(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 721 930**

(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: **03.12.2013** **PCT/EP2013/075405**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014** **WO14086787**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013** **E 13801540 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 2928489**

(54) Título: **Composición inmunogénica**

(30) Prioridad:

05.12.2012 GB 201221875

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 721 930 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica

Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden un polipéptido de *Clostridium difficile (C. difficile)* y un coadyuvante libre de aluminio. La invención también se refiere a composiciones de vacuna y al uso de las vacunas y composiciones inmunogénicas de la invención en la profilaxis o tratamiento o en la fabricación de un medicamento.

Antecedentes

C. difficile es la causa más importante de infecciones intestinales nosocomiales y es la causa principal de colitis pseudomembranosa en los seres humanos (Bartlett *y col* Am. J. Clin. Nutr. 11 supl.: 2521-6 (1980)). Se calculó que la tasa de mortalidad asociada global para individuos infectados con *C. difficile* era de un 5,99 % a los 3 meses del diagnóstico, con una mayor mortalidad asociada con una edad avanzada, siendo de un 13,5 % en pacientes de más de 80 años (Karas *y col Journal of Infection* 561:1-9 (2010)). El tratamiento actual para una infección por *C. difficile* es la administración de antibióticos (metronidazol y vancomicina), sin embargo, existen pruebas de cepas que son resistentes a estos antibióticos (Shah *y col.*, Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8(5), 555–564 (2010)). En consecuencia, se necesitan composiciones inmunogénicas que puedan inducir anticuerpos y/o una respuesta inmunitaria protectora contra *C. difficile*.

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

Se han descrito composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos de *C. difficile*. Los documentos WO96/12802 y WO00/61762 y Lyerly *y col* (Current Microbiology 21:29-32 (1990)) se refieren a fragmentos de la toxina A, en particular, a fragmentos del dominio C-terminal, para inducir una respuesta inmunitaria protectora en hámsteres. El documento WO 9920304 se refiere a una mezcla de la toxina A y la toxina B copurificadas inactivadas por incubación en formaldehído. El documento WO 00/61762 se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden el dominio C-terminal de longitud completa o bien fragmentos del dominio C-terminal de la toxina A y la toxina B de *C. difficile*. De forma similar, los documentos WO2012/163817, WO2012/163811 y WO2012/163810 proporcionan divulgaciones de posibles fragmentos de toxina A y toxina B así como proteínas de fusión de las mismas. Son necesarias nuevas composiciones o vacunas con una inmunogenicidad mejorada. Como una estrategia, se han usado coadyuvantes para probar y mejorar la respuesta inmunitaria generada contra cualquier antígeno dado. Por ejemplo, el documento WO2009035707 describe una composición que comprende un toxoide de las toxinas A y B de *C. difficile* y un coadyuvante tal como un compuesto de hidróxido de aluminio.

Anteriormente se han desvelado coadyuvantes que contienen combinaciones de lipopolisacárido y saponinas de Quillaja, por ejemplo, en el documento EP0671948. Las emulsiones de aceite en agua son *per se* bien conocidas en la técnica y se ha sugerido que son útiles como composiciones coadyuvantes (documentos EP 399843; WO 95/17210).

Todavía existe una necesidad de obtener composiciones de vacuna e inmunogénicas que proporcionen una respuesta inmunitaria adecuada contra *C. difficile*.

Sumario

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que comprende un fragmento de la toxina A de *Clostridium difficile (C. difficile)* y/o un fragmento de la toxina B de *C. difficile* y un coadyuvante que comprende una fracción de saponina inmunológicamente activa presentada en forma de un liposoma. La fracción de saponina inmunológicamente activa puede ser QS21 y el lipopolisacárido puede ser 3D-MPL. De forma adecuada, la composición inmunogénica puede comprender aproximadamente 50 µg de 3D-MPL, y aproximadamente 50 µg de QS21.

En el presente documento también se divulga una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que comprende un fragmento de la toxina A de *C. difficile* y/o un fragmento de la toxina B de *C. difficile* y un coadyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, un tocol y un emulsionante. El aceite metabolizable puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5,35 mg. El tocol puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5,94 mg. De forma adecuada, el agente emulsionante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2,425 mg. De forma adecuada, el aceite metabolizable es escualeno, el tocol es alfa-tocoferol y el agente emulsionante es monooleato de polioxietilensorbitano.

De forma adecuada, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquier aspecto de la invención comprende un fragmento de dominio de repetición de la toxina A de *C. difficile* y un fragmento de dominio de repetición de la toxina B de *C. difficile* y provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A y la toxina B. En una realización adicional de la invención, la composición inmunogénica comprende un fragmento de la toxina A de *C. difficile* y un fragmento de la toxina B de *C. difficile* en la que uno de los fragmentos es un fragmento N-terminal y el otro es un fragmento de dominio de repetición.

De forma adecuada, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquier aspecto de la invención comprende una variante de polipéptido de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 o SEQ ID NO:27.

De forma adecuada, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquier aspecto de la invención comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35 o una variante o fragmento de cualquiera de estas secuencias.

Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención pueden comprender antígenos adicionales tales como antígenos derivado de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae)*, *Haemophilus influenzae (H. influenzae)*, *Neisseria meningitidis (N. meningitidis)*, *Escherichia coli (E. coli)*, *Moraxella catarrhalis (M. cattarhalis)*, *Clostridium tetani (C. tetani), Corynebacterium diptherieriae (C. diptherieriae), Bordetella pertussis (B. pertussis), Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis)*, enterococos y *Staphylococcus aureus (S. aureus)*.

En un aspecto, la invención se refiere a una vacuna que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención se refiere a un uso de la composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la invención en el tratamiento o la prevención de una enfermedad por *C. difficile*.

En un aspecto, la invención se refiere a la composición inmunogénica o a la vacuna de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad por *C. difficile*.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de la composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad de *C. difficile*.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad por *C. difficile* que comprende administrar la composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la invención a un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 – Gráficos que muestras los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres inmunizados con F2 formulado con coadyuvante A; coadyuvante A sin QS21 y coadyuvante A sin MPL.

FIG. 2 - Gráficos que muestran los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres inmunizados con F2 sin coadyuvante o F2 formulado con coadyuvante A, coadyuvante B y alumbre.

FIG. 3 – Gráficos que muestran los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB ELISA para sueros Post I de hámsteres machos y hembras inmunizados con un intervalo de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

FIG. 4 – Gráficos que muestran los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para sueros Post II de hámsteres machos y hembras inmunizados con un intervalo de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

FIG. 5 – Gráficos que muestran los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para sueros Post III de hámsteres machos y hembras inmunizados con un intervalo de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

FIG. 6 – Gráficos que muestran los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para sueros Post III del día 87 de hámsteres machos y hembras inmunizados con un intervalo de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

FIG. 7 – Gráficos que muestran los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres machos inmunizados con un intervalo de dosis de proteínas de fusión F2 formuladas en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C en sueros Post I, II y III.

FIG. 8 – Gráficos que muestran los resultados de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB para hámsteres machos y hembras inmunizados con una mezcla (ToxA+ToxB) o con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o coadyuvante A.

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

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

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

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

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

FIG. 14 – Gráfico que muestra los resultados de ELISA de anti-ToxB para ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB formuladas en coadyuvante B.

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

FIG. 16 – Gráfico que muestra títulos de citotoxicidad en células HT29 de ratones inmunizados con las fusiones F2, F52New, F54Gly, F54New o F5ToxB formuladas en coadyuvante B.

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

FIG. 18 – Gráfico que muestra los resultados de ELISA de anti-ToxA para ratones inmunizados con ToxA-Cter (aa 2387-2706), ToxB-Cter (aa 1750-2360) de *C. difficile* y proteínas de fusión (sin coadyuvante).

FIG. 19 – Gráfico que muestra los resultados de ELISA de anti-ToxB para ratones inmunizados con ToxA-Cter (aa 2387-2706), ToxB-Cter (aa 1750-2360) de *C. difficile* y proteínas de fusión (sin coadyuvante).

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

FIG. 21 – Gráfico que muestra los resultados de ELISA de anti-ToxB para ratones inmunizados con ToxA-Cter (aa 2387-2706), ToxB-Cter (aa 1750-2360) de C. difficile y proteínas de fusión formuladas en coadyuvante B: sueros de Post II, III, Pre-refuerzo, Post IV.

FIG. 22 – Gráfico que describe el espectro UV lejano de las fusiones 2, 3, 4, y 5 medidas usando dicroísmo circular. El espectro para la fusión 2 está representado por una línea con los puntos representados como cuadrados pequeños, el espectro para la fusión 3 está representado por una línea con los puntos representados como formas de rombos pequeños, para la fusión 4 está representado por una línea con los puntos representados como círculos, y para la fusión 5 está representado por una línea con los puntos representados como formas de cruces.

FIG. 23 - Gráfico que describe el espectro UV cercano de fusiones 2, 3, 4, y 5 medidas usando dicroísmo circular. El espectro para la fusión 2 está representado por una línea con los puntos representados como formas de cruces, el espectro para la fusión 3 está representado por una línea con los puntos representados como círculos, el espectro para la fusión 4 está representado por una línea con los puntos representados como triángulos, y el espectro para la fusión 5 está representado por una línea con los puntos representados como formas de rombos pequeños.

FIG. 24 - Gráfico que describe el espectro UV lejano de fusiones F52New, F54Gly, F54New y F5ToxB medidas usando dicroísmo circular. El espectro para F52New está representado por una línea con los puntos representados como cruces dobles, el espectro para F54Gly está representado por una línea con los puntos representados como triángulos, F54New está representado por una línea con los puntos representados como cuadrados, y F5ToxB está representado por una línea con los puntos representados como formas de cruces.

FIG. 25 - Gráfico que describe el espectro UV cercano de fusiones F52New, F54Gly, F54New y F5ToxB medidas usando dicroísmo circular. El espectro para F52New está representado por una línea con los puntos representados como cruces dobles, el espectro para F54Gly está representado por una línea con los puntos representados como triángulos, F54New está representado por una línea con los puntos representados como cuadrados, y F5ToxB está representado por una línea con los puntos representados como formas de cruces.

Descripción detallada

Los inventores han demostrado que las composiciones inmunogénicas que comprenden un polipéptido que comprende un fragmento de la toxina A de *C. difficile* y/o un fragmento de la toxina B de *C. difficile* formulado con coadyuvantes libres de alumbre, en particular coadyuvantes tales como coadyuvante A y coadyuvante B descritos en el presente documento, proporcionan una respuesta inmunitaria mejorada contra *C. difficile* en comparación con composiciones que contienen polipéptidos de *C. difficile* sin coadyuvante. Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención también pueden proporcionar una respuesta inmunitaria mejorada contra *C. difficile* en comparación con polipéptidos de *C. difficile* formulados con alumbre.

POLIPÉPTIDOS

El polipéptido que comprende un fragmento de la toxina A de *C. difficile* y/o un fragmento de la toxina B de *C. difficile* puede comprender toxina A o toxina B purificada que haya sido inactivada, de forma adecuada por incubación en formaldehído, tal como las descritas en el documento WO9920304.

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

El polipéptido puede comprender el dominio N-terminal y/o C-terminal de longitud completa de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* o fragmentos de las mismas.

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

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

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

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

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

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

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

en el que el primer fragmento y el segundo fragmento son adyacentes entre sí y en el que la primera porción de repetición y la segunda porción de repetición tiene similitud estructural.

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

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

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

El dominio N-terminal de longitud completa de la toxina A puede ser los aminoácidos 1-542 de la toxina A de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Por lo tanto, el término “un fragmento N-terminal de la toxina A de *C. difficile*” o “un fragmento de dominio N-terminal de la toxina A” se refiere a un fragmento de

aminoácidos 1-542 de la toxina A de la cepa VPI10463 (ATCC43255) y/o su equivalente en una cepa diferente. Los aminoácidos 1-542 de la toxina A de la cepa VPI10463 (ATCC43255) corresponden a los aminoácidos 1-542 de SEQ ID NO: 1.

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

Las toxinas A y B de *C. difficile* son proteínas conservadas. Sin embargo, la secuencia difiere en pequeña medida entre cepas. Además, la secuencia de aminoácidos para toxinas A y B en cepas diferentes puede diferir en varios aminoácidos.

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

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

Una 'variante' es un polipéptido que varía respecto de los polipéptidos de referencia por sustituciones de aminoácidos conservadoras, en las que se sustituye un resto con otro con las mismas propiedades fisicoquímicas. Normalmente, dichas sustituciones son entre Ala, Val, Leu y Ile; entre Ser y Thr; entre los restos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln, y entre los restos básicos Lys y Arg; o los restos aromáticos Phe y Tyr.

Además, la numeración de los aminoácidos puede diferir entre los dominios C-terminales o los dominios N-terminales de la toxina A (o toxina B) de una cepa y la toxina A (o toxina B) de otra cepa. Por este motivo, el término 'equivalente en una cepa diferente' se refiere a aminoácidos que corresponden a los de una cepa de referencia (por ejemplo, *C. difficile* VPI10463), pero que se encuentran en una toxina de una cepa diferente y que, por tanto, se pueden numerar de forma diferente. Una región de aminoácidos 'equivalentes' se puede determinar alineando las secuencias de las toxinas de las cepas diferentes. Los números de aminoácidos proporcionados en todo el documento se refieren a los de la cepa VPI10463.

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

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

El fragmento de dominio de repetición de la toxina A puede ser una porción contigua de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos del dominio de repetición de la toxina A. El fragmento de dominio de repetición de la toxina A puede ser una porción contigua de menos de 750, menos de 700, menos de 650, menos de 600 o menos de 580 aminoácidos. El fragmento de dominio de repetición de la toxina B puede ser una porción contigua de al menos 100, 200, 230, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos del dominio de repetición de la toxina B. El fragmento de dominio de repetición de la toxina B puede ser una porción contigua de menos de 530, menos de 500, menos de 480 o menos de 450 aminoácidos.

El término 'primer fragmento' se refiere a una porción contigua de al menos 100, tal como 150, 180, 250, 300, 350, 380, 400, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600, aminoácidos del dominio de repetición de la toxina A. El término 'segundo fragmento' se refiere a una porción contigua de al menos 100, tal como 200, 230, 250, 280, 300, 350, 400, 450 o 500, aminoácidos del dominio de repetición de la toxina B.

El término 'primer extremo proximal' se refiere al extremo del primer fragmento (fragmento Tox A) que está unido covalentemente al segundo fragmento (fragmento Tox B) o unido covalentemente a una secuencia de unión entre el primer y segundo fragmento. El término 'segundo extremo proximal' se refiere al extremo del segundo fragmento que está más cerca del primer fragmento en la estructura primaria (secuencia de aminoácidos).

El dominio C-terminal de la toxina A está compuesto de 8 porciones de repetición (designadas como porción de

repetición I, porción de repetición II, porción de repetición III, porción de repetición IV, porción de repetición V, porción de repetición VI, porción de repetición VII y porción de repetición VIII). Cada una de estas porciones de repetición se puede dividir además en repeticiones cortas (SR) y repeticiones largas (LR) (excepto para una porción de repetición VIII de Tox A que no tiene una repetición larga). Cada una de las repeticiones largas tiene algo de similitud estructural y de secuencia con las otras repeticiones largas. De forma similar, las repeticiones cortas tienen algo de similitud de secuencia y estructural entre sí. De forma similar, el dominio C-terminal de la toxina B está compuesto de 5 porciones de repetición subdivididas en SR y LR. Cada porción de repetición contiene una LR y entre 2 y 5 SR (excepto para la porción de repetición V de Tox B que no tiene una repetición larga). Para los propósitos de la divulgación, una 'porción de repetición' se refiere a una de las ocho porciones de repetición de ToxA (designadas como I, II, III, IV, V, VI, VII o VIII) o a una de las cinco porciones de repetición de ToxB (designadas como I, II, III, IV o V) o una porción de repetición parcial del dominio de repetición de la toxina A o la toxina B. Como se usa en el presente documento, el término 'primera porción de repetición' se refiere a una porción de repetición (o porción de repetición parcial) del dominio de repetición de la toxina A. El término 'segunda porción de repetición' se refiere a una porción de repetición (o porción de repetición parcial) del dominio de repetición de la toxina B.

Por ejemplo, la porción de repetición I de ToxA contiene tres SR y una LR, que se pueden denominar como la primera SRI de ToxA, la segunda SRI de ToxA, la tercera SRI de ToxA y la LRI de ToxA, respectivamente.

Se considera que el primer extremo proximal está dentro de una 'porción de repetición' si el primer fragmento termina en un aminoácido que esté dentro de la porción de repetición (es decir, el primer extremo proximal solo contiene parte de la secuencia de la porción de repetición). De forma similar, se considera que el segundo extremo proximal está dentro de una 'porción de repetición' si el segundo fragmento termina en un aminoácido que esté dentro de esa porción de repetición. Por ejemplo, el primer extremo proximal está dentro de la 'porción de repetición I de ToxA si el primer fragmento termina con uno cualquiera de los aminoácidos 1833-1923 (inclusive) de VPI10463 o su equivalente en otra cepa. El primer extremo proximal está dentro de una 'repetición larga' o una 'repetición corta' si el primer fragmento termina en un aminoácido que esté dentro de una 'repetición larga' o una 'repetición corta', de forma similar, el segundo extremo proximal está dentro de una 'repetición larga' o una 'repetición corta' si el segundo fragmento termina en un aminoácido que esté dentro de una 'repetición larga' o una 'repetición corta'.

Se han definido las posiciones de aminoácidos de cada dominio para la toxina A y la toxina B de la cepa VPI10463 (ATCC43255). Son como siguen (Tabla 1)

Nombre		**Posición inicial**	**Posición final**
ToxA_I	SR1	1832	1852
	SR2	1853	1873
	SR3	1874	1893
	LR	1894	1924
ToxA_II	SR1	1925	1944
	SR2	1945	1965
	SR3	1966	1986
	SR4	1987	2007
	SR5	2008	2027
	LR	2028	2058
ToxA_III	SR1	2059	2078
	SR2	2079	2099
	SR3	2100	2120
	SR4	2121	2141
	SR5	2142	2161
	LR	2162	2192

(continuación)

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

(continuación)

Nombre		Posición inicial	Posición final
	LR	2028	2057
ToxB_III	SR1	2058	2078
	SR2	2079	2099
	SR3	2100	2119
	SR4	2120	2139
	SR5	2140	2159
	LR	2160	2189
ToxB_IV	SR1	2190	2212
	SR2	2213	2233
	SR3	2234	2253
	SR4	2254	2273
	SR5	2274	2293
	LR	2294	2323
ToxB_V	SR1	2324	2343
	SR2	2344	2366

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

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

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

Los polipéptidos de la invención pueden ser parte de una proteína más larga tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo, es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias que ayuden en la purificación, tales como múltiples restos de histidina o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante. Además, también se considera la adición de una cola de lípido o polipéptido exógeno o secuencias de polinucleótidos para incrementar el potencial inmunógeno de la molécula final.

La palabra ‘adyacente’ quiere decir separado por menos de o exactamente 20, 15, 10, 8, 5, 2, 1 o 0 aminoácidos en la estructura primaria.

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

Dos secuencias tendrán ‘similitud de secuencia entre sí’ si tienen una identidad de secuencia mayor de un 30 %, 50 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 %.

El término ‘identidad’ es conocido en la técnica. Identidad es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según sea el caso, determinada por comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también quiere decir el grado de relación entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, determinado por la coincidencia entre series de dichas secuencias. La "identidad" se puede calcular fácilmente por procedimientos conocidos, incluyendo pero sin limitarse a los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Se diseñan procedimientos para determinar la identidad para dar le mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Además, los procedimientos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los procedimientos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el programa Needle, BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. y col., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990)), y FASTA Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448 (1988)). La familia de programas BLAST está disponible públicamente a partir de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). También se puede usar el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

En un ejemplo, los parámetros para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen lo siguiente:

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

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff y Henikoff,

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

Penalización por hueco: 10

Penalización por extensión de hueco: 0,5

Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como el programa ‘Needle’ a partir del paquete EMBOSS (Rice P.y col, Trends in Genetics 2000 col.16(6):276-277). Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones peptídicas (junto con ninguna penalización para los huecos finales).

En una realización, la primera porción de repetición y la segunda porción de repetición tiene una similitud estructural alta entre sí. Se puede considerar que dos secuencias tienen una similitud estructural alta cuando su identidad de secuencia es mayor de un 40 %, 45 %, 50 % o 60 %. Se puede determinar la presencia de una identidad de secuencia alta usando programas informáticos que permiten la alineación se secuencias (EMBOSS, Blast, …). La estructura del modelo 3D se puede construir fielmente, usando el servidor web de SwissModel, para una proteína si comparte una identidad de secuencia de más de un 40 %, 45 %, 50 % o 60 % con una proteína que tenga una estructura 3D conocida.

En una realización, el polipéptido de la invención provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A o la toxina B. En otra realización, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A. En otra realización, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina B. En otra realización, el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A y la toxina B. La expresión ‘provoca anticuerpos de neutralización’ quiere decir que cuando las composiciones se usan para inmunizar un mamífero, por ejemplo un ratón, una cobaya o un ser humano, el mamífero genera anticuerpos neutralizadores.

Puede medirse si un polipéptido provoca o no anticuerpos neutralizadores contra una toxina inmunizando ratones con un composición inmunogénica que comprende el polipéptido, recogiendo sueros y analizando los títulos anti-toxina de los sueros usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se pueden comparar los sueros con una muestra de referencia obtenida de ratones que no se han inmunizado. Se puede encontrar un ejemplo de esta técnica en el ejemplo 6. El polipéptido de la invención provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A si los sueros contra el polipéptido dan una lectura de ELISA de más de un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor que la muestra de referencia.

En otra realización, el polipéptido de la invención provoca una respuesta inmunitaria protectora en un hospedador mamífero contra cepas de *C. difficile*. La expresión ‘provoca una respuesta inmunitaria protectora’ quiere decir que la composición inmunogénica de la invención se usa para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, cobaya o ser humano, el mamífero genera anticuerpos que pueden proteger al mamífero de la muerte provocada por *C. difficile*. En una realización, el hospedador mamífero se selecciona del grupo que consiste en ratón, conejo, cobaya, mono, primate no humano o humano. En una realización, el hospedador mamífero es un ratón. En otra realización, el

hospedador mamífero es un ser humano.

Puede determinarse si un polipéptido provoca o no una respuesta inmunitaria protectora en un hospedador mamífero contra cepas de *C. difficile* usando un ensayo de exposición. En dicho ensayo, se vacuna al hospedador mamífero con el polipéptido y se le expone por exposición a *C. difficile*. Se compara el tiempo que sobrevive el mamífero después de la exposición con el tiempo que sobrevive un mamífero de referencia que no se haya inmunizado con el polipéptido. Un polipéptido provoca una respuesta inmunitaria protectora si un mamífero inmunizado con el polipéptido sobrevive al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más después de la exposición con *C. difficile* que un mamífero de referencia que no se haya inmunizado con el polipéptido. En una realización, el polipéptido de la invención provoca una respuesta inmunitaria protectora contra *C. difficile* en un mamífero seleccionado del grupo que consiste en ratón, cobaya, mono o ser humano. En una realización, el mamífero es un ratón. En otra realización, el mamífero es un ser humano.

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

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

En una realización, el primer fragmento comprende una estructura de láminas beta mayor de un 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 33 %, 35 %, 38 %, 40 % o 42 %. En una realización, el segundo fragmento comprende una estructura de láminas beta mayor de un 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 33 %, 35 %, 38 %, 40 % o 42 %. En otra realización, tanto el primer fragmento como el segundo fragmento comprenden una estructura de láminas beta mayor de un 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 33 %, 35 %, 38 %, 40 % o 42 %.

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

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

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

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

En otra realización, el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal están ambos dentro de repeticiones largas. En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición larga V de la toxina A (aminoácidos 2410-2440 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga VI de la toxina A (aminoácidos 2523-2553 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la

repetición larga VII de la toxina A (aminoácidos 2614-2644 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición larga I de la toxina B (aminoácidos 1897-1926 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga II de la toxina B (aminoácidos 2028-2057 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente) o dentro de la repetición larga III de la toxina B (aminoácidos 2160-2189 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente). En una realización, el primer extremo proximal está dentro de la repetición larga VII de la toxina A (aminoácidos 2614-2644 de SEQ ID NO:1 o su equivalente en una cepa diferente) y el segundo extremo proximal está dentro de la repetición larga II de la toxina B (aminoácidos 2028-2057 de SEQ ID NO:2 o su equivalente en una cepa diferente).

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

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

En una realización, el polipéptido comprende además un enlazador. Este enlazador puede estar entre el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal. Como alternativa, el enlazador puede enlazar los extremos distales del primer fragmento y/o del segundo fragmento a otra secuencia de aminoácidos.

Se puede emplear una secuencia enlazadora peptídica para separar el primer fragmento y el segundo fragmento. Dicha secuencia enlazadora peptídica se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Se pueden elegir secuencias enlazadoras peptídicas adecuadas basadas en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su capacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interaccionar con epítopos funcionales en el primer fragmento y/o el segundo fragmento; y (3) la ausencia de restos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítopos funcionales de ToxA y/o ToxB. Las secuencias enlazadoras peptídicas pueden contener restos de glicina (Gly), asparagina (Asn) y serina (Ser). También se pueden usar otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden emplear de forma útil como enlazadores incluyen las desveladas en Maratea *y col., Gene* 40:39-46 (1985); Murphy *y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262 (1986); en la patente de los EE. UU. N.º 4.935.233 y la patente de los EE. UU. N.º 4.751.180. En general, la secuencia enlazadora puede ser de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud.

