	6/8	75
Día 49	8/8	100