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

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

El término "porción inmunogénica del mismo" o ‘fragmento inmunogénico’ se refiere a un fragmento de un polipéptido en el que el fragmento comprende un epítopo que es reconocido por linfocitos T citotóxicos, linfocitos T colaboradores o linfocitos B. De forma adecuada, la porción inmunogénica comprenderá al menos un 30 %, de forma adecuada al menos un 50 %, en especial al menos un 75 % y en particular al menos un 90 % (por ejemplo, 95 % o 98 %) de los aminoácidos en la secuencia de referencia. En una realización, la porción inmunogénica comprenderá todas las regiones de epítopos de la secuencia de referencia.

Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención que comprenden las proteínas de fusión específicas del fragmento de dominio de repetición de la toxina A de *C. difficile* y un fragmento de dominio de repetición de la toxina B de *C. difficile* descritas en el presente documento, también se espera que proporcionen una respuesta inmunitaria mejorada contra *C. difficile* en comparación con composiciones que comprenden polipéptidos o fragmentos de *C. difficile* conocidos.

COADYUVANTES

Las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento incluyen al menos un polipéptido de *C. difficile* en combinación con un coadyuvante libre de aluminio. Los polipéptidos se formulan con un coadyuvante que esté libre de aluminio o sales de aluminio, esto es, un coadyuvante o sistema de coadyuvantes libre de aluminio.

En ciertas realizaciones, el polipéptido de *C. difficile* se formula con un coadyuvante que comprende una fracción de saponina inmunológicamente activa presentada en forma de un liposoma. El coadyuvante puede comprender además un lipopolisacárido. El coadyuvante puede incluir QS21. Por ejemplo, En una realización, el coadyuvante contiene QS21 en una formulación liposómica. En una realización, el sistema de coadyuvantes incluye 3D-MPL y QS21. Por ejemplo, En una realización, el coadyuvante contiene 3D-MPL y QS21 en una formulación liposómica. Opcionalmente, el sistema de coadyuvantes también contiene colesterol. En una realización específica, el coadyuvante incluye QS21 y colesterol. Opcionalmente, el sistema de coadyuvantes contiene 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC). Por ejemplo, en un sistema de coadyuvantes específico contiene colesterol, DOPC, 3D-MPL y QS21.

En un ejemplo específico, la composición inmunogénica incluye un coadyuvante formulado en una dosis que incluye: de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mg de colesterol; de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 2 mg de DOPC; de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg de 3D-MPL; y de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg de QS21. En otro ejemplo específico, la composición inmunogénica incluye un coadyuvante formulado en una dosis que incluye: de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mg de colesterol, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 2 mg de DOPC, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg de 3D-MPL, y de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg de QS21. En otra formulación específica, el coadyuvante se formula en una dosis que comprende de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mg de colesterol, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 2 mg de DOPC, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 70µg de 3D-MPL, y de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 70 µg de QS21. En una formulación específica, el coadyuvante se formula en una única dosis que contiene: aproximadamente 0,25 mg de colesterol; aproximadamente 1,0 mg de DOPC; aproximadamente 50 µg de 3D-MPL; y aproximadamente 50 µg de QS21. En otros modos de realización, la composición inmunogénica se formula con una dosis fraccionada (esto es una dosis, que es una fracción de las formulaciones de dosis individual anteriores, tal como la mitad de la cantidad anterior de los componentes (colesterol, DOPC, 3D-MPL y QS21), ¼ de la cantidad anterior de los componentes, u otras dosis fraccionadas (por ejemplo, 1/3, 1/6, etc.) de la cantidad anterior de los componentes.

En una realización, las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención incluyen un coadyuvante que contiene combinaciones de lipopolisacárido y saponinas de Quillaja que se han desvelado previamente, por ejemplo en el documento EP 0671948. Esta patente demostró una fuerte sinergia cuando se combinó un lipopolisacárido (3D-MPL) con una saponina de Quillaja (QS21).

El coadyuvante puede comprender además oligonucleótidos inmunoestimuladores (por ejemplo, CpG) o un vehículo.

Una saponina particularmente adecuada para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano *Quillaja saponaria Molina* y se describió por primera vez por Dalsgaard *y col.* en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, p243-254) por tener actividad coadyuvante. Se han aislado fragmentos purificados de Quil A por HPLC que retienen la actividad coadyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria Molina*, que induce linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), linfocitos Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante y es una saponina preferente en el contexto de la presente invención.

En una realización específica, se proporciona QS21 en su composición menos reactógena, en la que se desactiva con un esterol exógeno, tal como colesterol, por ejemplo. Existen varias formas particulares de composiciones menos reactógenas en las que QS21 se desactiva con un colesterol exógeno. En una realización específica, la saponina / esterol está en forma de una estructura de liposoma (documento WO 96/33739, ejemplo 1). En esta realización, de forma adecuada, los liposomas contienen un lípidos neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que, de forma adecuada, es no cristalino a temperatura ambiente, por ejemplo, fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) o dilauril fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que incrementa la estabilidad de la estructura liposoma-QS21 para liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos, la cantidad de lípido cargado es, de forma adecuada un 1-20 % p/p, preferentemente un 5-10 %. La proporción de esterol con respecto a fosfolípido es de un 1-50 % (mol/mol), de forma adecuada un 20-25 %.

Los esteroles adecuados incluyen β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. En una realización particular, la composición coadyuvante comprende colesterol como esterol. Estos esteroles son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el colesterol se divulga en el índice de Merkc, 11ª ed., página 341, como un esterol natural que se encuentra en la grasa animal.

Cuando la fracción de saponina activa es QS21, la proporción de QS21 : esterol será, normalmente, del orden de 1:100 a 1:1 (p/p), de forma adecuada entre 1:10 a 1:1 (p/p), y preferentemente de 1:5 a 1:1 (p/p). De forma adecuada, está presente esterol en exceso, siendo la proporción de QS21:esterol de al menos de 1:2 (p/p). En una realización, la proporción de QS21:esterol es de 1:5 (p/p). De forma adecuada, el esterol es colesterol.

En una realización, la invención proporciona una dosis de una composición inmunogénica que comprende saponina inmunológicamente activa, preferentemente QS21, en un nivel de 60 µg o menos, por ejemplo entre 1 y 60 µg. En

una realización, la dosis de la composición inmunogénica comprende QS21 en un nivel de aproximadamente alrededor de 50 µg, por ejemplo entre 45 y 55 µg, de forma adecuada, entre 46 – 54 µg o entre 47 y 53 µg o entre 48 y 52 µg o entre 49 y 51 µg o 50 µg por dosis.

En otra realización, la dosis de la composición inmunogénica comprende QS21 en un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20 – 30 µg, de forma adecuada entre 21 – 29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg o 25 µg.

En otra realización, la dosis de la composición inmunogénica comprende QS21 en un nivel de aproximadamente 10 µg por, por ejemplo entre 5 y 15 µg, de forma adecuada entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg o 10 µg.

Específicamente, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 25 µg o 50 µg de QS21 por dosis. Específicamente, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 50 µg de QS21 por dosis.

El lipopolisacárido puede ser un derivado no tóxico del lípido A, en particular monofosforil lípido A o más en particular monofosforil lípido A 3-desacilado (3D – MPL).

El 3D-MPL se vende con el nombre MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y se denomina en todo el documento como MPL o 3D-MPL. Véanse, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094. El 3D-MPL promueve principalmente respuestas de linfocitos T CD4+ con un fenotipo de IFN-□ (Th1). El 3D-MPL se puede producir de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 2-desacilado con cadenas 3, 4, 5 o 6 aciladas. Preferentemente, en las composiciones de la presente invención se usa 3D-MPL de partículas pequeñas. El 3D-MPL de partículas pequeñas tiene un tamaño de partícula tal que se pueda filtrar de modo estéril a través de un filtro de 0,22µm. Dichas preparaciones se describen en el documento WO 94/21292.

Por lo tanto, la invención proporciona una dosis de una composición inmunogénica que comprende lipopolisacárido, preferentemente 3D-MPL, en un nivel de 75 µg o menos, por ejemplo entre 1 y 60 µg. En una realización, el lipopolisacárido está presente en una cantidad de aproximadamente 50 µg por dosis.

En una realización, la dosis de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 50 µg, por ejemplo entre 45 – 55 µg, de forma adecuada entre 46 – 54 µg o entre 47 y 53 µg o entre 48 y 52 µg o entre 49 y 51 µg o 50 µg.

En una realización, la dosis de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20 – 30 µg, de forma adecuada entre 21 – 29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg o 25 µg.

En otra realización, la dosis de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, de forma adecuada entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg o 10 µg.

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

Específicamente, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 25 µg o 50 µg de 3D-MPL por dosis. Específicamente, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 50 µg de 3D-MPL por dosis.

De forma adecuada, la dosis de la composición inmunogénica de acuerdo con cualquier aspecto de la invención se refiere a una dosis humana. Por el término “dosis humana” se quiere decir una dosis que esté en un volumen adecuado para un uso humano. En general, esto es de entre 0,3 y 1,5 ml. En una realización, una dosis humana es de 0,5 ml. En otra realización, una dosis humana es mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En otra realización, una dosis humana es de entre 1 ml y 1,5 ml.

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

En una realización específica, QS21 y 3D-MPL están presentes en la misma concentración final por dosis de la composición inmunogénica. En un aspecto de este modo de realización, una dosis de composición inmunogénica comprende un nivel final de 25 µg de 3D-MPL y 25 µg de QS21 o 50 µg de 3D-MPL y 50 µg de QS21.

En una realización, el coadyuvante incluye una emulsión de aceite en agua. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua puede incluir una fase oleosa que incorpora un aceite metabolizable, y un componente de fase oleosa adicional, tal como un tocol. La emulsión de aceite en agua también puede contener un componente acuoso, tal como una solución salina tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Además, normalmente, la emulsión de aceite en agua contiene un emulsionante. En una realización, el aceite metabolizable es escualeno. En una realización, el tocol es alfa-tocoferol. En una realización, el emulsionante es un emulsionante tensioactivo no iónico (tal como monooleato de polioxietilensorbitano, TWEEN80™). En realizaciones ejemplares, la emulsión de aceite en agua contiene escualeno y alfa tocoferol en una proporción que es igual o menor de 1 (p/p).

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

Para que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para una administración humana, la fase de aceite del sistema de emulsión tiene que comprender un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Se puede definir metabolizable como 'que se puede transformar por metabolismo' (Diccionario médico ilustrado Dorland, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y se pueda transformar por metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de la presente invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® (triglicéridos caprílicos/cápricos fabricados usando glicerol a partir de fuentes de aceite vegetal y ácidos grasos de cadena media (MCT) de aceites de coco o palmiste) y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en menor cantidad en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levadura, y es un aceite particularmente preferente para su uso en la presente invención. Es escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis de colesterol (Índice Merck, 10ª edición, entrada n.º 8619).

De forma adecuada, el aceite metabolizable está presente en la composición coadyuvante en una cantidad de 0,5-10 mg, preferentemente 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7 o 5-6 mg (por ejemplo 2-3, 5-6 o 9-10 mg), de forma específica aproximadamente 5,35 mg o alrededor de 2,14 mg/dosis.

Los tocoles son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento EP0382271. De forma adecuada, el tocol es alfa-tocoferol o un derivado del mismo tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). De forma adecuada, dicho tocol esté presente en una cantidad de 0,5-11 mg, preferentemente 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6 mg (por ejemplo 10-11, 5-6, 2.5-3.5 o 1-3 mg). En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad de aproximadamente 5,94 mg o de aproximadamente 2,38 mg por dosis.

La emulsión de aceite en agua comprende además un agente emulsionante. De forma adecuada, el agente emulsionante puede ser monooleato de polioxietilensorbitano. En una realización particular, el agente emulsionante puede ser polisorbato® 80 (monooleato de polioxietilen (20) sorbitano) o Tween® 80.

De forma adecuada, dicho agente emulsionante está presente en la composición coadyuvante en una cantidad de 0,1-5, 0,2-5, 0,3-4, 0,4-3 o 2-3 mg (por ejemplo 0,4-1,2, 2-3 o 4-5 mg) de agente emulsionante. En una realización específica, el agente emulsionante está presente en una cantidad de aproximadamente 0,97 mg o aproximadamente 2,425 mg.

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

Cuando el coadyuvante está en forma líquida y se va a combinar con una forma líquida de una composición polipeptídica, la composición coadyuvante en una dosis humana será una fracción del volumen final previsto de la dosis humana, por ejemplo aproximadamente la mitad del volumen final previsto de la dosis humana, por ejemplo un volumen de 350 µl para una dosis humana prevista de 0,7ml o un volumen de 250 µl para una dosis humana prevista de 0,5 ml. La composición coadyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno polipéptido para proporcionar la dosis humana final de la vacuna. Por supuesto, el volumen final de dicha dosis variará dependiendo del volumen inicial de la composición coadyuvante y del volumen de la composición antígeno polipéptido añadida a la composición coadyuvante. En una realización alternativa, se usa un coadyuvante líquido para reconstituir una composición polipeptídica liofilizada. En esta realización, la dosis humana de la composición coadyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis humana. La composición coadyuvante líquida se añade al vial que contiene la composición polipeptídica liofilizada. La dosis humana final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml.

El procedimiento de producción de emulsiones de aceite en agua es bien conocido para el experto en la técnica. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa que contiene tocol con un tensioactivo tal como una solución de PBS/ monooleato de polioxietilensorbitano , seguido de homogeneización usando un homogeneizador. Quedará claro para un experto en la técnica que un procedimiento que comprende pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringuilla será adecuado para homogenizar volúmenes pequeños de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsificación en un microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo de 50 pasos, durante un periodo de 2 minutos con una entrada de presión máxima de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar)) se podrá adaptar por el experto en la técnica para producir volúmenes menores o mayores de emulsión. La adaptación se podría lograr por experimentación de rutina que comprende la medida de la emulsión resultante hasta que se logra una preparación con gotas de aceite del diámetro requerido.

En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante deben estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Preferentemente, los sistemas de emulsión de aceite en agua de la presente invención tienen un tamaño de gota de aceite pequeño en el intervalo submicrométrico. De forma adecuada, los tamaños de las gotas estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, más preferentemente tamaños de 120 a 600 nm de diámetro. Lo más preferentemente, la emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite de las que al menos un 70 % por intensidad son de menos de 500 nm de diámetro, más preferentemente al menos un 80 % por intensidad son de menos de 300 nm de diámetro, más preferentemente al menos un 90 % por intensidad están en el intervalo de 120 a 200 nm de diámetro.

En una realización, la composición inmunogénica no es de 3 µg ni 10 µg de ninguna de las SEQ ID NO: 1 a 7 combinadas con un coadyuvante que comprenda una emulsión de aceite en agua que tenga 0,125 ml de emulsión de SB62 (volumen total), 5,35 mg de escualeno, 5,94 mg de DL-α-tocoferol y 2,425 mg de polisorbato 80 por 0,5 ml de dosis. En una realización, la composición inmunogénica no es de 3µg ni 10 µg de ninguna de las SEQ ID NO: 1 a 7 combinadas con un coadyuvante que comprenda una emulsión de aceite en agua de 5,35 mg de escualeno, 5,94 mg de DL-α-tocoferol y 2,425 mg de polisorbato 80 por 0,5 ml de dosis. En una realización, la composición inmunogénica no contiene un coadyuvante que comprenda una emulsión de aceite en agua que tenga escualeno, DL-α-tocoferol y polisorbato 80.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y VACUNAS

En una realización, la composición inmunogénica comprende además antígenos adicionales. En una realización, los antígenos adicionales son antígenos derivados de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae)*, *Haemophilus influenzae (H. influenzae)*, *Neisseria meningitidis (N. meningitidis)*, *Escherichia coli (E. coli)*, *Moraxella catarrhalis (M. cattarhalis)*, *Clostridium tetani (C. tetani), Corynebacterium diptherieriae (C. diptherieriae), Bordetella pertussis (B. pertussis), Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis)*, enterococos, y *Staphylococcus aureus (S. aureus).* En otra realización, la composición inmunogénica de la invención puede comprender otros antígenos de *C. difficile*, por ejemplo, las proteínas de capa S (documento WO01/73030). Opcionalmente, la composición inmunogénica comprende además un sacárido de *C. difficile*.

También se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica. Esta vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención y un coadyuvante.

Las preparaciones de vacuna que contienen las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden usar para proteger a un mamífero susceptible de infección por *C. difficile* o tratar a un mamífero con una infección por *C. difficile*, por medio de la administración de dicha vacuna por medio de una vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección por medio de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio de administración mucosa a la vía oral/alimentaria, respiratoria, genitourinaria. Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una única dosis, los componentes de la misma también se pueden coadministrar juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, los conjugados de sacáridos neumocócicos se pueden administrar por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para la coordinación de las respuestas inmunitarias entre sí). Además de una única vía de administración, se pueden usar dos vías de administración diferentes. Por ejemplo, los sacáridos o conjugados de sacáridos se pueden administrar por vía intramuscular (IM) o intradérmica (ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar por vía intranasal (IN) o intradérmica (ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de sensibilización e IN para dosis de refuerzo. Normalmente, el contenido de toxinas en la vacuna estará en el intervalo de 1-250 µg, preferentemente 5-50 µg, lo más normalmente en el intervalo de 5 - 25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas. En general, la preparación de la vacuna se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press, Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton, patente de los EE. UU. 4.235.877.

En el presente documento se desvela un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende además un vial que contiene un coadyuvante como se describe en el presente documento. Se prevé que en este aspecto de la invención, el

coadyuvante se usará para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento de prevención o tratamiento de una infección por *C. difficile* que comprende administrar al sujeto una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna de la invención. En una realización, se proporciona un procedimiento de prevención o tratamiento de episodios primarios y/o recurrentes de infección por *C. difficile* que comprende administrar al sujeto una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna de la invención. En una realización, el sujeto se selecciona del grupo que consiste en ratón, conejo, cobaya, mono, primate no humano o humano. En una realización, el sujeto es un ratón. En otra realización, el sujeto es un ser humano.

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

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

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

“Alrededor” o “aproximadamente” se definen como dentro de un 10 % más o menos de la cifra dada para los propósitos de la invención.

Los términos “comprender”, “comprenden” y “comprende” en el presente documento se pretende por los inventores que sea opcionalmente sustituibles con los términos “consistir en”, “consisten en” y “consiste en”, respectivamente, en cada caso. El término “comprende” quiere decir “incluye”. Por tanto, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra “comprende” y variaciones tales como “comprenden” y “comprender” se entenderá que implica la inclusión de un compuesto o composición establecida (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o etapa o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro compuesto, composición, etapa o grupos de los mismos. La abreviatura, “e. g.” procede del latinismo *exempli gratia* y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por tanto, la abreviatura, “e. g.” es sinónimo de la expresión "por ejemplo".

Las realizaciones en el presente documento relativos a la “vacuna” de la invención también son aplicables a las realizaciones relativos a “composiciones inmunogénicas” de la invención, y viceversa.

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

Los términos singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De forma similar, la palabra “o” se prevé que incluya “y” a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término “pluralidad” se refiere a dos o más. También se debe entender que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son estimados, y se proporcionan para la descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno polipéptido, pueden ser aproximadas.

Estos ejemplos expuestos a continuación son solo con fines ilustrativos, y no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo.

Se entenderá que los aspectos y modos de realización particulares descritos en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de la presente invención se pueden emplear en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar usando un estudio rutinario, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

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

La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitantes.

EJEMPLOS

Coadyuvantes usados en los experimentos:

Coadyuvante A

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

Coadyuvante B

Coadyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua que tiene 0,125 ml de emulsión de SB62 (volumen total), 5,35 mg de escualeno, 5,94 mg de DL-α-tocoferol y 2,425 mg de polisorbato 80 por 0,5 ml de dosis. Una dosis de 50 µl contiene 0,0125 ml de emulsión de SB62 (volmen total), 0,535 mg de escualeno, 0,594mg de DL-α-tocoferol y 0,2425 mg de polisorbato 80.

Coadyuvante C

Coadyuvante con 25 µg de QS21 presentado en forma de un liposoma, 25 µg de 3D-MPL, 0,25 mg de colesterol y 1,0 mg de DOPC. Una dosis de 50 µl contiene 2,5µg de QS1, 2,5 µg de 3D-MPL, 0,025 mg de colesterol y 0,1 mg de DOPC.

Coadyuvante de GSK AS04D

Coadyuvante que tiene 50 µg de MPL y 0,5 mg (Al^{3+} total) por 0,5ml de dosis. Una dosis de 50 µl contiene 5 µg de MPL y 50 µg (AL^{3+} total).

Alumbre

Coadyuvante que tiene hidróxido de aluminio, 500 µg por 0,5 ml de dosis. Una dosis contiene de 50 µl adecuada de inmunización de hámster contiene 50 µg por 50 µg de dosis.

Protocolos

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

Se recubrieron fragmentos de ToxA o ToxB (para los ejemplos 2 y 4 -ToxA (2121-2686) y ToxB (1968-2366) para los ejemplos 3, 5, 6, 7 y 8 -ToxA (2387-2706) y ToxB (1750-2360)) a 2 µg/ml (para ToxA) o 1 µg/ml (para ToxB) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en placas de microvaloración de unión alta (Nunc MAXISORP™), durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con PBS + seroalbúmina bovina al 1 % (BSA) durante 30 min a TA con agitación. Los sueros de hámster o ratones se prediluyen 1/100 (para muestras de dosis I o II posteriores) o 1/500 (para muestras de dosis III posteriores) en PBS-BSA al 0,2 %-TWEEN™ al 0,05 % y a continuación, se realizaron 2 diluciones de dos veces en microplacas y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Después de lavar, se detectó anticuerpo de hámster o ratón unido usando anti-ratón (ref: 110-035-003) o anti-hámster (ref: 107-035-142) conjugado con peroxidasa de Jackson ImmunoLaboratories Inc. diluido 1:5000 en PBS-BSA AL 0,2 %-tween al 0,05 % ('anticuerpo de detección'). Se incubaron los anticuerpos de detección durante 30 min a 20 °C con agitación. Se desarrolló el color usando 4 mg de O-fenilendiamina (OPD) + 5 µl de H_2O_2 por 10 ml de tampón citrato pH 4,5 0,1 M durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50 µl de HCl, y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 490 nm con relación a 620 nm.

El nivel de anticuerpos anti-ToxA o anti-ToxB presentes en cada suero individual se determina por comparación con un suero de referencia (calibrado contra IgG Jackson Global) añadido en cada placa y expresado en µg/ml. Se calculó una media geométrica de títulos de GMT usando el programa informático Excel para las muestras en cada grupo de tratamiento para las inmunizaciones de hámster o ratones.

Ejemplo 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Antes del diseño de las uniones para las fusiones, se definieron dos hipótesis de trabajo: primera hipótesis, cuanto más cortas seas las fusiones, mejor será la probabilidad de que las fusiones se sobreexpresen de forma estable; segunda hipótesis, de acuerdo con el concepto de cajas “SR-LR-SR”, se ha de elegir la posición inicial con el fin de garantizar un plegamiento correcto de la primera SR de esta caja SR-LR-SR previamente definida. Por lo tanto, las fusiones se inician al principio de la SR que precede a la caja SR-LR-SR. Usando estas dos hipótesis, se analizaron tres posiciones de inicio: resto 2370, 2234 y 2121 de ToxA.

Se excluyó la posición de inicio 2370. También se excluyó la posición de inicio 2234 porque uno de los restos implicados en interacciones importantes para la estabilidad estructural de la proteína no se conserva. Por tanto, se decidió que toda la fusión diseñada comenzará en el resto 2121 de ToxA.

Todas las fusiones terminarán en el último resto de ToxB.

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

Se diseñaron las fusiones 1 (F1) y 2 (F2) usando la misma hipótesis. Todas las secuencias de proteínas de SR de ToxA y ToxB habían sido comparadas usando un programa informático de alineación múltiple (ClustalW - Thompson JD *y col.* (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680). Las secuencias más similares fueron la tercera SR VIII de ToxA y la tercera SR II de ToxB y la tercera SR III de ToxB. Para hacer una elección entre estas dos SR de ToxB, se realizó una modelización de homología estructural (usando la interfaz de SwissModel - Arnold K *y col.* (2006) *Bioinformatics*, 22, 195-201) en la parte C-terminal de ToxB usando la estructura 3D conocida del dominio C-terminal de ToxA parcial (código PDB: 2QJ6). Usando la tercera SR VIII de ToxA, se obtuvo la mejor superposición estructural (realizada usando SwissPDBViewer - Guex N *y col.* (1997), *Electrophoresis* 18, 2714-2723) con la tercera SR II de ToxB. Por tanto, se diseñaron dos uniones: la primera es entre la tercera SR VIII de ToxA y la cuarta SR II de ToxB (F1) y la segunda es entre la segunda SR VIII de ToxA y la tercera SR II de ToxB (F2).

Para diseñar la fusión 3 (F3), se realizó una superposición estructural global entre ambas la estructura conocida del dominio C-terminal parcial de ToxA y la estructura predicha del dominio C-terminal de ToxB (usando los programas informáticos SwissModel y SwissPDBViewer). La mejor superposición se encontró entre LR VII de ToxA y LR II de ToxB. Por tanto, se decidió realizar una unión en esta LR similar. En primer lugar, se realizó la unión en una región en la que la secuencia se conserva entre ToxA y ToxB, después de esto, para mantener en la parte de ToxA de la fusión, los restos en interacción con la SR precedente y por último, para mantener en la parte ToxB, los restos en interacción con la SR siguiente.

Para el diseño de la fusión 4 (F4), se dividió el dominio C-terminal de ToxB en 4 fragmentos y se realizó en ellos una modelización de homología más precisa (SwissModel). Se realizó la división para mantener intactas las cajas “SR-LR-SR” (cada dominio termina al final de la SR que sigue a LR). Se realizó una superposición estructural entre las estructuras predichas de estos fragmentos y la estructura 3D conocida de ToxA y se obtuvo la mejor superposición estructural para la tercera SR de ToxB (SR I) y la última SR de ToxA (tercera SR VIII). Por tanto, se realizó la unión entre la segunda SR VIII de ToxA y la tercera SRI de ToxB.

Se diseñó la última fusión (F5) para permitir un plegamiento correcto independiente de los dos fragmentos de la fusión. Se añadió un enlazador entre el último resto de la secuencia de proteína de ToxA y el comienzo de la cuarta SR II de ToxB (siempre teniendo en cuenta la importancia de una caja “SR-LR-SR” intacta). Se añadió solo un resto exógeno (glicina) como enlazador y se situó entre dos glicinas existentes. Por lo tanto, también se puede describir el enlazador como compuesto de 3 glicinas rodeadas por una cadena beta conocida (para ToxA) y predicha (para ToxB).

Ejemplo 2

Inmunización de hámsteres con proteína de fusión F2: Coadyuvante A, Coadyuvante A sin QS21 o coadyuvante A sin MPL y comparación con coadyuvante B, alumbre o formulaciones sin coadyuvante.

Se inmunizaron grupos de 16 hámsteres (mezcla de machos y hembras) IM los días 0, 14 y 28 con 1 µg de la proteína de fusión F2 coadyuvada con 50 µl de coadyuvante A, coadyuvante A sin MPL, coadyuvante A sin QS21, coadyuvante B , alumbre o sin coadyuvante.

Se determinaron los títulos de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB en sueros individuales recogidos el día 41/42 (Post III). Los resultados se describen en las tablas 3 y 4 y figuras 1 y 2.

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

Grupos	1	2	3	4	5	6
	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis
COADYUVANTE	A	A-QS21	A - MPL	B	Al(OH)3	sin coadyuvante
1	1472	29	935	457	577	3
2	1828	39	414	197	329	23
3	4928	35	747	375	401	64
4	2966	28	550	60	769	25
5	2025	19	388	408	652	3
6	1116	155	1498	173	449	37

(continuación)

Grupos	1	2	3	4	5	6
	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis
COADYUVANTE	A	A-QS21	A - MPL	B	Al(OH)3	sin coadyuvante
7	2579	43	879	732	360	179
8	2463	33	780	196	1342	31
9	1425	52	1183	681	817	7
10	1984	307	696	190	534	199
11	1093	198	572	344	2665	106
12	2080	126	972	508	1944	22
13	3541	403	1823	193	1603	221
14	1635	152	813	1142	2209	680
15	4688	630	1046	494	855	359
16	3360	21	1119	163	664	100
Media geom.	2213	77	830	312	815	49
CI-	1717	40	655	202	563	14
CI+	2802	124	1032	454	1129	104
D.E. mín.	496	37	174	111	251	36
D.E. máx.	589	47	202	141	314	55

CI = intervalo de confianza

D.E. = desviación estándar

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

Grupos	1	2	3	4	5	6
	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis
COADYUVANTE	A	A-QS21	A - MPL	B	Al(OH)3	sin coadyuvante
1	811	33	817	65	63	5
2	1186	88	1144	107	177	5
3	4388	90	943	207	216	92
4	1158	66	1224	464	239	26
5	1992	53	1088	212	91	5

(continuación)

Grupos	1	2	3	4	5	6
	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis	F2 1 µg/dosis
COADYUVANTE	A	A-QS21	A - MPL	B	Al(OH)3	sin coadyuvante
6	1518	305	1070	193	138	44
7	5437	54	1021	244	44	57
8	1493	74	899	266	313	28
9	1488	281	1506	189	135	30
10	2637	346	1588	214	318	256
11	1568	215	1125	251	863	95
12	1879	50	1890	549	534	93
13	1920	237	1724	147	355	57
14	1709	266	2450	606	543	57
15	1553	492	2033	301	251	178
16	1556	95	744	167	115	88
Media geom.	1789	125	1254	225	207	41
CI-	1387	76	1039	162	128	16
CI+	2264	186	1498	301	308	76
D.E. mín.	402	49	215	63	79	25
D.E. máx.	475	61	244	75	101	34

Figuras 1 y 2

Resultados para la figura 1:

Se inyectó la F2 con todo el coadyuvante A, una formulación similar sin QS21 o sin MPL. Para la respuesta anti-ToxA , ambos MPL y QS21 tienen un valor añadido aunque el QS21 parece el más eficaz.

Para la respuesta anti-ToxB, el efecto del MPL es menos claro mientras que la retirada de QS21 tiene un efecto drástico en los títulos de la IgG.

Resultados para la figura 2:

Con respecto a la comparación del coadyuvante, el coadyuvante A indujo anticuerpos anti-ToxA y anti-ToxB significativamente mayores en comparación con alumbre, coadyuvante B o formulaciones sin coadyuvante. El coadyuvante B indujo anticuerpos anti-ToxA y anti-ToxB mayores en comparación con las formulaciones sin coadyuvante.

Ejemplo 3

Pims 20110544 – Inmunización de hámsteres macho con un intervalo de dosis de proteína de fusión F2 formulada en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

Se inmunizaron grupos de 10 hámsteres macho IM los días 0, 14 y 28 con 0,3 µg, 1µg o 3 µg de la proteína de fusión F2 coadyuvada con dosis de 50 µl de coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

Se midieron los títulos de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB a partir de sueros individuales recogidos el día 13 (post I), día 27 (Post II) ,día 42 (Post III 14) y día 84 (Post III 56)

Pims 20110545 – Inmunización de hámsteres hembra con un intervalo de dosis de proteína de fusión F2 formulada en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

Se inmunizaron grupos de 10 hámsteres hembra IM los días 0, 14 y 28 con 0,3 µg, 1µg o 3 µg de la proteína de fusión F2 coadyuvada con coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o coadyuvante C.

Se midieron los títulos de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB a partir de sueros individuales recogidos el día 13 (post I), día 27 (Post II) ,día 42 (Post III 14) y día 84 (Post III 56)

Figuras 3 a 7

Pims 20110544 y 20110545

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

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

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

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ag/animal	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg
Coad.	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	115	82	52	412	121	79	189	119	34	7	5	5
545 (hembras)	178	257	150	391	383	224	196	164	69	27	10	3

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

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ag/animal	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg
Coad.	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	475	416	191	974	530	277	312	332	138	487	597	401
545	762	834	428	1466	1424	688	818	423	650	803	844	849

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

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ag/animal	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg
Coad.	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544(machos)	319	686	488	1181	1120	1049	435	401	340	64	56	28
545 (hembras)	974	1555	1419	1552	1871	2386	585	649	1486	215	109	91

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

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ag/animal	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg
Coad.	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	449	674	471	1462	720	688	247	486	266	662	599	566
545	642	814	667	1654	1020	1560	800	539	888	923	1005	794

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

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ag/animal	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg
Coad.	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	630	612	594	1259	1116	1172	335	426	512	67	86	51
545	568	831	550	1213	828	1273	556	695	944	182	145	134

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

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ag/animal	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg
Coad.	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544	213	239	169	357	356	307	106	70	154	182	257	266

(continuación)

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
545	311	309	401	595	578	717	311	251	417	353	414	337

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

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ag/animal	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg	3 µg	1 µg	0,3 µg
Coad.	C	C	C	A	A	A	B	B	B	AS04 D	AS04 D	AS04 D
544 (machos)	291	195	145	299	360	440	78	70	315	24	25	15
545 (hembras)	250	299	328	318	374	435	134	211	392	60	41	41

Ejemplo 4

Pims 20120011 y 20120008 – Inmunización de hámsteres con proteína de fusión F2 o una mezcla de fragmentos de toxina A y toxina B, formulada en alumbre, coadyuvante A o sin coadyuvante.

Se inmunizaron grupos de 8 hámsteres hembra y 8 hámsteres macho IM los días 0, 14 y 28 con 1 µg de la proteína de fusión F2, una fusión F2 con una marca poli His (F2-His marcado) o una mezcla de C-terToxA (2387-2706) (0,6 µg) + C-terToxB (1750-2360) (0,4 µg) formulada en alumbre, coadyuvante A o sin coadyuvante.

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

Tabla 13

20120008 y 20120011 : Inmunización de hámsteres hembras y machos. **Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o coadyuvante A** **ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros individuales Post III**						
Grupos	1	2	3	4	5	6
	Mezcla ToxA (0,6 µg) + ToxB (0,4 µg)	F2 (1 µg)	Mezcla ToxA (0,6 µg) + ToxB (0,4 µg)	F2 (1 µg)	F2-His marcado (1 µg)	F2 (1 µg)
	Al(OH)3	Al(OH)3	Coad. A	Coad. A	Coad. A	sin coad.
1	62	1156	41	3075	4006	195
2	77	871	105	1385	2463	127
3	104	833	239	3119	1202	31
4	66	506	143	3806	3903	574
5	179	736	340	3180	6852	116

(continuación)

20120008 y 20120011 : Inmunización de hámsteres hembras y machos. Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o coadyuvante A ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros individuales Post III						
Grupos	1	2	3	4	5	6
6	641	1239	48	Muerto	5571	32
7	128	328	345	5327	3174	10
8	48	3998	63	3542	4990	47
9	59	681	296	888	6769	13
10	352	491	164	978	1192	2
11	Muerto	604	363	2913	1791	3
12	47	1524	87	1231	4362	68
13	88	486	77	3473	1647	123
14	23	1185	62	1341	4929	35
15	254	602	644	2794	3085	136
16	206	1094	24	2975	3354	90
Media geom.	101	823	144	2310	3234	42
CI-	65	612	78	1727	2398	20
CI+	172	1148	213	3196	4381	99

Tabla 14

20120008 y 20120011 : Inmunización de hámsteres hembras y machos. Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o coadyuvante A ELISA anti-ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros individuales Post III						
Grupos	1	2	3	4	5	6
	Mezcla ToxA (0,6 µg) + ToxB (0,4 µg)	F2 (1 µg)	Mezcla ToxA (0,6 µg) + ToxB (0,4 µg)	F2 (1 µg)	F2-His marcado (1 µg)	F2 (1 µg)
	Al(OH)3	Al(OH)3	Coad. A	Coad. A	Coad. A	sin coad.
1	58	591	2510	2364	2647	304
2	172	302	4981	952	1021	302
3	14	167	1409	2630	804	125

(continuación)

20120008 y 20120011 : Inmunización de hámsteres hembras y machos. Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en alumbre o coadyuvante A ELISA anti-ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros individuales Post III						
Grupos	1	2	3	4	5	6
4	53	186	4158	2261	1090	299
5	107	408	3046	2553	2682	296
6	925	373	1190	Muerto	3808	193
7	40	65	1673	2938	2820	170
8	112	1112	1809	1404	3186	51
9	160	652	2701	1385	2837	128
10	24	75	1210	2252	1676	38
11	Muerto	242	546	1749	2174	12
12	61	1081	5746	1623	2557	74
13	15	193	1975	1507	2020	130
14	56	344	3499	1018	4735	14
15	15	237	2897	2554	2673	80
	332	309	2489	2894	2148	127
Media geom.	61	297	2228	1834	2210	100
CI-	35	194	1626	1542	1708	59
CI+	132	457	3094	2319	2850	176
Media geom. = Media geométrica de títulos						

Resultados:

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

Ejemplo 5

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

Figuras 9 a 12

Se inmunizaron ratones Balb/C con las construcciones descritas en el ejemplo 1.

Se inmunizaron grupos de 15 ratones hembra Balb/c IM los días 0, 14 y 28 con 3 µg o 10 µg de los fragmentos separados de ToxA y ToxB (ToxA C-term (2387-2706) (0,6 µg) + C-terToxB (1750-2360) así como con proteínas de fusión ToxA-ToxB coadyuvadas con coadyuvante B. Se vacunó un grupo de control de 10 ratones con coadyuvante B solo.

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

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

Respuesta de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB: Protocolo

Se recubrieron muestras de los fragmentos de ToxA o ToxB a 1 µg/ml para fragmentos de ToxB o 2 µg/ml para fragmentos de ToxA en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en placas de microvaloración de unión alta (Nunc MAXISORP™), durante la noche a 4° C. Se bloquearon las placas con PBS-BSA al 1 % durante 30 min a TA con agitación. Se prediluyeron a 1/1000 los anti-sueros de ratones en PBS-BSA AL 0,2 %-TWEEN™ 0,05 %. y a continuación, se realizaron diluciones de dos veces adicionales en microplacas y se incubaron a TA durante 30 min con agitación. Después de lavar, se detectó anticuerpo murino unido usando IgG anti-ratón de cabra affiniPure conjugada con peroxidasa (H+L) de Jackson ImmunoLaboratories Inc. (ref: 115-035-003) diluido a 1:5000 en PBS-BSA AL 0,2 %-tween al 0,05 %. Se incubaron los anticuerpos de detección durante 30 min a 20 °C con agitación. Se desarrolló el color usando 4 mg de O-fenilendiamina (OPD) + 5 µl de H_2O_2 por 10 ml de tampón citrato pH 4,5 0,1 M durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50 µl de HCl, y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 490 nm con relación a 620 nm.

Se expresó el nivel de anticuerpos anti-ToxA o anti-ToxB presentes en los sueros en títulos de punto medio por comparación con un suero de referencia. Se calculó un GMT para las 15 muestras en cada grupo de tratamiento (10 para el grupo de control).

Ensayo de inhibición de hemaglutinación: Protocolo

Se realizaron 8 diluciones de dos veces en serie de antisueros agrupados de ratones (25 µl) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en microplacas con fondo en U de 96 pocillos.

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

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

Se analizaron visualmente las placas, presentando hemaglutinación como glóbulos rojos difusos en el pocillo y se observó la inhibición de hemaglutinación como un punto rojo asentado en el pocillo.

Se definieron los títulos de inhibición como el recíproco de la mayor dilución del suero que inhibe la hemaglutinación.

Ensayo de citotoxicidad

Se cultivaron células de fibroblastos de IMR90 a 37 °C con CO_2 al 5 %, en medio esencial mínimo Eagle EMEM + suero de ternero fetal al 10 % + glutamina al 1 % + antibióticos al 1 % (penicilina-estreptomicina-anfotericina) y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $5{,}10^4$ células/pocillos.

Después de 24 h, se retiraron 100 µl del medio celular de los pocillos. Se realizaron 8 (para el experimento en el ejemplo 5) o 12 (para el experimento en el ejemplo 6) diluciones de dos veces en serie de antisueros agrupados de ratones (50 µl) en medio celular.

A continuación se añadieron 50 µl de toxina B nativa (0,5 ng/ml) y se incubaron las placas a 37°C con CO_2 al 5 % durante 24 horas.

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

Se definieron los títulos de inhibición como el recíproco de la mayor dilución del suero que inhibe el redondeo celular al 50 %.

Resultados:

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

Se sometieron a prueba las propiedades funcionales de estos anticuerpos en el ensayo de hemaglutinación. Este ensayo solo está adaptado para la evaluación de Tox A ya que no se observó hemaglutinación con ToxB.

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

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

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

Ejemplo 6

Inmunización de ratones con fusiones Tox A-Tox B

Se inmunizaron IM grupos de ratones hembra los días 0, 14 y 28 con 3 µg de las proteínas de fusión ToxA-ToxB formulados en coadyuvante B o 10 µg de una mezcla sin coadyuvante de ToxA (6 µg)+ToxB (4 µg). Además de F2, se usaron otras cuatro construcciones de proteínas de fusión, fueron F54 Gly (SEQ ID NO:21), F54 New (SEQ ID NO:23), F5 ToxB (SEQ ID NO:25) y F52 New (SEQ ID NO:27).

Se llevó a cabo un ELISA usando la respuesta:protocolo ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB descrito en el ejemplo 5 excepto que aquí las muestras de los fragmentos de toxA o toxB se recubrieron a 2 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato en placas de microvaloración de unión alta. Se realizó un ensayo de inhibición de hemaglutinación como se describe en el ejemplo 5 excepto porque se diluyeron los eritrocitos de conejo al 2,5 %. Se realizó un ensayo de citotoxicidad de toxB como se describe en el ejemplo 5 excepto porque se usaron 50 µl de toxina B a una concentración de 0,015 µg/ml. Se realizó un ensayo adicional de citotoxicidad de toxA como se describe a continuación.

Se determinaron los títulos de ELISA de anti-ToxA y anti-ToxB en sueros individuales recogidos el día 42 (Post III 14). **Figuras 13 y 14**

Tabla 15

20110350: Inmunización de ratones con proteínas de fusión de *C. difficile* formuladas en coadyuvante B **ELISA a-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros Post III**						
Grupos	1	2	3	4	5	6
	F2	Fusión A (F52new)	Fusión B (F54Gly)	Fusión C (F54new)	Fusión D (F5 ToxB)	Mezcla ToxA + ToxB
	3 µg Ag/animal	3 µg Ag/animal	3 µg Ag/animal	3 µg Ag/animal	3 µg Ag/animal	10 µg (6 µg A + 4 µg B) Ag/animal
	Coad. B	Coad. B	Coad. B	Coad. B	Coad. B	sin coad.
	IM	IM	IM	IM	IM	IM
1	518	681	735	436	586	328
2	761	1058	975	455	1252	22
3	557	718	977	684	1108	327
4	1415	992	862	577	555	152
5	782	457	1202	861	622	135
6	563	724	611	575	569	54
7	615	585	1330	824	807	147
8	994	878	611	576	1108	169
9	412	623	Muerto	389	887	124
10	495	993	Muerto	809	1146	219
11	366	1039	923	872	965	12
12	1075	1089	1454	748	950	122
13	882	754	1176	809	725	196

(continuación)

20110350: Inmunización de ratones con proteínas de fusión de *C. difficile* formuladas en coadyuvante B **ELISA a-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros Post III**						
Grupos	1	2	3	4	5	6
14	1028	1550	1164	1578	696	312
15	738	1268	1170	1352	678	188
16	519	721	1028	781	930	224
17	927	890	805	346	791	209
18	946	992	647	1255	410	32
19	715	1346	1142	670	634	92
20	546	Muerto	1061	Muerto	Muerto	166
21	1107	1604	826	1038	791	112
22	1351	1289	1223	708	778	66
23	889	1319	61	567	759	102
24	976	824	597	414	456	281
25	1153	1212	995	868	758	242
Media geom.	764	937	841	704	761	126
CI-	656	818	641	597	674	89
CI+	889	1074	1103	830	858	179

Tabla 16

20110350: Inmunización de ratones con proteínas de fusión de *C. difficile* formuladas en coadyuvante B **ELISA a-ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros Post III**						
Grupos	1	2	3	4	5	6
	F2	Fusión A (F52new)	Fusión B (F54Gly)	Fusión C (F54new)	Fusión D (F5 ToxB)	Mezcla ToxA + ToxB
	3 µg Ag /animal	3 µg Ag /animal	3 µg Ag /animal	3 µg Ag /animal	3 µg Ag /animal	10 µg (6 µg A + 4 µg B) Ag/animal
	Coad. B	Coad. B	Coad. B	Coad. B	Coad. B	Coad. B
1	916	749	736	454	581	1823

(continuación)

20110350: Inmunización de ratones con proteínas de fusión de *C. difficile* formuladas en coadyuvante B **ELISA a-ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros Post III**						
Grupos	1	2	3	4	5	6
2	1090	551	491	517	872	575
3	687	1178	574	549	529	1386
4	940	868	501	536	828	854
5	837	522	653	420	866	1170
6	836	609	397	757	690	2132
7	309	702	405	792	732	1466
8	569	381	598	737	856	1539
9	382	450	Muerto	914	632	1461
10	552	693	Muerto	465	639	2267
11	679	832	1273	520	505	1037
12	1123	575	809	551	431	2273
13	764	659	532	1077	930	1405
14	944	970	909	1065	870	1978
15	812	628	222	727	1052	1414
16	502	552	736	560	1001	1269
17	983	639	551	431	728	1732
18	1133	628	604	561	1085	1211
19	938	1058	805	470	435	2017
20	519	Muerto	857	Muerto	Muerto	2140
21	887	1025	319	670	310	2342
22	861	769	596	555	1025	2897
23	903	1161	552	694	260	2343
24	1327	536	431	737	313	3074
25	674	518	680	472	663	2697
Media geom.	765	688	581	611	653	1661
CI-	663	607	495	545	550	1411
CI+	884	781	682	686	776	1957

Figuras 15 a 17

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

Se realizó un ensayo de citotoxicidad de toxB como se describe en el ejemplo 5 excepto porque se realizaron 12

diluciones de dos veces en serie de antisueros agrupados de ratones en lugar de 8 y se incubaron las placas durante la noche en lugar de durante 24 horas antes de que se observaran las células. Se realizó un ensayo adicional de citotoxicidad de toxA como se describe a continuación.

Ensayo de citotoxicidad de ToxA

Se cultivaron células HT29 a 37°C con CO_2 al 5 % en DMEM + suero fetal bovino al 10 % + glutamina al 1 % + antibióticos al 1 % (penicilina-estreptomicina-anfotericina) y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células/pocillo. Después de 24 h, se retiró el medio celular de los pocillos. Se realizaron diluciones de dos veces en serie de antisueros agrupados de ratones (50 µl) en medio celular.

A continuación se añadieron 50 µl de toxina A nativa (0,15 ng/ml) y se incubaron las placas a 37°C con CO_2 al 5 % durante 48 horas. Se observaron las células después de 48 horas, y se determinó la proporción de células redondeadas. Los resultados de los ensayos de ELISA de anti-ToxA , de ELISA de anti-ToxB, de inhibición de hemaglutinación y de citotoxicidad se describen en las figuras 13 a 17 mencionadas anteriormente.

Ejemplo 7

Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter o proteínas de fusión de *C. difficile* en una formulación sin coadyuvante

Se inmunizaron grupos de 15 ratones hembra IM los días 0, 14 28 y 120 con 1 o 3 µg de ToxA C-ter, ToxB C-ter o proteínas de fusión ToxA-ToxB. Se inyectaron todos estos antígenos en una formulación sin coadyuvante. Se inyectó un grupo de control (10 ratones) con el NaCl solo.

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

Tabla 17

20100723: Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter y proteínas de fusión de *C. difficile* sin coadyuvante

ELISA a-ToxA: GMT concentraciones (µg/ml)

Sangrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	Fusión F1	Fusión F2	Fusión F3	Fusión F4	Fusión F5	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	Fusión F1	Fusión F2	Fusión F3	Fusión F4	Fusión F5	
Ag/ml	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg Ag/ml	
Coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Na Cl
	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
Post II	178	3	16	60	74	44	269	84	3	10	49	26	25	60	3
Post III	222	2	40	94	192	109	366	137	1,25	51	110	88	67	137	1,25
Pre-refuerzo	128	4	28	70	120	58	172	165	4	48	62	63	44	107	3
Post IV	539	5	90	174	249	177	353	466	3	168	147	163	139	188	3

Tabla 18

20100723: Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter y proteínas de fusión de *C. difficile* sin coadyuvante

ELISA a-ToxB: GMT concentraciones (µg/ml)

Sangrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	Fusión F1	Fusión F2	Fusión F3	Fusión F4	Fusión F5	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	Fusión F1	Fusión F2	Fusión F3	Fusión F4	Fusión F5	
Ag/ml	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg Ag/ml	
Coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Sin coad.	Na Cl
	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
Post II	2	62	2	110	58	283	18	2	7	2	101	29	125	8	2
Post III	3	316	7	200	199	455	65	4	105	13	242	126	257	44	2
Pre-refuerzo	3	125	5	81	58	157	18	4	38	8	68	42	101	14	3
Post IV	5	856	27	258	227	380	125	6	632	79	232	175	293	126	4

Ejemplo 8

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

Figuras 20 y 21

Se inmunizaron grupos de 15 ratones hembra IM los días 0, 14 y 28 y 120 con 1 o 3 µg de ToxA C-term (aminoácidos 2387-2706) y ToxB C-term (aminoácidos 1750-2360) o proteínas de fusión de ToxA-ToxB. Se inyectaron estas proteínas en una formulación de coadyuvante B.

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

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

Tabla 19

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

ELISA a-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros Post II, III, Pre-refuerzo, Post IV

Sangrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	F1	F2	F3	F4	F5	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	F1	F2	F3	F4	F5 n	/
Ag/ml	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	/
COADYUVANTE	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
Post II	213	2,3	465	332	312	158	672	534	1,7	620	498	578	248	925	2,1
Post III	852	3	1144	859	695	644	1137	1376	4	1356	768	950	470	1537	2
Pre-refuerzo	738	4	762	484	417	394	674	1091	3	725	513	598	324	1197	3
Post IV	2764	9	1450	1423	1036	986	1626	301	26	990	1000	1099	732	1465	1

Tabla 20

20100798: Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter y proteínas de fusión de *C. difficile* formuladas en coadyuvante B

ELISA a-ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros Post II, III, Pre-refuerzo, Post IV

Sangrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	F1	F2	F3	F4	F5	ToxA (aa 2387-2706)	ToxB (aa 1750-2360)	F1	F2	F3	F4	F5	/
Ag/ml	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg	/
COADYUVANTE	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
Post II	2	246	10	424	284	794	25	3	338	17	619	471	753	93	2
Post III	2	1762	285	793	671	1204	253	4	1888	232	951	834	1026	365	2
Pre-refuerzo	3	989	180	512	396	761	129	4	984	108	479	441	581	205	3
Post IV	3	4212	911	1422	1353	1799	1046	78	657	738	1272	747	1572	812	2

Ejemplo 9

Clonación, expresión y purificación de las proteínas de fusión

Plásmido de expresión y cepa recombinante

Se clonaron genes que codifican las proteínas de fusión de dominios C-terminales parciales de ToxA y ToxB (SEQ ID NO:3, 4, 5, 6 y 7) y un marcador His, en el vector de expresión pET24b(+) (Novagen) usando los sitios de restricción NdeI/XhoI usando procedimientos estándar. Se generó la construcción final por la transformación de la cepa de *E. coli* BLR (DE3) con el vector de expresión recombinante de acuerdo con el procedimiento estándar con células tratadas con $CaCl_2$ (Hanahan D. "Plasmid transformation by Simanis." en Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press Londres. (1985): p. 109-135.).

Cepa hospedadora:

BLR(DE3). BLR es un derivado recA de BL21. Las cepas que tienen la designación (DE3) son lisógenas para un profago λ que contiene una ARN polimerasa de T7 inducible por IPTG. Los lisógenos λ DE3 se diseñan para la expresión de la proteína de vectores pET. Esta cepa también es deficiente en las proteasas *lon* y *ompT*.
Genotipo: Cepa de *E.coli* BLR::DE3, F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (*DE3*) Δ(srl-recA)306::Tn*10* (Tet^R)

Expresión de las proteínas recombinantes:

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

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

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

Después de la inducción durante la noche (alrededor de 16 horas), se evaluó la $D.O._{600nm}$ después de la inducción y se centrifugó el cultivo a 14 000 RPM durante 15 minutos y se congelaron los sedimentos a -20 °C por separado.

Purificación:

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

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

Se seleccionaron las fracciones que contenían las proteínas de fusión basadas en la pureza por SDS-PAGE y se dializaron frente a tampón bicina (Bicina 20mM, NaCl 150 mM, con o sin EDTA 5 mM pH 8,0), se determinó la concentración de proteínas usando un ensayo de proteínas DC de BioRad. Por tanto, se agruparon las proteínas, se filtraron de forma estéril a 0,22 µm, se almacenaron a -80 °C.

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

Ejemplo 10

Clonación, expresión y purificación de fragmentos de Tox A y Tox B de *C. difficile* por separado

Plásmido de expresión y cepa recombinante.

Se clonaron genes que codifican los fragmentos de proteínas de ToxA y ToxB (SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9) y un marcador His, en el vector de expresión pET24b(+) (Novagen) usando los sitios de restricción NdeI/XhoI usando procedimientos estándar. Se generó la construcción final por la transformación de la cepa de *E. coli* BLR (DE3) con el vector de expresión recombinante de acuerdo con el procedimiento estándar con células tratadas con $CaCl_2$

(Hanahan D. « Plasmid transformation by Simanis. » In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press Londres. (1985): p. 109-135.).

Cepa hospedadora:

BLR(DE3). BLR es un derivado recA de BL21. Las cepas que tienen la designación (DE3) son lisógenas para un profago λ que contiene una ARN polimerasa de T7 inducible por IPTG. Los lisógenos λ DE3 se diseñan para la expresión de la proteína de vectores pET. Esta cepa también es deficiente en las proteasas *lon* y *ompT*.
Genotipo: Cepa de *E.coli* BLR::DE3, F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (*DE3*) Δ(srl-recA)306::Tn*10* (Tet^R)

Expresión de las proteínas recombinantes:

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

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

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

Después de la inducción durante la noche (alrededor de 16 horas), se evaluó la D.O. a 600nm después de la inducción y se centrifugó el cultivo a 14 000 RPM durante 15 minutos y se congelaron los sedimentos a -20 °C por separado.

Purificación:

Se resuspendió el sedimento bacteriano en tampón bicina 20 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 500 mM complementado con una mezcla de inhibidor de proteasa (Complete sin EDTA, Roche, cat. 11873580001) y benzonasa. (Roche, cat. 1.01695.0001). Se lisaron las bacterias usando un sistema French Press de 2 X 20 000 PSI. Se separaron los componentes soluble (sobrenadante) e insoluble (sedimento) por centrifugación a 34 000g o 48 000g durante 25-30 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se filtró en un filtro de 0,22 µm.

Se purificó la proteína con marca 6-His en condiciones nativas en IMAC. Se cargaron los componentes solubles en una columna GE (por ejemplo, 15 ml) (cargada con Ni) preequilibrada con el mismo tampón usado para la resuspensión bacteriana. Después de la carga, se lavó la columna con el mismo tampón.

Para ToxA:

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

Para ToxB:

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

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

Ejemplo 11

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

Se usa la ultracentrifugación analítica para determinar la homogeneidad y el distribución de tamaño en solución de las diferentes especies dentro de una muestra de proteínas midiendo la tasa a la que se mueven las moléculas en respuesta a una fuerza centrífuga. Esto se basa en el cálculo de los coeficientes de sedimentación de las diferentes especies que se obtienen por el experimento de velocidad de sedimentación, que dependen de su masa y forma molecular.

1. Se centrifugan las muestras de proteínas en una ultracentrífuga analítica Beckman-Coulter PROTEOMELAB™ XL-1 a 42 000RPM después de que el rotor AN-60Ti se haya equilibrado a 15 °C.

a. Proteína de fusión F1, 500 µg/ml, Bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0

b. Proteína de fusión F2, 500 µg/ml, Bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0

c. Proteína de fusión F3, 500 µg/ml, Bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0

d. Proteína de fusión F4, 500 µg/ml, Bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0

e. Proteína de fusión F5, 500 µg/ml, Bicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0

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

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

4. Se determinó el peso molecular de las diferentes especies a partir de la curva de distribución de C(S) (concentración frente a coeficiente de sedimentación), considerando que es una mejor representación de los datos sin procesar que la distribución de C(M) (concentración frente a peso molecular) para caracterizar la distribución de tamaño de una mezcla. El peso molecular de la principales especies detectadas a partir de la distribución de C(S) de las cinco proteínas de fusión de ToxA-ToxB corresponde a su forma monómera. Las proporciones de fricción con mejor ajuste para las cinco fusiones estaban todas entre 2 y 2,2. Esto puede indicar que las proteínas están presentes en solución como una forma alargada, lo que sería consistente con la estructura de las proteínas.

Ejemplo 12

Evaluación de estructuras secundarias y terciarias de fusiones de ToxA-ToxB de *C. difficile* por dicroísmo circular y espectroscopía de fluorescencia

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

La estructura terciaria de una muestra de proteína se puede evaluar por la evaluación de la inmovilización de los aminoácidos aromáticos. La observación de una señal CD en la región UV cercana (250-50 nm) se puede atribuir a la polarización de los restos fenilalanina, tirosina y triptófano y es una buena indicación de que la proteína está plegada en una estructura bien definida.

Se usó el siguiente protocolo:

1. Se miden los espectros UV lejano usando una trayectoria óptica de 0,01 cm desde 178 a 250 nm, con una resolución de 1 nm y un ancho de banda en un espectropolarímetro Jasco J-720 . Se mantiene la temperatura de la célula a 23 °C por un bloqueo de célula RTE-111 termostatizado Peltier. Se mantiene un flujo de nitrógeno de 10 l/min durante las medidas.

2. Se miden los espectros UV cercano usando una trayectoria óptica de 0,01 cm desde 250 hasta 300 nm, con una resolución de 1 nm y un ancho de banda en un espectropolarímetro Jasco J-720. Se mantiene la temperatura de la célula a 23 °C por un bloqueo de célula RTE-111 termostatizado Peltier. Se mantiene un flujo de nitrógeno de 6 l/min durante las medidas.

La observación de los espectros UV lejano (figura 22) para las cinco proteínas de fusión ToxA-ToxB sugiere un co débil en estructuras de hélice alfa y un contenido alto en estructuras de lámina beta. Además, todas las proteínas presentaron un máximo a 230 nm, lo que es inusual para proteínas globulares solubles. Esta particularidad ha sido bien caracterizada en la literatura y está asociada con un pequeño grupo de proteínas conocidas por su ausencia de hélice alfa y su alto contenido en láminas beta y aminoácidos aromáticos (Zsila, Analytical Biochemistry,391(2009) 154-156). Estas particularidades son coherentes son la estructura que se espera para las proteínas de fusión ToxA-ToxB. Se compararon las estructuras cristalinas de 13 que presentaban los espectros CD característicos con una señal positiva a 230 nm (Banco de datos de proteínas). El promedio del contenido de la estructura secundaria de estas proteínas es de lámina beta un 42 % ± 9 % y de hélice alfa un 7 % ± 6 %. Esto indica de forma convincente que la firma espectral de las proteínas de fusión ToxA-ToxB es un diagnóstico de proteína de contenido en lámina beta alto y en hélice alfa bajo.

La observación de la forma de los espectros UV cercanos (figura 23) para las cinco proteínas de fusión indica que al menos algunos de los aminoácidos aromáticos están inmovilizados, lo que es un fuerte indicativo de una estructura terciaria específica y compacta. Además, el tratamiento de la proteína con una concentración de desnaturalización de urea provocó la desaparición de la señal UV cercana, lo que es un indicativo adicional de que este espectro característico se debía al plegamiento de la proteína.

Ejemplo 13

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

Se diseñaron cuatro proteínas de fusión adicionales usando los principios diseñados descritos en el ejemplo 1, estas se denominaron F54 Gly (SEQ ID NO:21), F54 New (SEQ ID NO:23), F5 ToxB (SEQ ID NO:25) y F52 New (SEQ ID NO:27).

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

Ejemplo 14

Evaluación del peso molecular de las fusiones ToxA-ToxB de *C. difficile* descritas en SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:125, y SEQ ID NO:27

Se determinó el peso molecular de las fusiones descritas en SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, y SEQ ID NO:27 como se describe en el ejemplo 11.

El peso molecular de las principales especies de la distribución C(S) de las cuatro fusiones de proteínas descritas en SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, y SEQ ID NO:27 corresponda a su forma monomérica y todas las proteínas presentan propiedades de sedimentación similares a las fusiones F1 a F5.

Ejemplo 15

Evaluación de estructuras secundarias y terciarias de fusiones de ToxA-ToxB de *C. difficile* descritas en SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, y SEQ ID NO:27

Se evaluaron las estructuras secundarias y terciarias de las fusiones descritas en SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, y SEQ ID NO:27 de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 5. La CD de UV lejano para estas proteínas de fusión se pueden encontrar en la figura 24, y los espectros UV cercano para estas fusiones se pueden encontrar en la figura 25.

El análisis de los espectros CD UV cercano y lejano de las proteínas descritas en SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, y SEQ ID NO:27 muestra que las cuatro tienen la misma estructura de lámina beta alta que las fusiones F1 a F5. Además, la observación de los espectros UV cercano no muestra diferencia significativa en la posición de los aminoácidos aromáticos en la estructura terciaria en comparación con las fusiones F1 a F5.

SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 – secuencia de toxina A

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKKLNESIDVFMN
KYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADI
NAEYNIKLWYDSEAFLVNTLKKAIVESSTTEALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYD
RQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIR
ANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMLPGIHSDLFKTI
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS
KLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESD
NNFTDTTKIFHDSLFNSATAENSMFLTKIAPYLQVGFMPEARSTISLSGPGAYASAYYDF
INLQENTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGG
SLSEDNGVDFNKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF
SKNPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIGHGKDEF
NTSEFARLSVDSLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGCNMFSYDFNVEETYPGKLLLS
IMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEVRINSEGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYI
FFDSIDNKLKAKSKNIPGLASISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNIESSIGDYIYY
EKLEPVKNIIHNSIDDLIDEFNLLENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNIQLDHTSQVNT
LNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGLNTIYDSIQLVNLISNAVNDT
INVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKELLDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMSLSIAAT
VASIVGIGAEVTIFLLPIAGISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKT
EDDKILVPIDDLVISEIDFNNNSIKLGTCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP
SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGTRLLDSIRDLY
PGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDKDTRNFIMPTITTNEIRNKLSYSFDGA
GGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNIDNEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINK
NKLIIGNQTIDFSGDIDNKDRYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISN
LSNTIEKINTLGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST
LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQVKVNGLYLNES
VYSSYLDFVKNSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENINFVIDKYFTLVGKTNLGYVE
FICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNGRNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYEPLYG
IDRYINKVLIAPDLYTSLININTNYYSNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFEYKWS
TEGSDFILVRYLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNLVTGWQTINGK
KYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPDGFEYFAPANTQNNNIEGQAI
VYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGWRIINNEKYYFNPNNAIAAVGLQVIDNNKYYFNPD
TAIISKGWQTVNGSRYYFDTDTAIAFNGYKTIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSTSNGFEYFA
PANTYNNNIEGQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGLQTIDSKKYYFNTNTAEAATG
WQTIDGKKYYFNTNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQ
IGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNK
KYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKG
PNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNL
NTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFY
FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVT
GLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDG
NRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAI

RYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV
DGVKAPGIYG

SEQ ID NO:2 – secuencia de toxina B

MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEYHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLNDPRFDYNKFFRKRMEIIY
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV
RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMLPGIQPDLFES
IEKPSSVTVDFWEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF
SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE
DNDFNTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNYFE
GSLGEDDNLDFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAACNLFAK
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLKVK
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEVRINSEGRRELLDHSGEWINKEESIIKDISSKEYISF
NPKENKITVKSKNLPELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIESISDALCDLKQQNELEDSHFISFEDISETDEGFSIRF
INKETGESIFVETEKTIFSEYANHITEEISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID
LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLRQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD
DKIMMPQDDLVISEIDFNNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLPNAPNRVFAWETGWTPGLRSLENDGTKLLDRIRDNYEG
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG
GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLIEGILSTLSIEEN
KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS
NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEGKENGFINGSTKEGLFVSELPDVVLISKVYMD
DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLNSVHLDES
GVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESMNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ
FEFICDENDNIQPYFIKFNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY
LYGIDSCVNKVVISPNIYTDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY
VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNFSDKQDVPVSEIILSFT
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG
DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIG
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI
AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:3 – secuencia de fusión 1

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY

QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAPGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG
FVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:4 – secuencia de fusión 2

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLNQIGDYK
YYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG
FVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:5 – secuencia de fusión 3

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQY
YFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNI
YGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRT
GLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGW
LDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:6 – secuencia de fusión 4

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGETIIDDKN
YYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHY
FSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGV
FNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGL
SLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAP
ANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYF
DEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEG
ESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:7 – secuencia de fusión 5

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAPGIYGGGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHN
EDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDG
IMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVE
YSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFE
NNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEK
RYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

MASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSK
AVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPD
GFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDN
KNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKV
YYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAP

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

MILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNFSDKQDVPVSEIILSFTPSYYEDGLIGYDLGLVSLYN
EKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSG
VLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGK
AFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGF
KYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQ
YYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDN
IYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMR
TGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTG
WLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTA

SEQ ID NO:10 – secuencia del fragmento de toxina A de la fusión 1

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAP

SEQ ID NO:11 – secuencia del fragmento de toxina A de la fusión 2

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAG

SEQ ID NO:12 – secuencia del fragmento de toxina A de la fusión 3

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
Y

SEQ ID NO:13 – secuencia del fragmento de toxina A de la fusión 4

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAG

SEQ ID NO:14 – secuencia del fragmento de toxina A de la fusión 5

MGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQ
NEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNF
YFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKK
YYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIM
QIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVA
VTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRY
QNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFE
YFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVI
YFFGVDGVKAPGIYG

SEQ ID NO:15 – secuencia del fragmento de toxina B de la fusión 1

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
LNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYF
SDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGE
TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGY
INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVI
IDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:16 – secuencia del fragmento de toxina B de la fusión 2

GLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYF
AHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYF
NDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYG
QAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGL
ISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLD
LDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:17 – secuencia del fragmento de toxina B de la fusión 3

FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYY
FNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIY
GQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG
LISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:18 – secuencia del fragmento de toxina B de la fusión 4

GETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEW
KELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFA
ENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDE
DTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDT
SDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGIN
LIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQ
NTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

SEQ ID NO:19 – secuencia del fragmento de toxina B de la fusión 5

GFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
LNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYF
SDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGE
TYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGY
INIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVI
IDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAAC
GGCAAACACTTTTATTTTAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCACCGGCAAAT
ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCTGAACGGCAAAAAATACTACTTTGGCAGCGAT
AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACC
ATTAACAACGACAAATATTATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTTCGATGCC
AACAACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTTGAGTATTTCGCTCCGGCAAACACCCATAATAACAACATT
GAAGGTCAGGCGATCGTTTATCAGAACAAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAGCCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
TACTTCAACCTGAACACAGCCGAAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTTCAACACCAACACCTTTATTGCA
TCTACCGGTTATACCAGCATTAACGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTTCAAAGGTCCAAATGGT
TTCGAATACTTTGCCCCTGCCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCTGAATGGG
AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGTCTGCGTACCATTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGGAAAAAATACTATTTTAACACAAATACCAGCATTGCCTCAACGGGTTATACCATTATT
TCGGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTCGAATATTTTGCGCCTGCG
AACACTGATGCGAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTCGAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCCGCAGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
GCGAATACGGACGCGAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCGTTATCAAAACCGTTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGGATACCGCCATGGCAGCAGCCGGTGGT
CTGTTTGAAATTGATGGCGTGATCTATTTTTTTGGTGTGGATGGTGTTAAAGCACCGGGAATATACGGTGGTACCGGCTTTGTGACCGTG
GGTGATGATAAATACTATTTCAATCCGATTAACGGTGGTGCAGCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAAACTATTATTTCAAC
CAGAGCGGTGTGCTGCAGACCGGTGTGTTTAGCACCGAAGATGGCTTTAAATATTTTGCGCCAGCGAACACCCTGGATGAAAACCTGGAA
GGCGAAGCGATTGATTTTACCGGCAAACTGATCATCGATGAAAACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTGCGGTGGAATGGAAA
GAACTGGATGGCGAAATGCATTATTTTTCTCCGGAAACCGGTAAAGCGTTTAAAGGCCTGAACCAGATCGGCGATTACAAATACTACTTC

AACAGCGATGGCGTGATGCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGGCTAT
ACCGAAATTGATGGCAAACATTTCTACTTCGCGGAAAACGGCGAAATGCAGATTGGCGTGTTCAATACCGAAGATGGTTTCAAATACTTC
GCGCACCATAACGAAGATCTGGGTAACGAAGAAGGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAACAAAATCTACTACTTT
GATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAATATTATTTCGATGAAGATACCGCGGAAGCGTATATT
GGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAACGATGATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAATGATAAAGTGTTC
TATTTCAGCGATAGCGGCATTATTGAAAGCGGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTGCAGATC
GGCGTTTTTGATACCAGCGATGGCTACAAATATTTCGCACCGGCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAATATAGC
GGTCTGGTGCGTGTGGGCGAAGATGTGTATTATTTCGGCGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATATGGAAAACGAAAGC
GATAAATATTACTTTAATCCGGAAACGAAAAAAGCGTGCAAAGGCATTAACCTGATCGATGATATCAAATACTATTTTGATGAAAAAGGC
ATTATGCGTACCGGTCTGATTAGCTTCGAAAACAACAACTATTACTTCAACGAAAACGGTGAAATGCAGTTCGGCTACATCAACATCGAA
GATAAAATGTTCTACTTCGGCGAAGATGGTGTTATGCAGATTGGTGTTTTTAACACCCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCCCATCAGAAT
ACCCTGGATGAAAATTTCGAAGGTGAAAGCATTAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCACCGATGAATAC
ATTGCGGCGACCGGCAGCGTGATTATTGATGGCGAAGAATACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGATTAGCGAACATCATCAT
CATCACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLN
GKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVF
KGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYY
FNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILY
QNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKT
IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMP
DTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAPGIYGGTGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFS
TEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGIL
NFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESG
VQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPD
GFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISEHHHHHH

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAAC
GGCAAACACTTTTATTTTAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCACCGGCAAAT
ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCTGAACGGCAAAAAATACTACTTTGGCAGCGAT
AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACC
ATTAACAACGACAAATATTATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTTCGATGCC
AACAACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTTGAGTATTTCGCTCCGGCAAACACCCATAATAACAACATT
GAAGGTCAGGCGATCGTTTATCAGAACAAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAGCCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
TACTTCAACCTGAACACAGCCGAAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTTCAACACCAACACCTTTATTGCA
TCTACCGGTTATACCAGCATTAACGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTTCAAAGGTCCAAATGGT
TTCGAATACTTTGCCCCTGCCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCTGAATGGG
AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGTCTGCGTACCATTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGGAAAAAATACTATTTTAACACAAATACCAGCATTGCCTCAACGGGTTATACCATTATT
TCGGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTCGAATATTTTGCGCCTGCG
AACACTGATGCGAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTCGAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAATGGCTACAAA

ACCATCGATAATAAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCCGCAGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
GCGAATACGGACGCGAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCGTTATCAAAACCGTTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGGATACCGCCATGGCAGCAGCCGGTGGT
CTGTTTGAAATTGATGGCGTGATCTATTTTTTTGGTGTGGATGGTGTTAAAGCAGTTACCGGCTTTGTGACCGTGGGTGATGATAAATAC
TATTTCAATCCGATTAACGGTGGTGCAGCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAAACTATTATTTCAACCAGAGCGGTGTGCTG
CAGACCGGTGTGTTTAGCACCGAAGATGGCTTTAAATATTTTGCGCCAGCGAACACCCTGGATGAAAACCTGGAAGGCGAAGCGATTGAT
TTTACCGGCAAACTGATCATCGATGAAAACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTGCGGTGGAATGGAAAGAACTGGATGGCGAA
ATGCATTATTTTTCTCCGGAAACCGGTAAAGCGTTTAAAGGCCTGAACCAGATCGGCGATTACAAATACTACTTCAACAGCGATGGCGTG
ATGCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGGCTATACCGAAATTGATGGC
AAACATTTCTACTTCGCGGAAAACGGCGAAATGCAGATTGGCGTGTTCAATACCGAAGATGGTTTCAAATACTTCGCGCACCATAACGAA
GATCTGGGTAACGAAGAAGGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAACAAAATCTACTACTTTGATGATAGCTTTACC
GCGGTGGTGGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAATATTATTTCGATGAAGATACCGCGGAAGCGTATATTGGCCTGAGCCTGATT
AACGATGGCCAGTACTATTTTAACGATGATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAATGATAAAGTGTTCTATTTCAGCGATAGC
GGCATTATTGAAAGCGGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTGCAGATCGGCGTTTTTGATACC
AGCGATGGCTACAAATATTTCGCACCGGCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAATATAGCGGTCTGGTGCGTGTG
GGCGAAGATGTGTATTATTTCGGCGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATATGGAAAACGAAAGCGATAAATATTACTTT
AATCCGGAAACGAAAAAAGCGTGCAAAGGCATTAACCTGATCGATGATATCAAATACTATTTTGATGAAAAAGGCATTATGCGTACCGGT
CTGATTAGCTTCGAAAACAACAACTATTACTTCAACGAAAACGGTGAAATGCAGTTCGGCTACATCAACATCGAAGATAAAATGTTCTAC
TTCGGCGAAGATGGTGTTATGCAGATTGGTGTTTTTAACACCCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCCCATCAGAATACCCTGGATGAAAAT
TTCGAAGGTGAAAGCATTAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCACCGATGAATACATTGCGGCGACCGGC
AGCGTGATTATTGATGGCGAAGAATACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGATTAGCGAACATCATCATCATCACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNFYFDANNESK
MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTI
DGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIE
GQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHF
YFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMG
ANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGK
VYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAVTGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVF
STEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYF
NSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGI
LNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIES
GVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENES
DKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTP
DGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISEHHHHHH

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAAC
GGCAAACACTTTTATTTTAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCACCGGCAAAT
ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCTGAACGGCAAAAAATACTACTTTGGCAGCGAT
AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACC
ATTAACAACGACAAATATTATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTTCGATGCC
AACAACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTTGAGTATTTCGCTCCGGCAAACACCCATAATAACAACATT
GAAGGTCAGGCGATCGTTTATCAGAACAAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAGCCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
TACTTCAACCTGAACACAGCCGAAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTTCAACACCAACACCTTTATTGCA

TCTACCGGTTATACCAGCATTAACGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTTCAAAGGTCCAAATGGT
TTCGAATACTTTGCCCCTGCCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCTGAATGGG
AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGTCTGCGTACCATTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGGAAAAAATACTATTTTAACACAAATACCAGCATTGCCTCAACGGGTTATACCATTATT
TCGGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTCGAATATTTTGCGCCTGCG
AACACTGATGCGAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTCGAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCCGCAGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
GCGAATACGGACGCGAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCGTTATCAAAACCGTTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGGATACCGCCATGGCAGCAGCCGGTGGT
CTGTTTGAAATTGATGGCGTGATCTATTTTTTTGGTGTGGATGGTGTTAAAGCAGTGAGCGGTCTGATTTATATTAACGATAGCCTGTAT
TACTTTAAACCACCGGTGAATAACCTGATTACCGGCTTTGTGACCGTGGGTGATGATAAATACTATTTCAATCCGATTAACGGTGGTGCA
GCGAGCATTGGCGAAACCATCATCGATGACAAAAACTATTATTTCAACCAGAGCGGTGTGCTGCAGACCGGTGTGTTTAGCACCGAAGAT
GGCTTTAAATATTTTGCGCCAGCGAACACCCTGGATGAAAACCTGGAAGGCGAAGCGATTGATTTTACCGGCAAACTGATCATCGATGAA
AACATCTATTACTTCGATGATAACTATCGTGGTGCGGTGGAATGGAAAGAACTGGATGGCGAAATGCATTATTTTTCTCCGGAAACCGGT
AAAGCGTTTAAAGGCCTGAACCAGATCGGCGATTACAAATACTACTTCAACAGCGATGGCGTGATGCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAAC
GATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTGGGCTATACCGAAATTGATGGCAAACATTTCTACTTCGCGGAAAACGGC
GAAATGCAGATTGGCGTGTTCAATACCGAAGATGGTTTCAAATACTTCGCGCACCATAACGAAGATCTGGGTAACGAAGAAGGCGAAGAA
ATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAACAAAATCTACTACTTTGATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGGCTGGAAAGATCTGGAA
GATGGCAGCAAATATTATTTCGATGAAGATACCGCGGAAGCGTATATTGGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAACGAT
GATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAATGATAAAGTGTTCTATTTCAGCGATAGCGGCATTATTGAAAGCGGCGTGCAGAAC
ATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTGCAGATCGGCGTTTTTGATACCAGCGATGGCTACAAATATTTCGCACCG
GCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAATATAGCGGTCTGGTGCGTGTGGGCGAAGATGTGTATTATTTCGGCGAA
ACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATATGGAAAACGAAAGCGATAAATATTACTTTAATCCGGAAACGAAAAAAGCGTGCAAA
GGCATTAACCTGATCGATGATATCAAATACTATTTTGATGAAAAAGGCATTATGCGTACCGGTCTGATTAGCTTCGAAAACAACAACTAT
TACTTCAACGAAAACGGTGAAATGCAGTTCGGCTACATCAACATCGAAGATAAAATGTTCTACTTCGGCGAAGATGGTGTTATGCAGATT
GGTGTTTTTAACACCCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCCCATCAGAATACCCTGGATGAAAATTTCGAAGGTGAAAGCATTAACTATACC
GGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCACCGATGAATACATTGCGGCGACCGGCAGCGTGATTATTGATGGCGAAGAATAC
TACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGATTAGCGAACATCATCATCATCACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQN
EFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNFYFDANNESK
MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTI
DGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIE
GQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHF
YFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMG
ANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGK
VYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGE
TIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYF
SPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQ
VGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDV
YYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINI
EDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPD
TAQLVISEHHHHHH

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

ATGGCAACCGGTTGGCAGACCATCGATGGCAAAAAATATTATTTTAATACCAACACCGCAATTGCAAGCACCGGCTATACCATTATCAAC
GGCAAACACTTTTATTTTAACACCGACGGCATTATGCAGATTGGTGTGTTTAAAGGTCCGAACGGCTTTGAATACTTTGCACCGGCAAAT
ACCGATGCCAATAATATTGAAGGCCAGGCCATTCTGTATCAGAATGAATTTCTGACCCTGAACGGCAAAAAATACTACTTTGGCAGCGAT
AGCAAAGCAGTTACCGGTTGGCGCATCATCAACAATAAGAAATATTACTTCAACCCGAATAATGCAATTGCAGCAATTCATCTGTGCACC
ATTAACAACGACAAATATTATTTCAGCTATGACGGTATTCTGCAGAATGGCTACATTACCATCGAACGCAACAACTTTTATTTCGATGCC
AACAACGAAAGCAAAATGGTGACCGGTGTTTTCAAAGGCCCTAATGGTTTTGAGTATTTCGCTCCGGCAAACACCCATAATAACAACATT
GAAGGTCAGGCGATCGTTTATCAGAACAAATTCCTGACGCTGAATGGTAAGAAATACTATTTCGATAATGACAGCAAAGCCGTGACCGGC
TGGCAGACAATTGACGGGAAGAAATATTACTTTAATCTGAATACCGCAGAAGCAGCAACCGGTTGGCAAACGATCGACGGTAAAAAGTAC
TACTTCAACCTGAACACAGCCGAAGCAGCCACAGGATGGCAGACTATTGATGGAAAAAAATACTATTTCAACACCAACACCTTTATTGCA
TCTACCGGTTATACCAGCATTAACGGTAAACATTTCTACTTCAACACCGATGGTATCATGCAGATCGGCGTTTTCAAAGGTCCAAATGGT
TTCGAATACTTTGCCCCTGCCAATACAGATGCAAATAACATCGAGGGTCAGGCAATCCTGTACCAAAACAAATTTCTGACCCTGAATGGG
AAAAAATATTACTTTGGTAGCGATTCTAAAGCCGTTACCGGTCTGCGTACCATTGATGGTAAAAAATACTACTTTAATACGAATACAGCC
GTTGCGGTTACAGGCTGGCAGACCATTAACGGGAAAAAATACTATTTTAACACAAATACCAGCATTGCCTCAACGGGTTATACCATTATT
TCGGGTAAACACTTCTACTTTAATACCGATGGTATTATGCAAATCGGAGTCTTTAAAGGACCTGATGGGTTCGAATATTTTGCGCCTGCG
AACACTGATGCGAACAATATCGAAGGACAGGCAATCCGCTATCAGAATCGCTTTCTGTATCTGCACGACAACATCTATTATTTTGGCAAC
AATTCAAAAGCAGCCACCGGCTGGGTTACAATTGATGGCAACCGCTACTATTTCGAACCGAATACCGCAATGGGTGCAAATGGCTACAAA
ACCATCGATAATAAAAATTTCTATTTTCGCAACGGTCTGCCGCAGATCGGGGTATTTAAAGGTAGCAACGGCTTCGAATACTTCGCTCCA
GCGAATACGGACGCGAACAATATTGAGGGTCAAGCGATTCGTTATCAAAACCGTTTTCTGCATCTGCTGGGCAAAATCTACTACTTTGGC
AATAACAGTAAAGCAGTTACTGGATGGCAGACAATCAATGGTAAAGTGTACTATTTTATGCCGGATACCGCCATGGCAGCAGCCGGTGGT
CTGTTTGAAATTGATGGCGTGATCTATTTTTTTGGTGTGGATGGTGTTAAAGCAGTGAAAGGCCTGAACCAGATCGGCGATTACAAATAC
TACTTCAACAGCGATGGCGTGATGCAGAAAGGCTTTGTGAGCATCAACGATAACAAACACTATTTCGATGATAGCGGTGTGATGAAAGTG
GGCTATACCGAAATTGATGGCAAACATTTCTACTTCGCGGAAAACGGCGAAATGCAGATTGGCGTGTTCAATACCGAAGATGGTTTCAAA
TACTTCGCGCACCATAACGAAGATCTGGGTAACGAAGAAGGCGAAGAAATTAGCTATAGCGGCATCCTGAACTTCAACAACAAAATCTAC
TACTTTGATGATAGCTTTACCGCGGTGGTGGGCTGGAAAGATCTGGAAGATGGCAGCAAATATTATTTCGATGAAGATACCGCGGAAGCG
TATATTGGCCTGAGCCTGATTAACGATGGCCAGTACTATTTTAACGATGATGGCATTATGCAGGTGGGTTTCGTGACCATTAATGATAAA
GTGTTCTATTTCAGCGATAGCGGCATTATTGAAAGCGGCGTGCAGAACATTGATGATAACTACTTCTACATCGATGATAACGGCATTGTG
CAGATCGGCGTTTTTGATACCAGCGATGGCTACAAATATTTCGCACCGGCCAATACCGTGAACGATAACATTTATGGCCAGGCGGTGGAA
TATAGCGGTCTGGTGCGTGTGGGCGAAGATGTGTATTATTTCGGCGAAACCTATACCATCGAAACCGGCTGGATTTATGATATGGAAAAC
GAAAGCGATAAATATTACTTTAATCCGGAAACGAAAAAAGCGTGCAAAGGCATTAACCTGATCGATGATATCAAATACTATTTTGATGAA
AAAGGCATTATGCGTACCGGTCTGATTAGCTTCGAAAACAACAACTATTACTTCAACGAAAACGGTGAAATGCAGTTCGGCTACATCAAC
ATCGAAGATAAAATGTTCTACTTCGGCGAAGATGGTGTTATGCAGATTGGTGTTTTTAACACCCCGGATGGCTTCAAATACTTTGCCCAT
CAGAATACCCTGGATGAAAATTTCGAAGGTGAAAGCATTAACTATACCGGCTGGCTGGATCTGGATGAAAAACGCTACTACTTCACCGAT
GAATACATTGCGGCGACCGGCAGCGTGATTATTGATGGCGAAGAATACTACTTCGATCCGGATACCGCGCAGCTGGTGATTAGCGAACAT
CATCATCATCACCAT

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLN
GKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVF
KGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYY
FNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILY
QNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKT
IDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMP
DTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKAVKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFY
FAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAY
IGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVN
DNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISF
ENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDE

YIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISEHHHHHH

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
KKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVDGVKAPGIYG

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
KKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVDGVKAV

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
KKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVDGVKAV

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

MATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAIL
YQNEFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNAIAAIHLCTINNDKYYFSYDGILQNGYITIERN
NFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDG
KKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDG
IMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTA
VAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAI
RYQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNG
FEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDG
VIYFFGVDGVKAV

SEQ ID NO:32 – secuencia del fragmento de toxina B de F54Gly

TGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYF
DDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGV
QNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDP
DTAQLVISE

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

TGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDF
TGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKH
YFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYF
DDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGV
QNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIY
DMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYF
GEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDP
DTAQLVISE

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

SGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDG
FKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYK
YYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGN
EEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVG
FVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLV
RVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYY
FNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFT
DEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

KGLNQIGDYKYYFNSDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKY
FAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYY
FNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIY
GQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTG
LISFENNNYYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWL
DLDEKRYYFTDEYIAATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

MVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAE
AATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPN
GFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTING
KKYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHD
NIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDA
NNIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVK
APGIYGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPAN
TLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGV
MQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISY
SGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKV
FYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYY
FGETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNEN
GEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI
AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

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

VTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAIVYQNKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEA
ATGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPNG
FEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKYYFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGK
KYYFNTNTSIASTGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLYLHDN
IYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTIDNKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDAN
NIEGQAIRYQNRFLHLLGKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGVDGVKA
PGIYGRSMHNLITGFVTVGDDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANT
LDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFNSDGVM
QKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYS
GILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVF
YFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYF
GETYTIETGWIYDMENESDKYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQF
GYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYIAATGS
VIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende:

a) un polipéptido que comprende un fragmento aislado de toxina A de *Clostridium difficile* y un fragmento aislado de toxina B de *Clostridium difficile*; y
b) un coadyuvante que comprende una fracción de saponina inmunológicamente activa presentada en forma de un liposoma;

en la que el polipéptido comprende un fragmento del dominio de repetición de la toxina A y un fragmento del dominio de repetición de la toxina B.

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho coadyuvante comprende además uno cualquiera o más de un esterol, un lipopolisacárido y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).

3. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho esterol es colesterol.

4. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que dicha fracción de saponina inmunológicamente activa es QS21.

5. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho lipopolisacárido es un derivado de lípido A, tal como 3D-MPL.

6. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en la que dicho coadyuvante comprende colesterol, DOPC, 3D-MPL y QS21.

7. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en la que el adyuvante se formula en una dosis que comprende:

de 0,1 a 0,5 mg de colesterol,
de 0,25 a 2 mg de DOPC,
de 10 µg a 70 µgde 3D-MPL y
de 10 µg a 70 µg de QS21.

8. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en la que el adyuvante se formula en una dosis que comprende:

aproximadamente 0,25 mg de colesterol,
aproximadamente 1,0 mg de DOPC
aproximadamente 50 µg de 3D-MPL y
aproximadamente 50 µg de QS21.

9. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el polipéptido provoca anticuerpos que neutralizan la toxina A o la toxina B o ambas.

10. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el polipéptido es un polipéptido que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en la que

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

en la que el primer fragmento y el segundo fragmento se encuentran adyacentes entre sí.

11. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el primer extremo proximal se encuentra dentro de una repetición corta y/o el segundo extremo proximal se encuentra dentro de una repetición corta.

12. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que el primer extremo proximal y el segundo extremo proximal no interrumpen las porciones de repetición corta-repetición larga-repetición corta (SR-LR-SR).

13. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que el polipéptido comprende un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 27.

14. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en la que el polipéptido comprende:

(i) la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35; o
(ii) un polipéptido que tiene al menos un 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de similitud respecto de la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35; o
(iii) un fragmento de al menos 250, 280, 300, 350, 380, 400, 430, 450, 480, 500, 530, 550, 580 o 600 aminoácidos de la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34 o SEQ ID NO:35.

15. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el polipéptido es un polipéptido que comprende un primer fragmento y un segundo fragmento, en la que

(i) el primer fragmento es un fragmento del dominio de repetición de la toxina A;
(ii) el segundo fragmento es un fragmento del dominio de repetición de la toxina B;
(iii) el primer fragmento comprende un primer extremo proximal dentro de una primera porción de repetición;
(iv) el segundo fragmento comprende un segundo extremo proximal dentro de una segunda porción de repetición; y

en la que el primer fragmento y el segundo fragmento se encuentran adyacentes entre sí y en la que la primera porción de repetición y la segunda porción de repetición tienen similitud estructural entre sí.

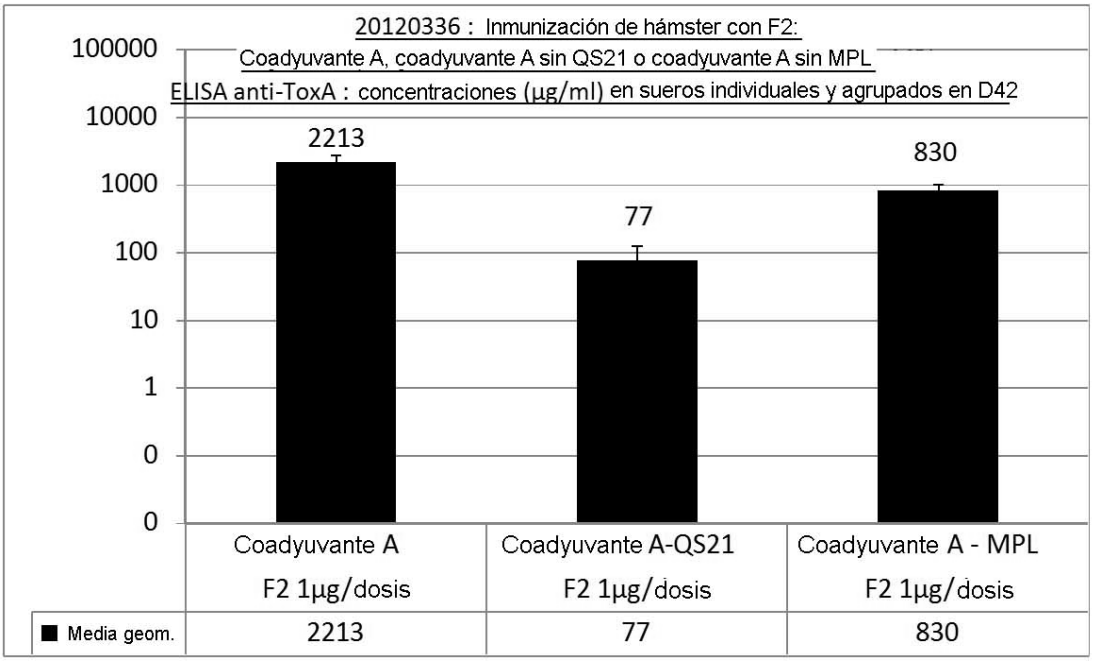
16. Una compoisición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el primer extremo proximal se encuentra dentro de la porción de repetición VII de la toxina A y/o el segundo extremo proximal se encuentra dentro de la porción de repetición II de la toxina B.

17. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que el primer extremo proximal se encuentra dentro de una repetición larga y/o el segundo extremo proximal se encuentra dentro de una repetición larga.

18. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

19. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada por *C. difficile*.

Figura 1


20120336 : Inmunización de hámster con F2:
Coadyuvante A, coadyuvante A sin QS21 o coadyuvante A sin MPL
ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros individuales y agrupados en D42
100000
10000
1000
100
10
1
0
0
2213
77
830
Coadyuvante A F2 1µg/dosis
Coadyuvante A-QS21 F2 1µg/dosis
Coadyuvante A - MPL F2 1µg/dosis
Media geom.
2213
77
830

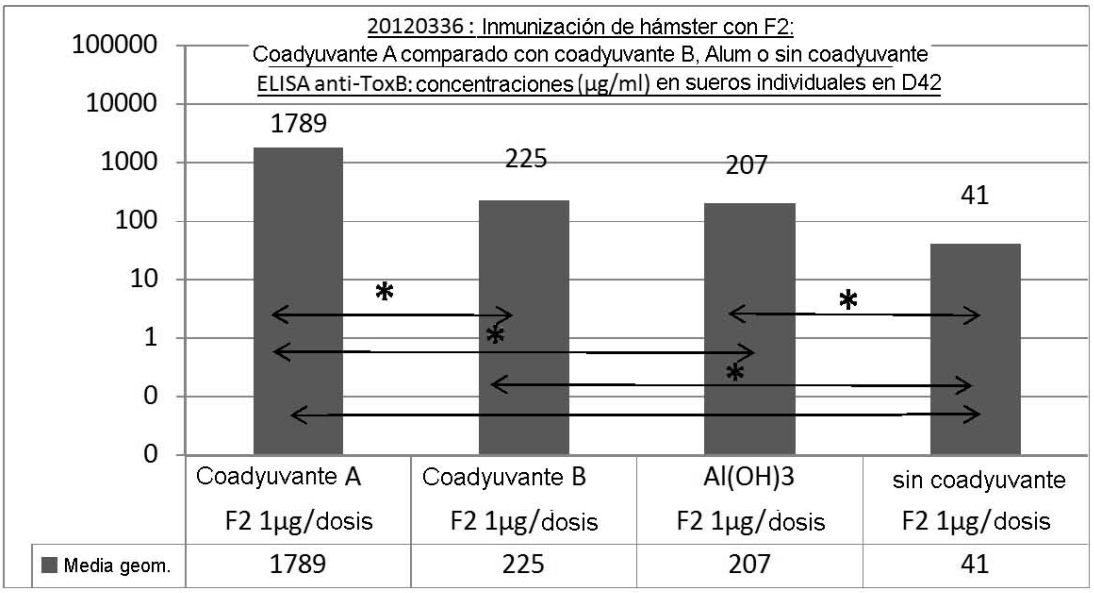
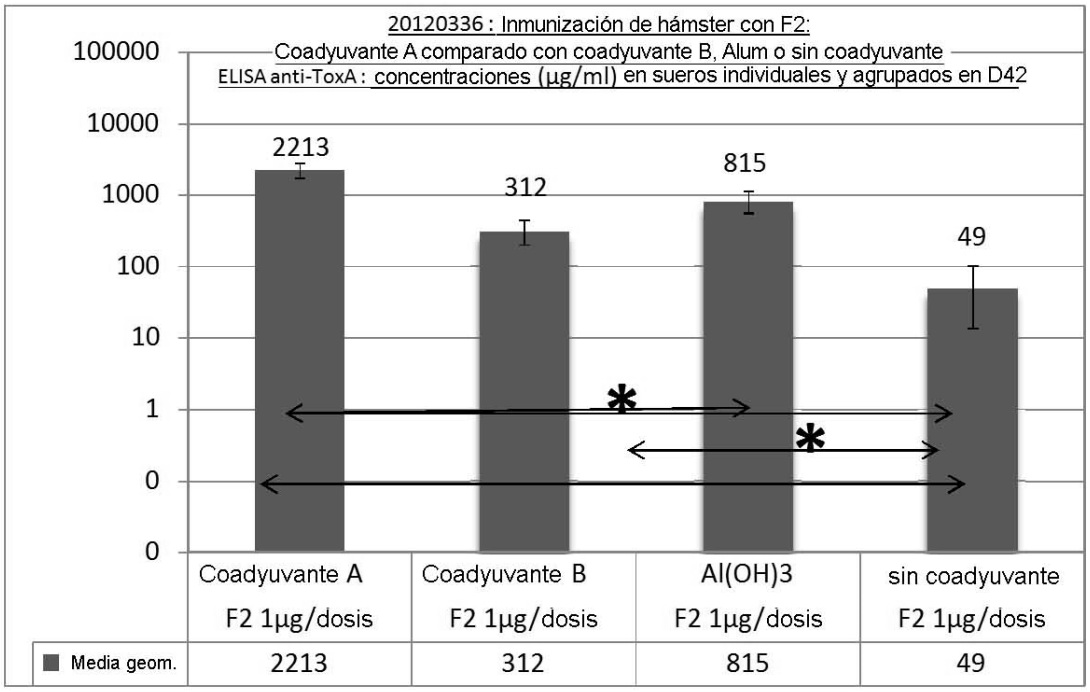

20120336 : Inmunización de hámster con F2:
Coadyuvante A comparado con coadyuvante B, Alum o sin coadyuvante
ELISA anti-ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros individuales en D42
100000
10000
1000
100
10
1
0
0
1789
225
207
41
*
*
*
*
Coadyuvante A F2 1µg/dosis
Coadyuvante B F2 1µg/dosis
Al(OH)3 F2 1µg/dosis
sin coadyuvante F2 1µg/dosis
Media geom.
1789
225
207
41

Figura 2


20120336 : Inmunización de hámster con F2:
Coadyuvante A comparado con coadyuvante B, Alum o sin coadyuvante
ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros individuales y agrupados en D42
100000
10000
1000
100
10
1
0
0
2213
312
815
49
*
*
Coadyuvante A F2 1µg/dosis
Coadyuvante B F2 1µg/dosis
Al(OH)3 F2 1µg/dosis
sin coadyuvante F2 1µg/dosis
Media geom.
2213
312
815
49

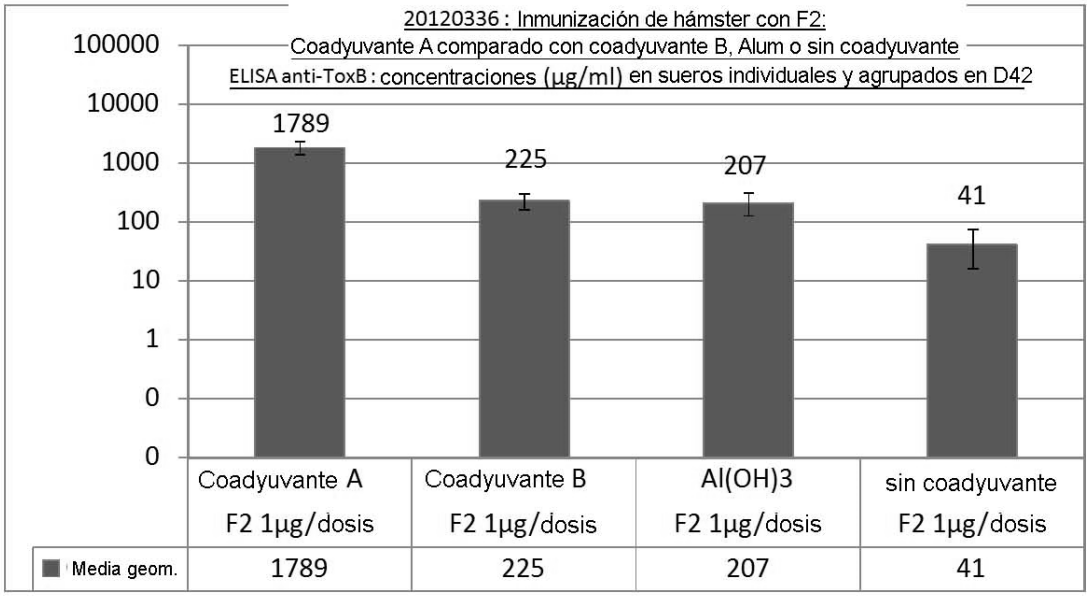
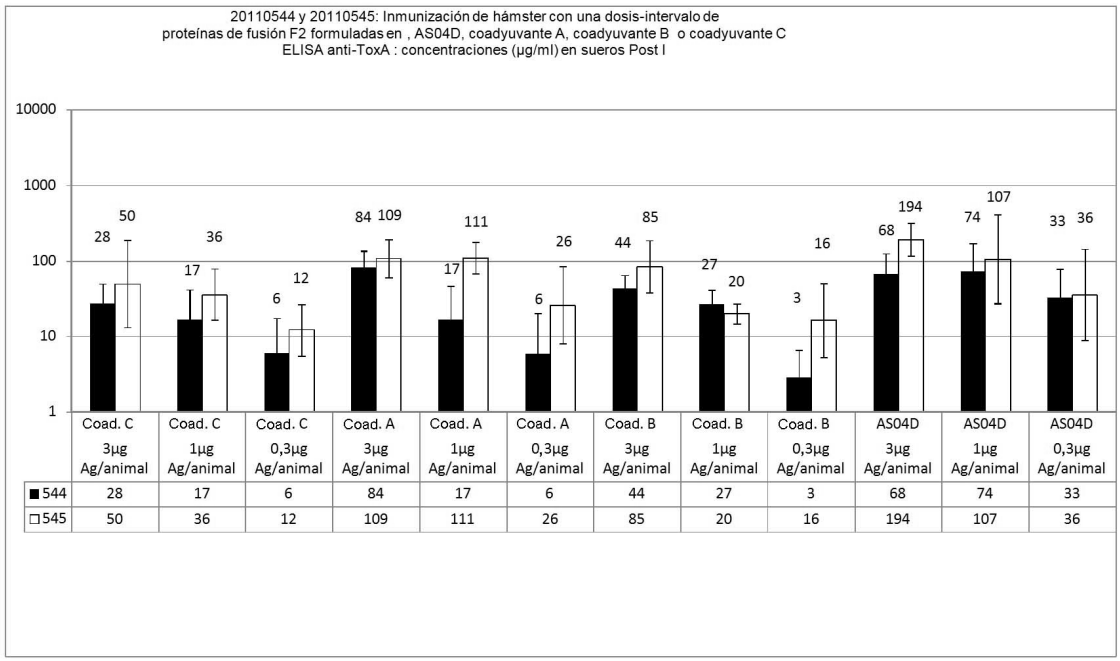
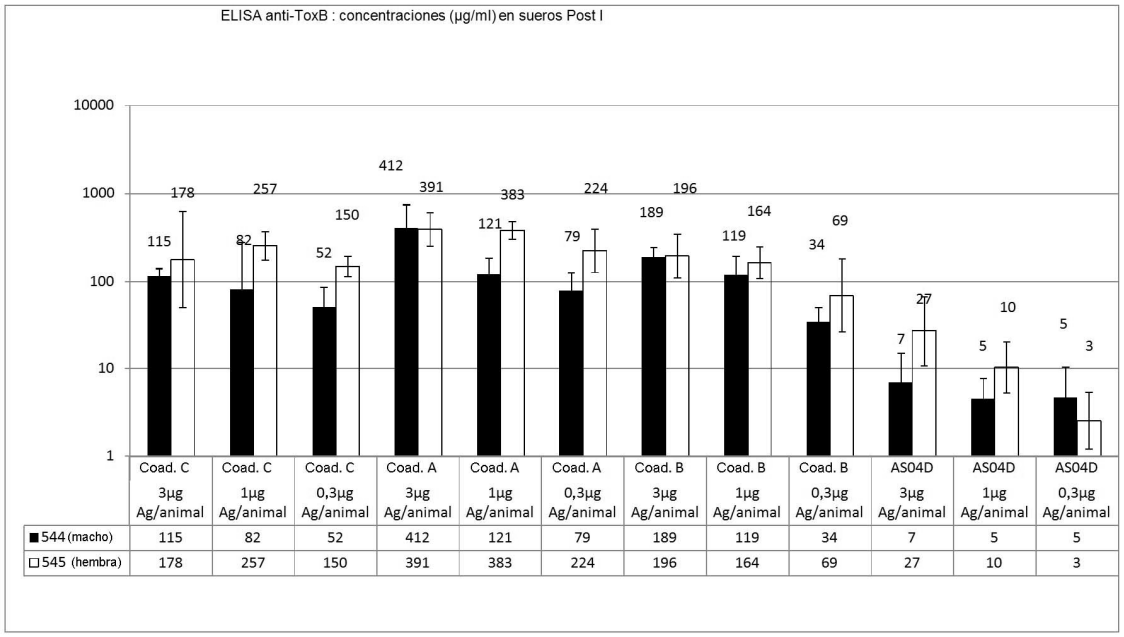

20120336 : Inmunización de hámster con F2:
Coadyuvante A comparado con coadyuvante B, Alum o sin coadyuvante
ELISA anti-ToxB : concentraciones (µg/ml) en sueros individuales y agrupados en D42
100000
10000
1000
100
10
1
0
0
1789
225
207
41
Coadyuvante A F2 1µg/dosis
Coadyuvante B F2 1µg/dosis
Al(OH)3 F2 1µg/dosis
sin coadyuvante F2 1µg/dosis
Media geom.
1789
225
207
41

Figura 3

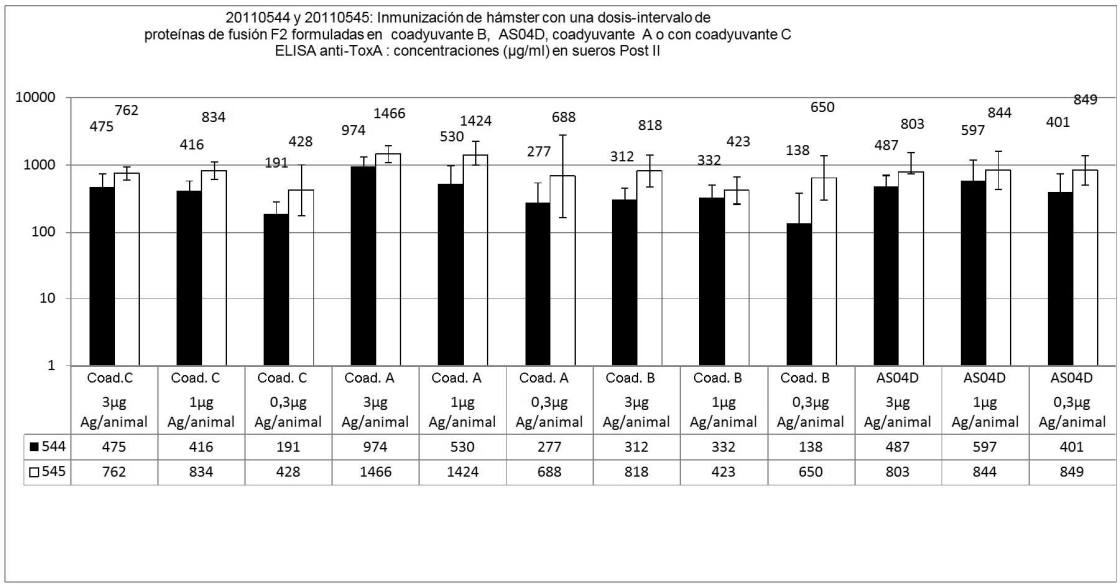


	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
■544	28	17	6	84	17	6	44	27	3	68	74	33
□545	50	36	12	109	111	26	85	20	16	194	107	36



	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
■544 (macho)	115	82	52	412	121	79	189	119	34	7	5	5
□545 (hembra)	178	257	150	391	383	224	196	164	69	27	10	3

Figura 4


20110544 y 20110545: Inmunización de hámster con una dosis-intervalo de
proteínas de fusión F2 formuladas en coadyuvante B, AS04D, coadyuvante A o con coadyuvante C
ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros Post II
10000
1000
100
10
1
475 762 416 834 191 428 974 1466 530 1424 277 688 312 818 332 423 138 650 487 803 597 844 401 849
Coad.C 3µg Ag/animal
Coad. C 1µg Ag/animal
Coad. C 0,3µg Ag/animal
Coad. A 3µg Ag/animal
Coad. A 1µg Ag/animal
Coad. A 0,3µg Ag/animal
Coad. B 3µg Ag/animal
Coad. B 1µg Ag/animal
Coad. B 0,3µg Ag/animal
AS04D 3µg Ag/animal
AS04D 1µg Ag/animal
AS04D 0,3µg Ag/animal
■544 475 416 191 974 530 277 312 332 138 487 597 401
□545 762 834 428 1466 1424 688 818 423 650 803 844 849

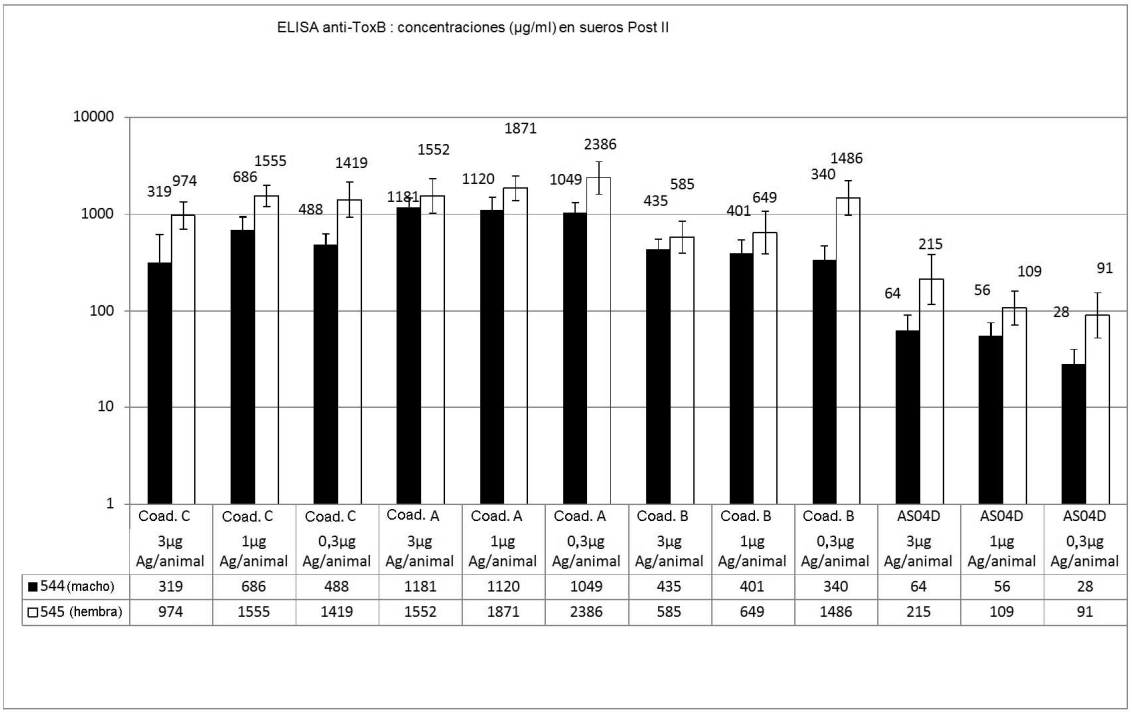
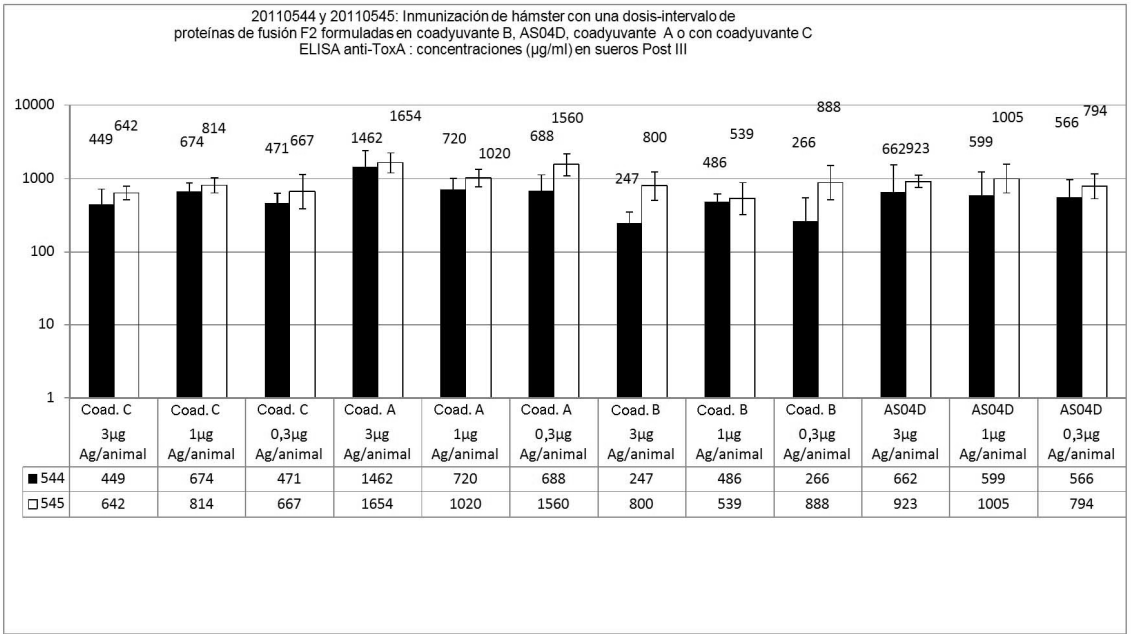
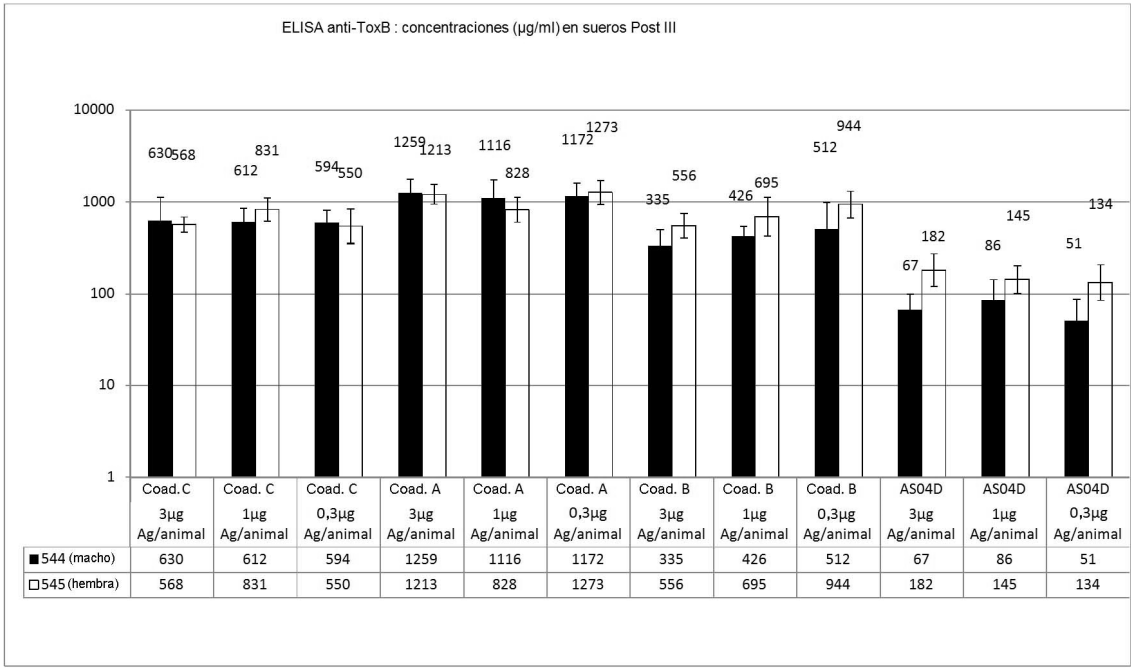

ELISA anti-ToxB : concentraciones (µg/ml) en sueros Post II
10000
1000
100
10
1
319 974 686 1555 488 1419 1181 1552 1120 1871 1049 2386 435 585 401 649 340 1486 64 215 56 109 28 91
Coad. C 3µg Ag/animal
Coad. C 1µg Ag/animal
Coad. C 0,3µg Ag/animal
Coad. A 3µg Ag/animal
Coad. A 1µg Ag/animal
Coad. A 0,3µg Ag/animal
Coad. B 3µg Ag/animal
Coad. B 1µg Ag/animal
Coad. B 0,3µg Ag/animal
AS04D 3µg Ag/animal
AS04D 1µg Ag/animal
AS04D 0,3µg Ag/animal
■544 (macho) 319 686 488 1181 1120 1049 435 401 340 64 56 28
□545 (hembra) 974 1555 1419 1552 1871 2386 585 649 1486 215 109 91

Figura 5

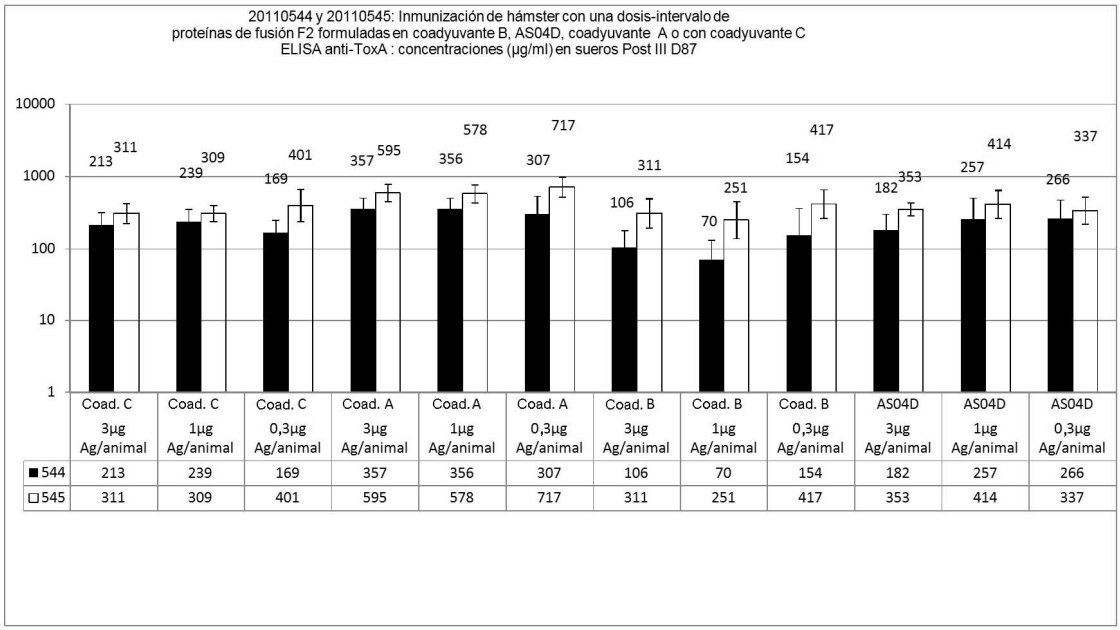


	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
■544	449	674	471	1462	720	688	247	486	266	662	599	566
□545	642	814	667	1654	1020	1560	800	539	888	923	1005	794

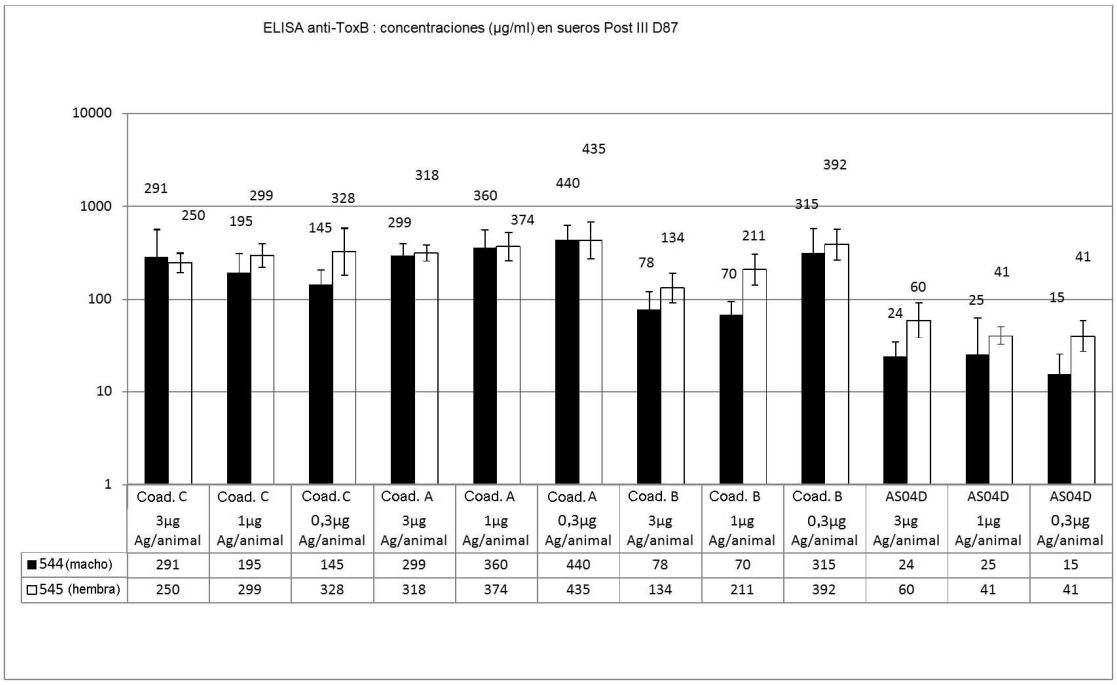


	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
■544 (macho)	630	612	594	1259	1116	1172	335	426	512	67	86	51
□545 (hembra)	568	831	550	1213	828	1273	556	695	944	182	145	134

Figura 6

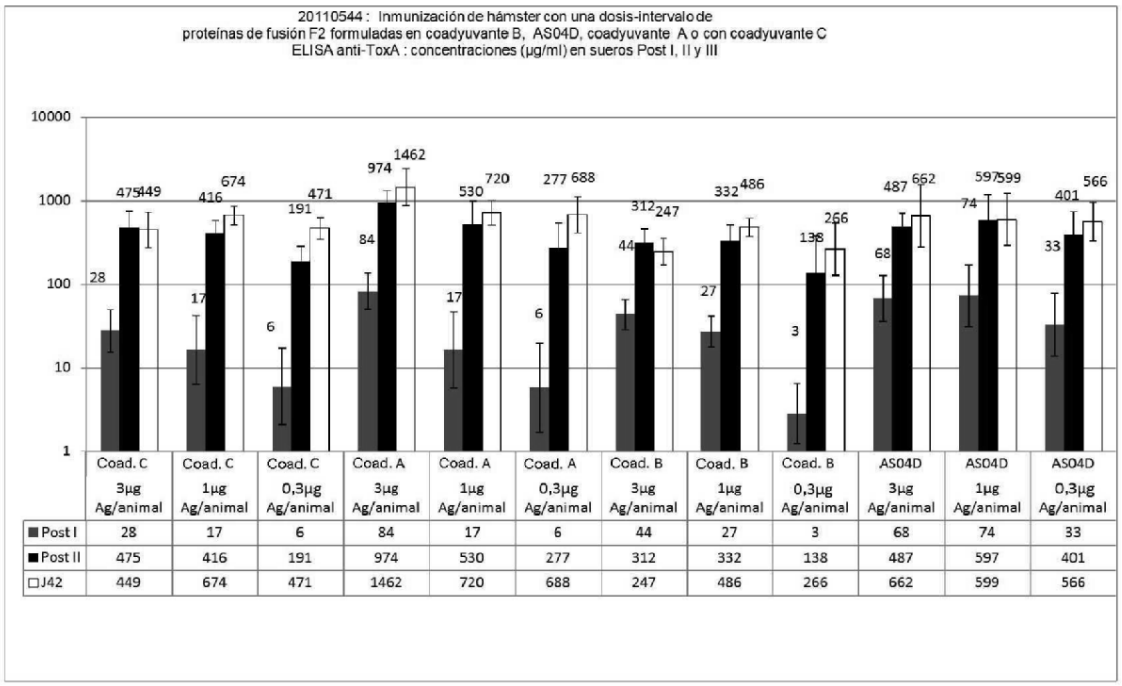


	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
■544	213	239	169	357	356	307	106	70	154	182	257	266
□545	311	309	401	595	578	717	311	251	417	353	414	337

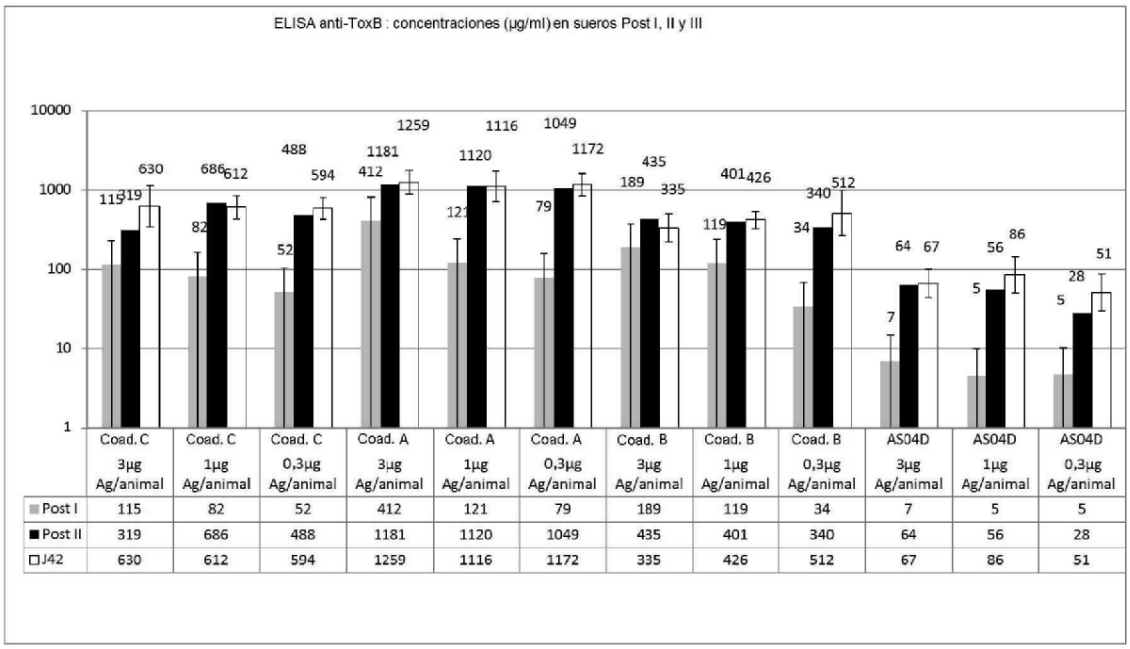


	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
■544 (macho)	291	195	145	299	360	440	78	70	315	24	25	15
□545 (hembra)	250	299	328	318	374	435	134	211	392	60	41	41

Figura 7



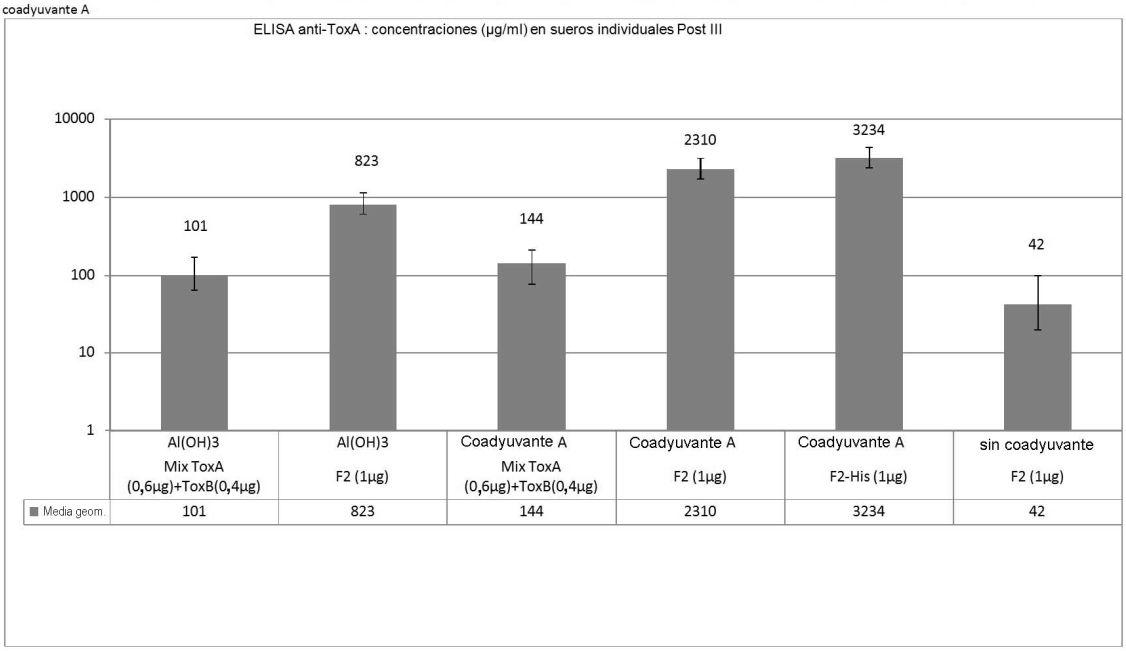
	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
Post I	28	17	6	84	17	6	44	27	3	68	74	33
Post II	475	416	191	974	530	277	312	332	138	487	597	401
J42	449	674	471	1462	720	688	247	486	266	662	599	566



	Coad. C 3µg Ag/animal	Coad. C 1µg Ag/animal	Coad. C 0,3µg Ag/animal	Coad. A 3µg Ag/animal	Coad. A 1µg Ag/animal	Coad. A 0,3µg Ag/animal	Coad. B 3µg Ag/animal	Coad. B 1µg Ag/animal	Coad. B 0,3µg Ag/animal	AS04D 3µg Ag/animal	AS04D 1µg Ag/animal	AS04D 0,3µg Ag/animal
Post I	115	82	52	412	121	79	189	119	34	7	5	5
Post II	319	686	488	1181	1120	1049	435	401	340	64	56	28
J42	630	612	594	1259	1116	1172	335	426	512	67	86	51

Figura 8

20120008 y 20120011 : Inmunización de hámsteres hembras y machos. Comparación de la inmunogenicidad de una mezcla (ToxA+ToxB) con la proteína de fusión F2 formulada en Alum o coadyuvante A



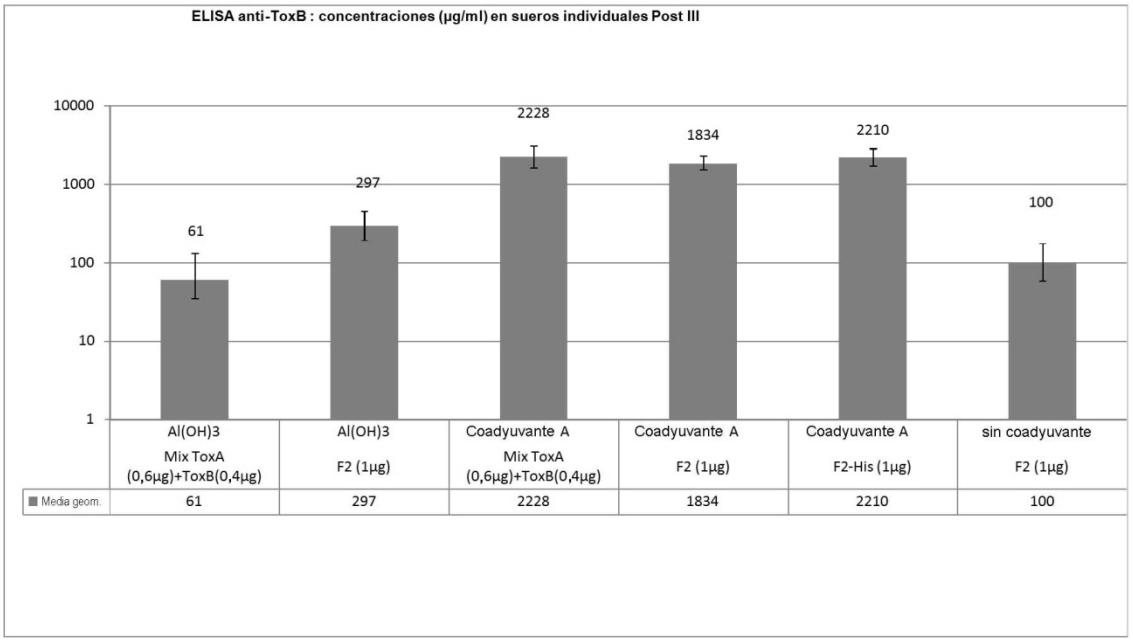


Figura 9

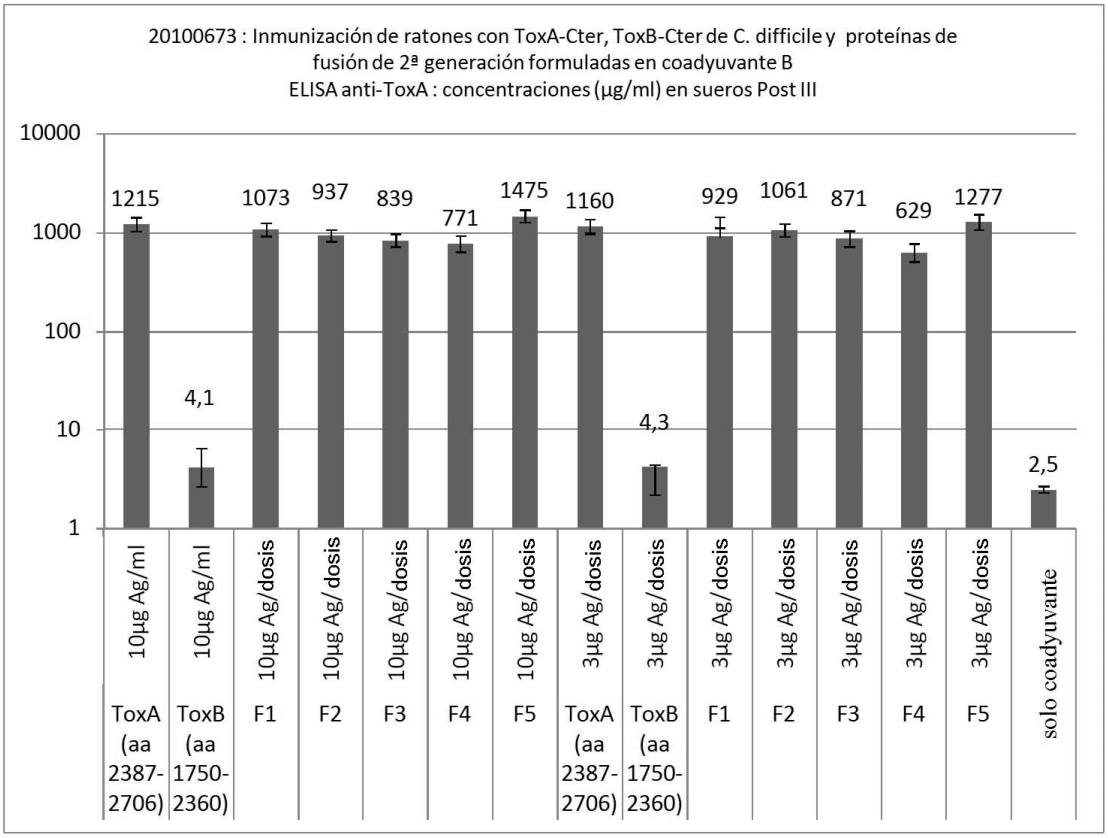

20100673 : Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter de C. difficile y proteínas de fusión de 2ª generación formuladas en coadyuvante B
ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros Post III
10000
1000
100
10
1
1215
4,1
1073
937
839
771
1475
1160
4,3
929
1061
871
629
1277
2,5
10µg Ag/ml ToxA (aa 2387-2706)
10µg Ag/ml ToxB (aa 1750-2360)
10µg Ag/dosis F1
10µg Ag/dosis F2
10µg Ag/dosis F3
10µg Ag/dosis F4
10µg Ag/dosis F5
3µg Ag/dosis ToxA (aa 2387-2706)
3µg Ag/dosis ToxB (aa 1750-2360)
3µg Ag/dosis F1
3µg Ag/dosis F2
3µg Ag/dosis F3
3µg Ag/dosis F4
3µg Ag/dosis F5
solo coadyuvante

Figura 10

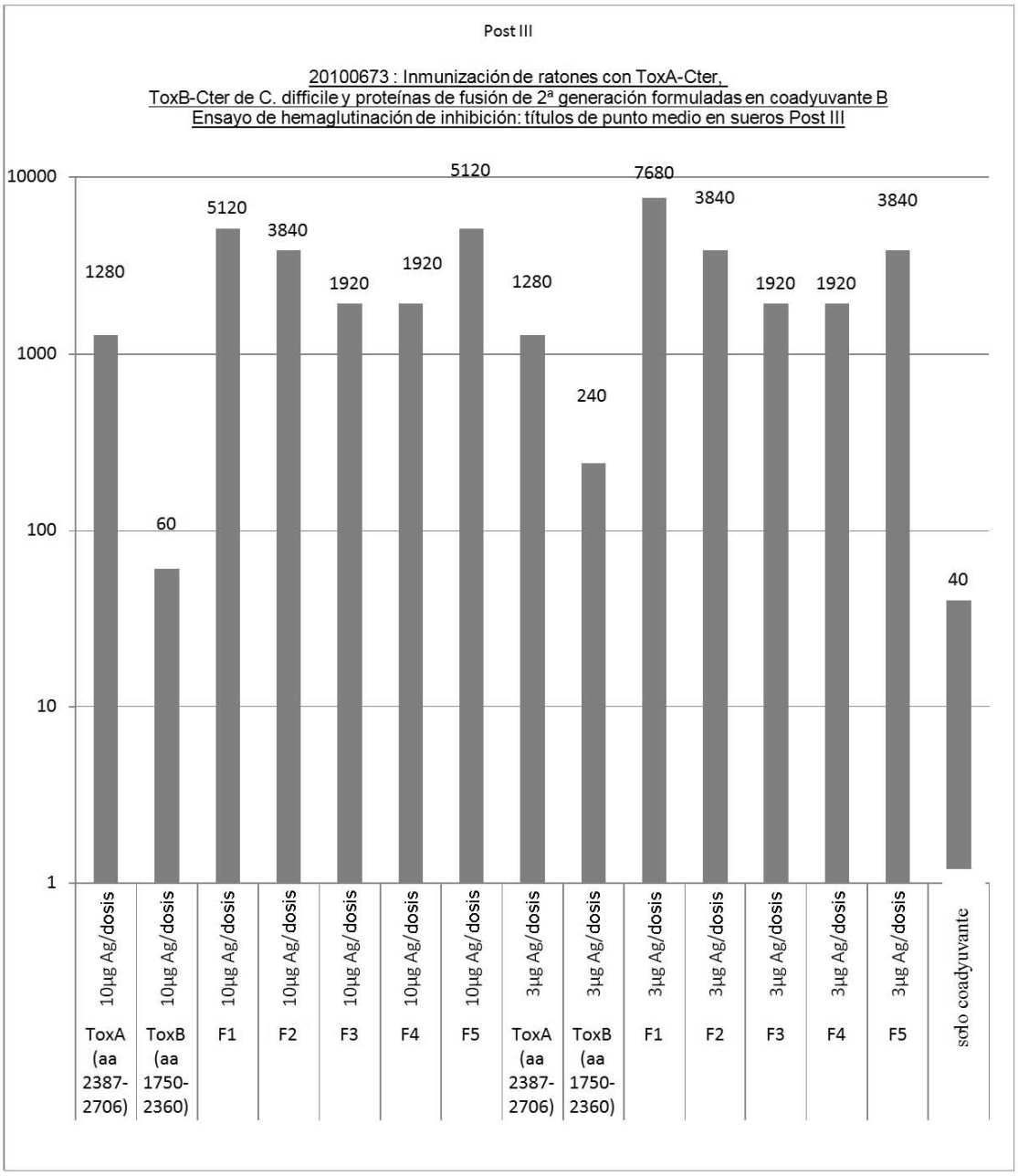

Post III
20100673 : Inmunización de ratones con ToxA-Cter,
ToxB-Cter de C. difficile y proteínas de fusión de 2ª generación formuladas en coadyuvante B
Ensayo de hemaglutinación de inhibición: títulos de punto medio en sueros Post III
10000
1000
100
10
1
1280
60
5120
3840
1920
1920
5120
1280
240
7680
3840
1920
1920
3840
40
10µg Ag/dosis
ToxA (aa 2387-2706)
10µg Ag/dosis
ToxB (aa 1750-2360)
10µg Ag/dosis
F1
10µg Ag/dosis
F2
10µg Ag/dosis
F3
10µg Ag/dosis
F4
10µg Ag/dosis
F5
3µg Ag/dosis
ToxA (aa 2387-2706)
3µg Ag/dosis
ToxB (aa 1750-2360)
3µg Ag/dosis
F1
3µg Ag/dosis
F2
3µg Ag/dosis
F3
3µg Ag/dosis
F4
3µg Ag/dosis
F5
sólo coadyuvante

Figura 11

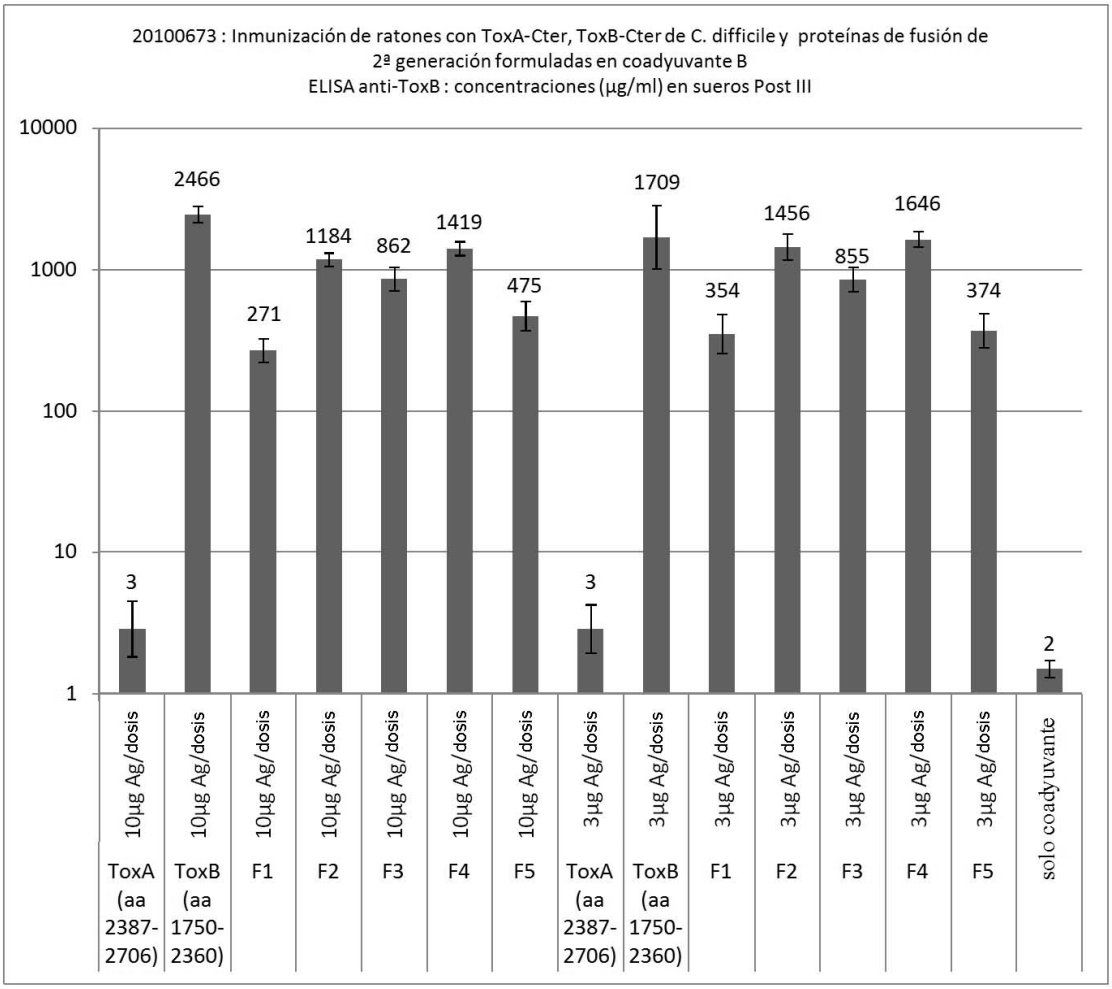

20100673 : Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter de C. difficile y proteínas de fusión de 2ª generación formuladas en coadyuvante B
ELISA anti-ToxB : concentraciones (µg/ml) en sueros Post III
10000
1000
100
10
1
3
2466
271
1184
862
1419
475
3
1709
354
1456
855
1646
374
2
10µg Ag/dosis ToxA (aa 2387-2706)
10µg Ag/dosis ToxB (aa 1750-2360)
10µg Ag/dosis F1
10µg Ag/dosis F2
10µg Ag/dosis F3
10µg Ag/dosis F4
10µg Ag/dosis F5
3µg Ag/dosis ToxA (aa 2387-2706)
3µg Ag/dosis ToxB (aa 1750-2360)
3µg Ag/dosis F1
3µg Ag/dosis F2
3µg Ag/dosis F3
3µg Ag/dosis F4
3µg Ag/dosis F5
solo coadyuvante

Figura 12

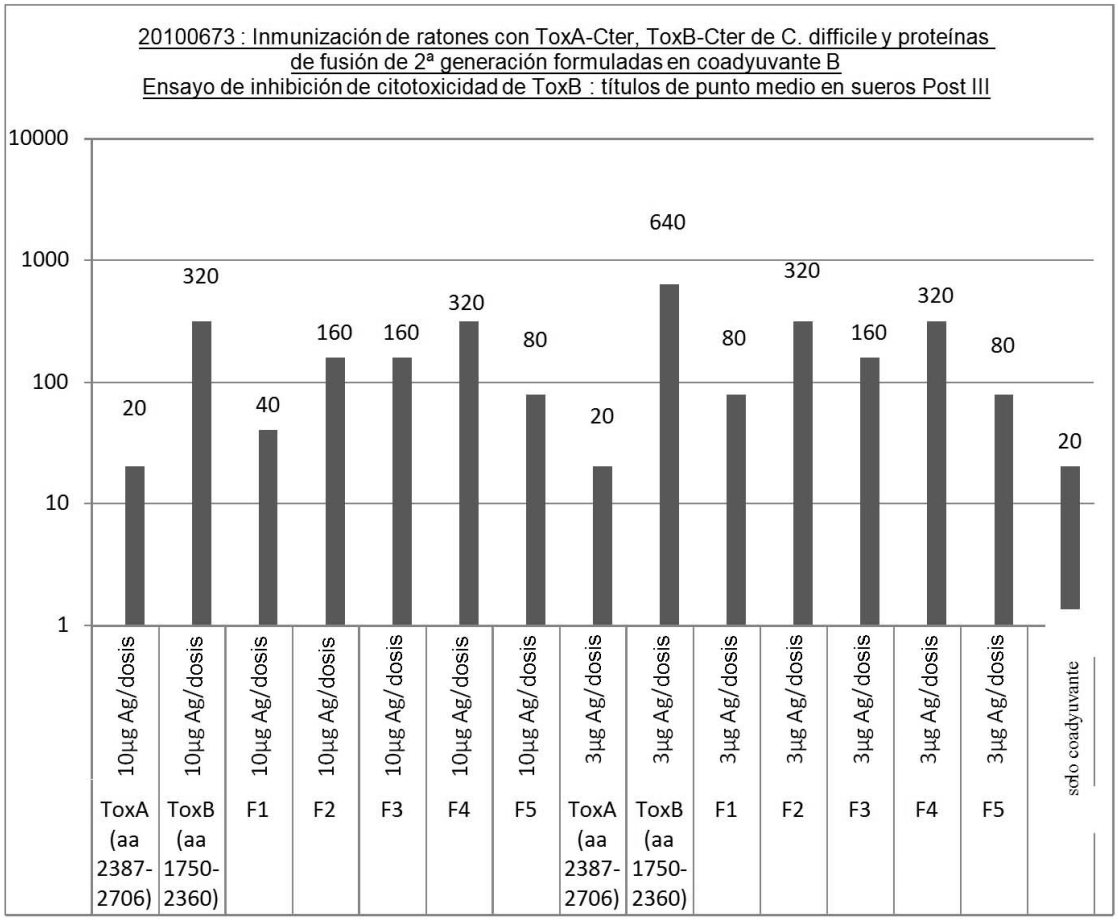

20100673 : Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter de C. difficile y proteínas de fusión de 2ª generación formuladas en coadyuvante B
Ensayo de inhibición de citotoxicidad de ToxB : títulos de punto medio en sueros Post III
10000
1000
100
10
1
20
320
40
160
160
320
80
20
640
80
320
160
320
80
20
10µg Ag/dosis
3µg Ag/dosis
ToxA (aa 2387-2706)
ToxB (aa 1750-2360)
F1
F2
F3
F4
F5
sólo coadyuvante

Figura 13

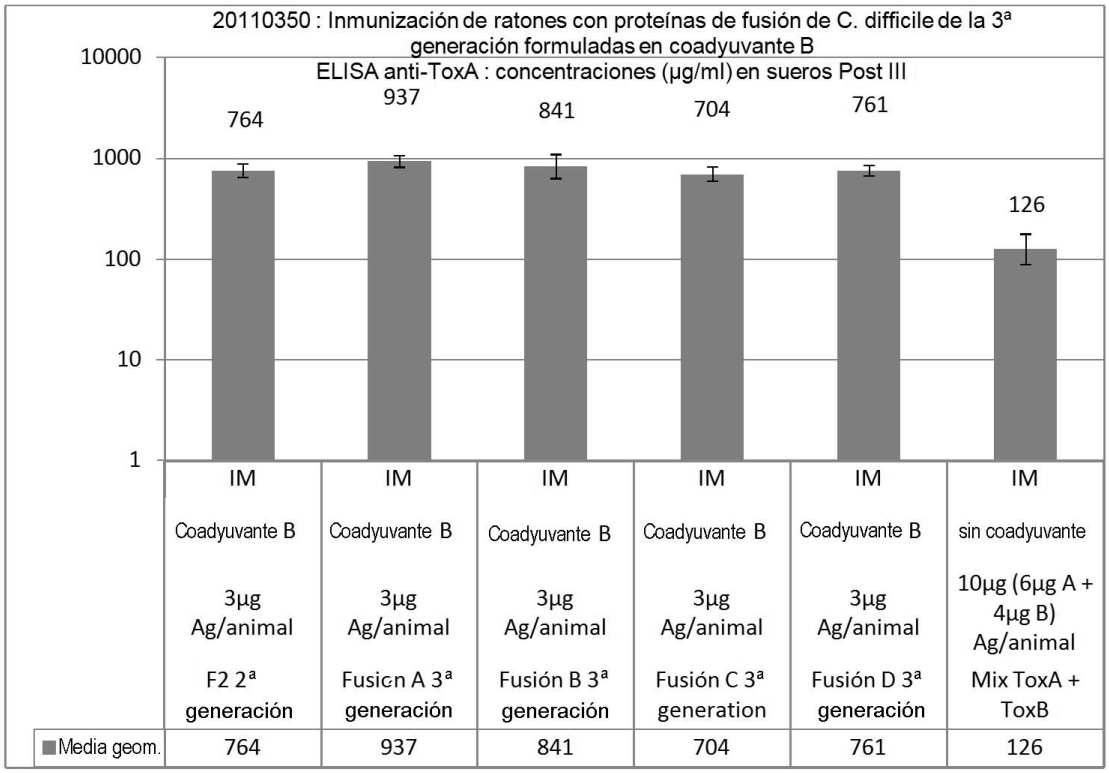

20110350 : Inmunización de ratones con proteínas de fusión de C. difficile de la 3ª generación formuladas en coadyuvante B
ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros Post III
10000
1000
100
10
1
764
937
841
704
761
126
IM
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
F2 2ª generación
IM
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
Fusion A 3ª generación
IM
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
Fusión B 3ª generación
IM
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
Fusión C 3ª generation
IM
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
Fusión D 3ª generación
IM
sin coadyuvante
10µg (6µg A + 4µg B) Ag/animal
Mix ToxA + ToxB
Media geom.
764
937
841
704
761
126

Figura 14

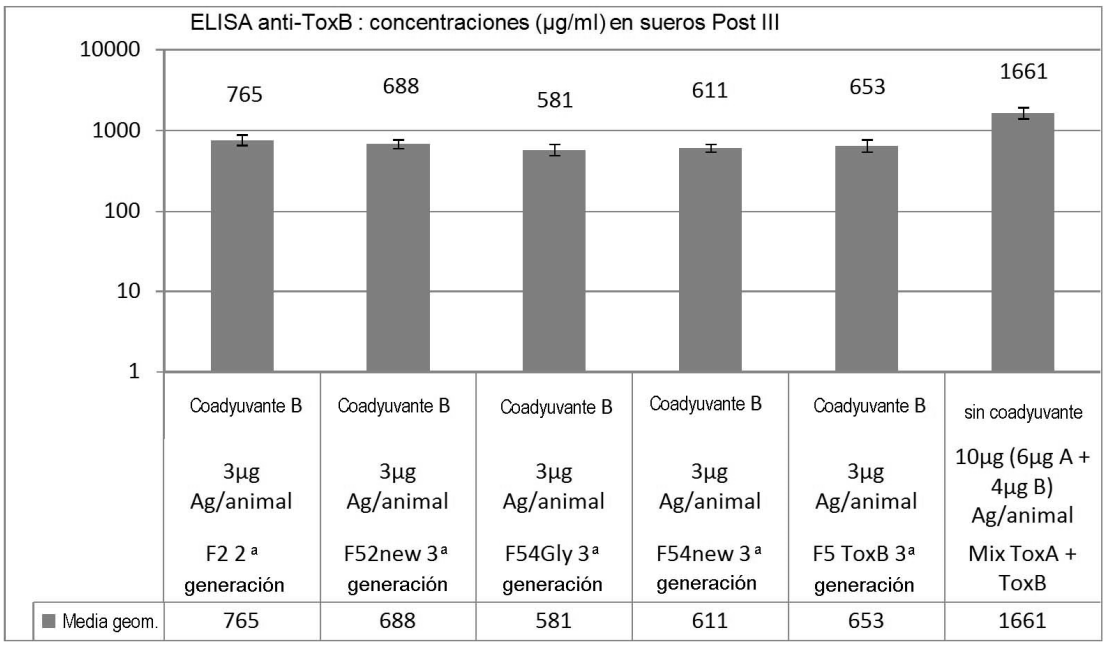

ELISA anti-ToxB : concentraciones (µg/ml) en sueros Post III
10000
1000
100
10
1
765
688
581
611
653
1661
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
F2 2ª generación
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
F52new 3ª generación
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
F54Gly 3ª generación
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
F54new 3ª generación
Coadyuvante B
3µg Ag/animal
F5 ToxB 3ª generación
sin coadyuvante
10µg (6µg A + 4µg B) Ag/animal
Mix ToxA + ToxB
Media geom.
765
688
581
611
653
1661

Figura 15

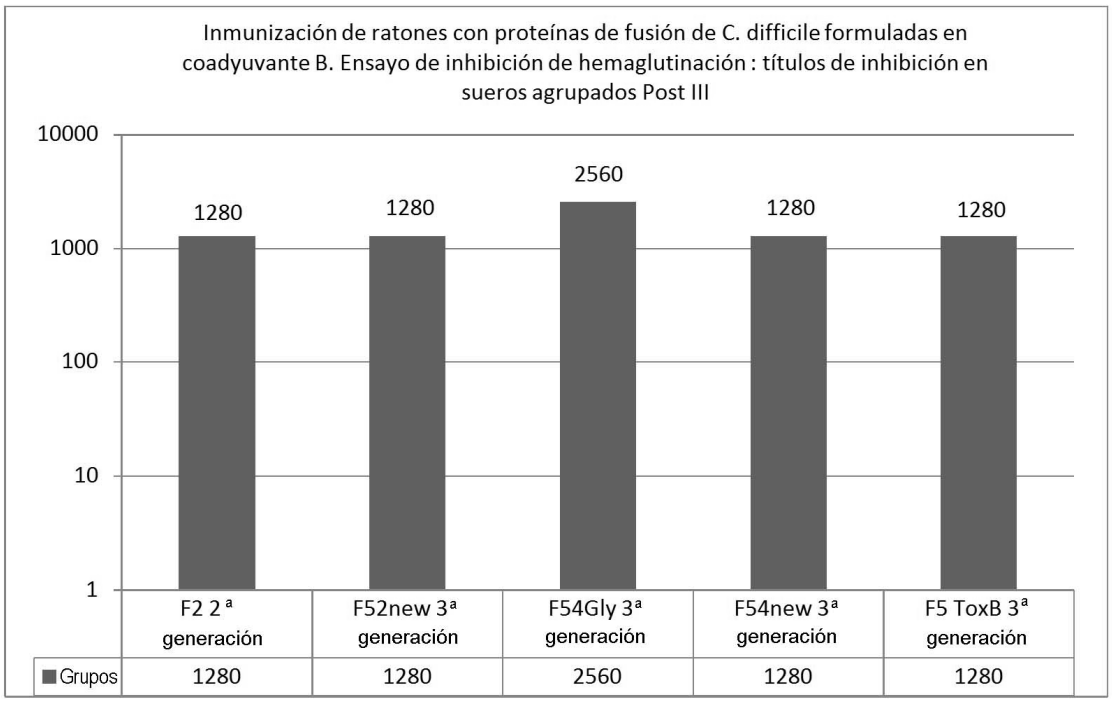

Inmunización de ratones con proteínas de fusión de C. difficile formuladas en coadyuvante B. Ensayo de inhibición de hemaglutinación : títulos de inhibición en sueros agrupados Post III
10000
1000
100
10
1
1280
1280
2560
1280
1280
F2 2ª generación
F52new 3ª generación
F54Gly 3ª generación
F54new 3ª generación
F5 ToxB 3ª generación
Grupos
1280
1280
2560
1280
1280

Figura 16

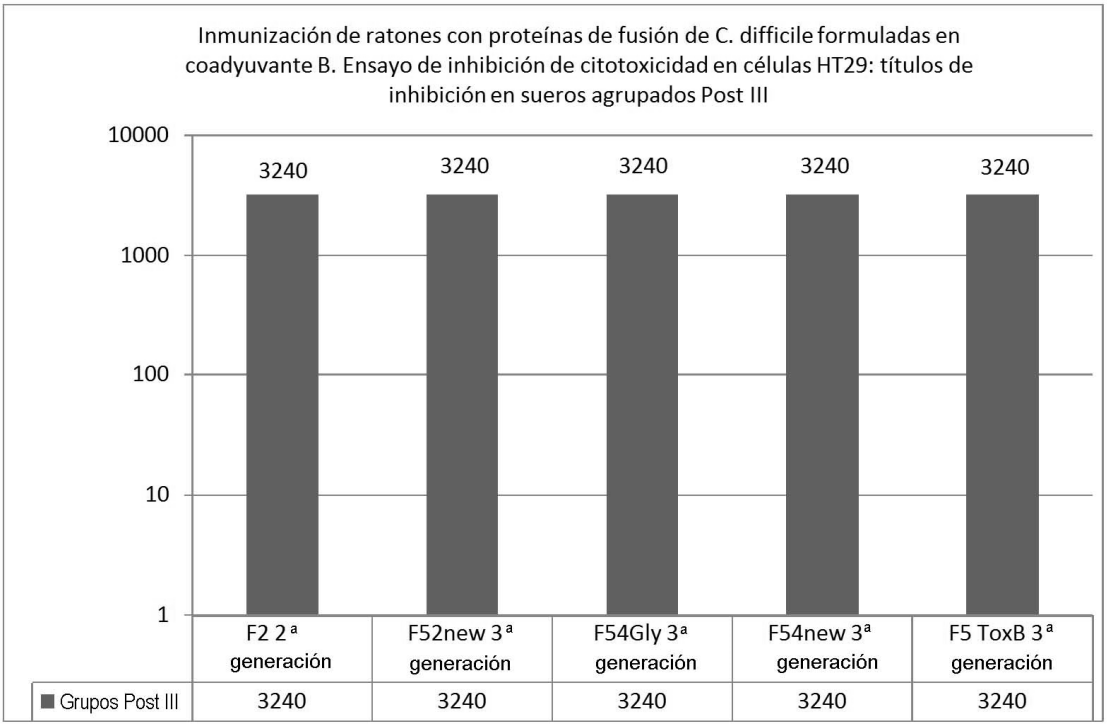

Inmunización de ratones con proteínas de fusión de C. difficile formuladas en coadyuvante B. Ensayo de inhibición de citotoxicidad en células HT29: títulos de inhibición en sueros agrupados Post III
10000
1000
100
10
1
3240
3240
3240
3240
3240
F2 2ª generación
F52new 3ª generación
F54Gly 3ª generación
F54new 3ª generación
F5 ToxB 3ª generación
Grupos Post III
3240
3240
3240
3240
3240

Figura 17

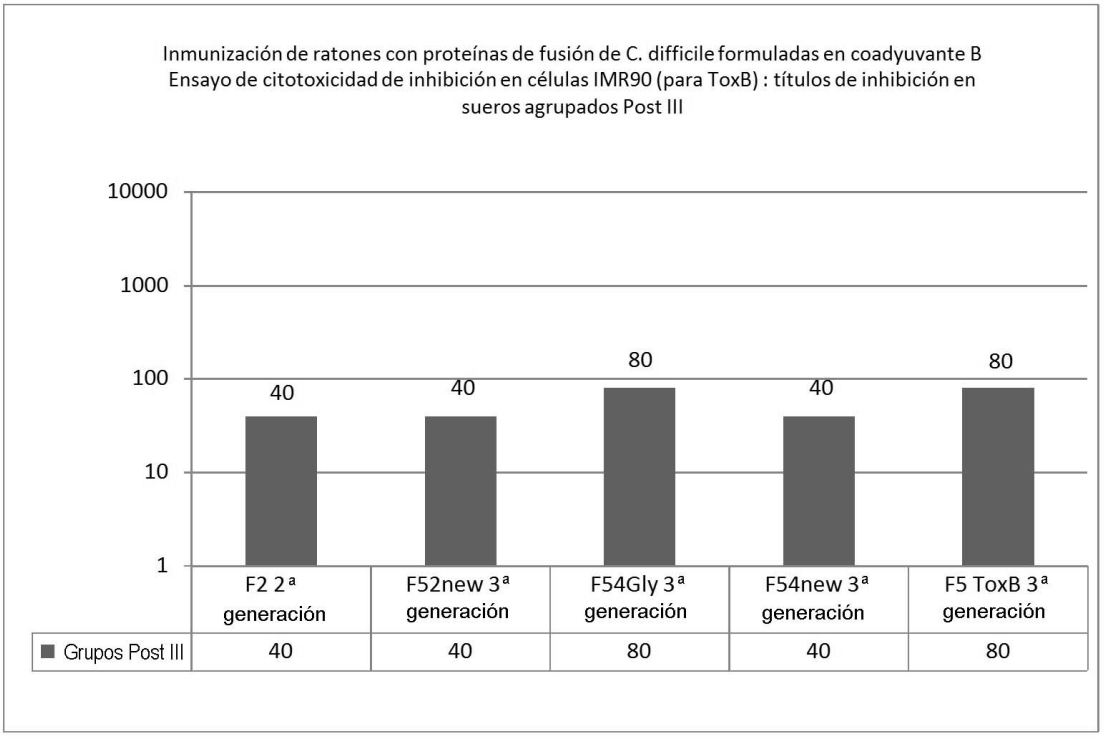

Inmunización de ratones con proteínas de fusión de C. difficile formuladas en coadyuvante B
Ensayo de citotoxicidad de inhibición en células IMR90 (para ToxB) : títulos de inhibición en sueros agrupados Post III
10000
1000
100
10
1
40
40
80
40
80
F2 2ª generación
F52new 3ª generación
F54Gly 3ª generación
F54new 3ª generación
F5 ToxB 3ª generación
Grupos Post III
40
40
80
40
80

Figura 18

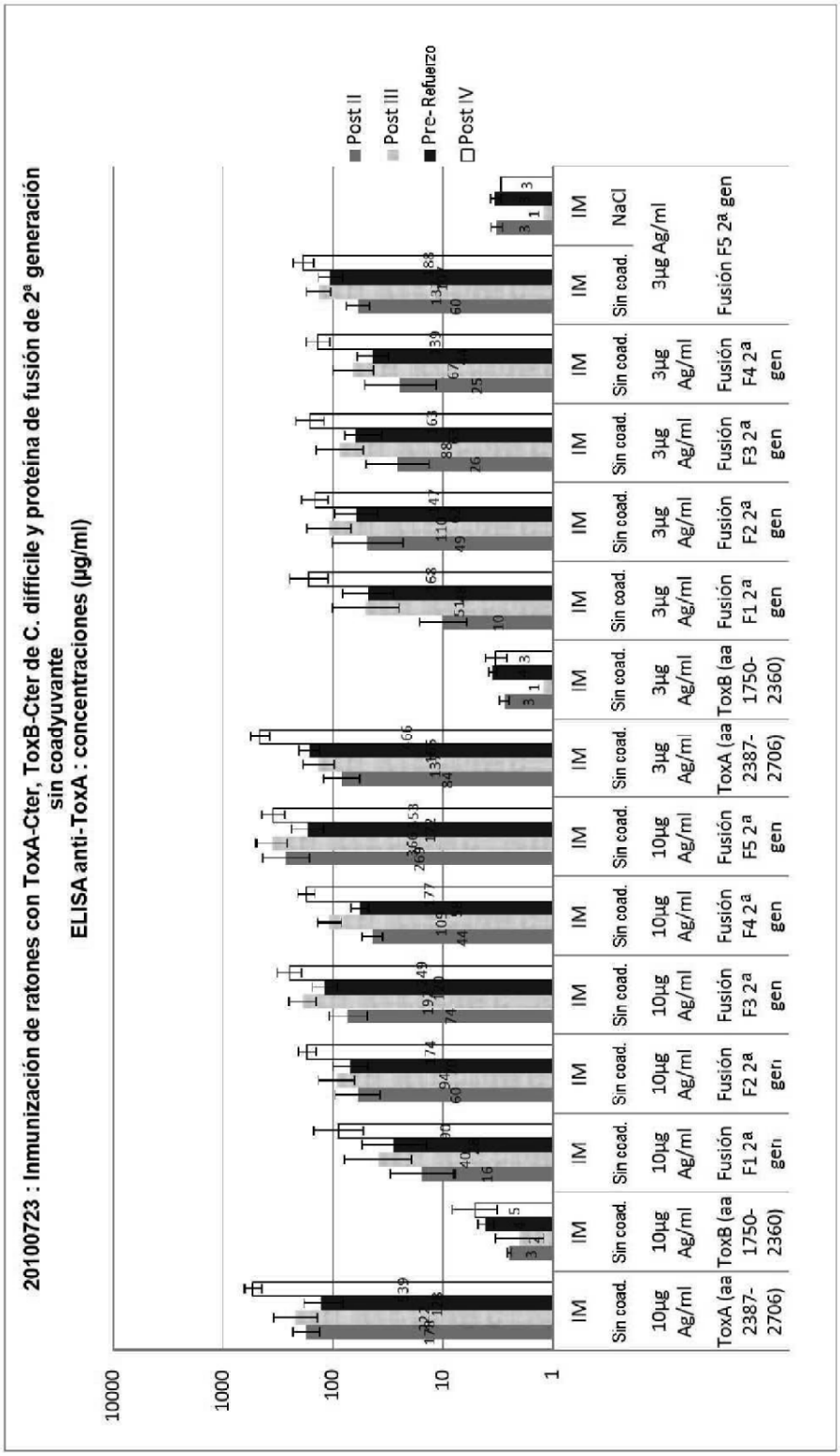

20100723 : Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter de C. difficile y proteína de fusión de 2ª generación sin coadyuvante
ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml)
Post II
Post III
Pre-Refuerzo
Post IV
10000
1000
100
10
1
IM
Sin coad.
10µg Ag/ml
ToxA (aa 2387-2706)
ToxB (aa 1750-2360)
Fusión F1 2ª gen
Fusión F2 2ª gen
Fusión F3 2ª gen
Fusión F4 2ª gen
Fusión F5 2ª gen
3µg Ag/ml
NaCl

Figura 19

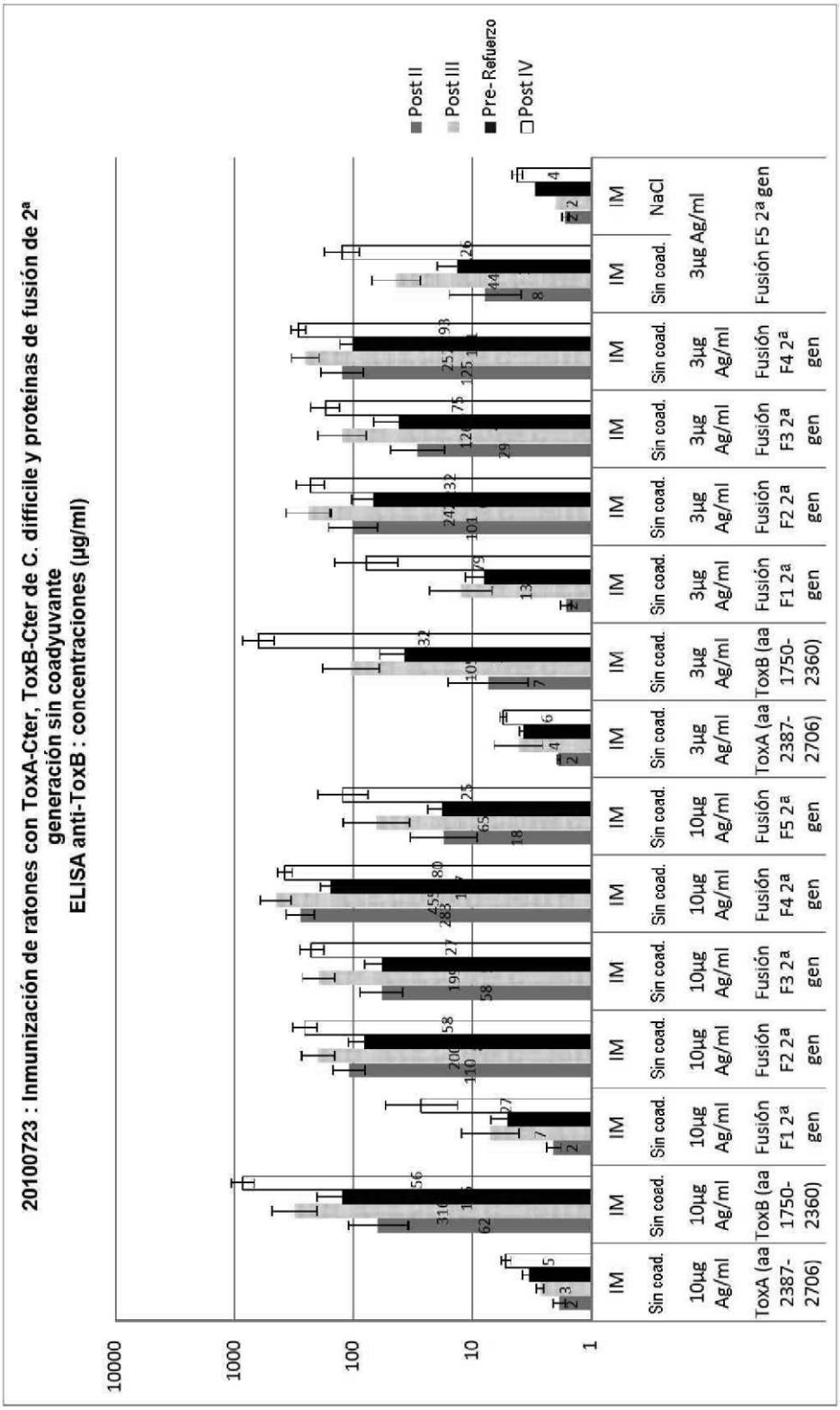

20100723 : Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter de C. difficile y proteínas de fusión de 2ª generación sin coadyuvante
ELISA anti-ToxB : concentraciones (µg/ml)
Post II
Post III
Pre-Refuerzo
Post IV
10000
1000
100
10
1
IM
Sin coad.
10µg Ag/ml
ToxA (aa 2387-2706)
ToxB (aa 1750-2360)
Fusión F1 2ª gen
Fusión F2 2ª gen
Fusión F3 2ª gen
Fusión F4 2ª gen
Fusión F5 2ª gen
3µg Ag/ml
NaCl

Figura 20

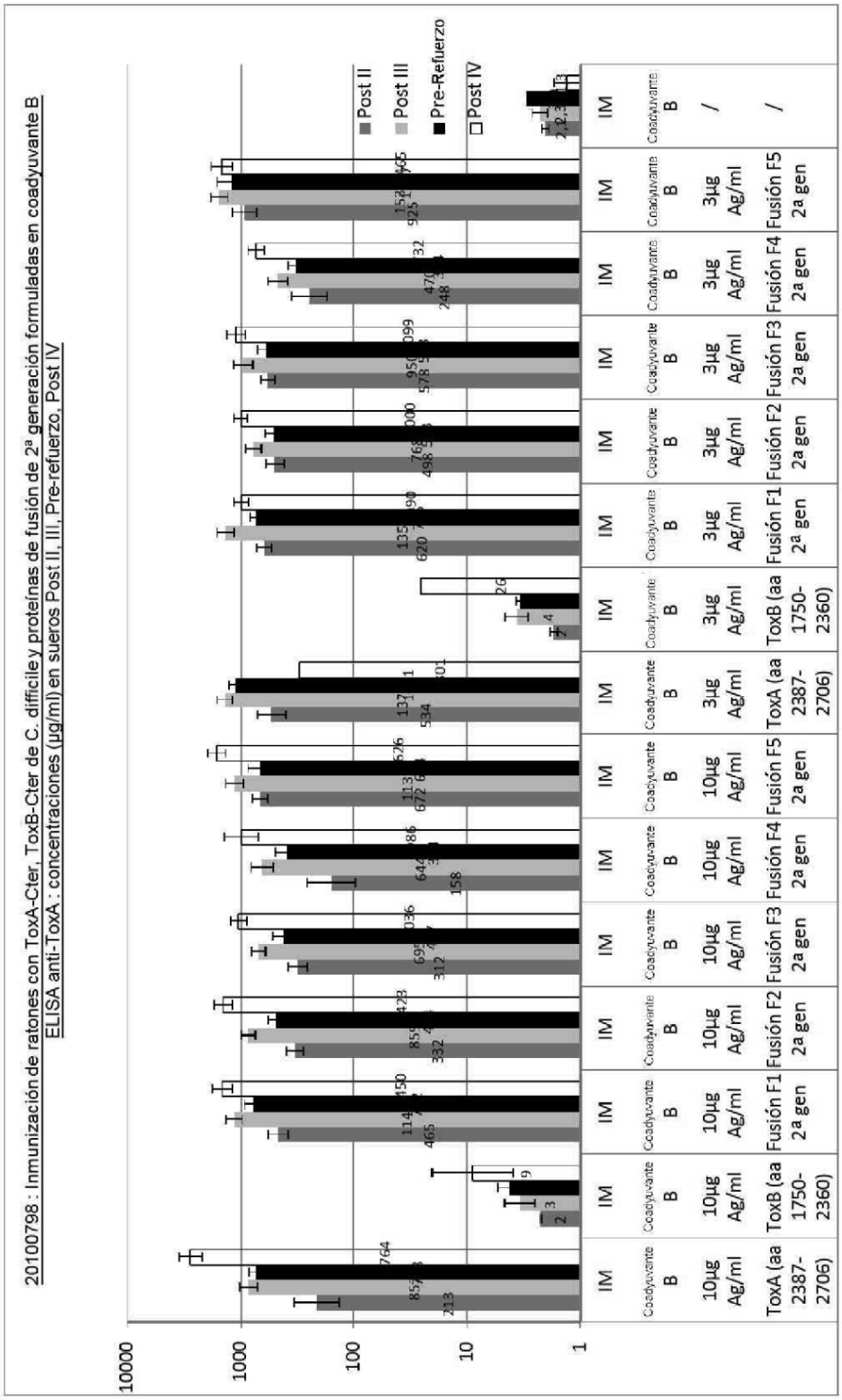

20100798 : Inmunización de ratones con ToxA-Cter, ToxB-Cter de C. difficile y proteínas de fusión de 2ª generación formuladas en coadyuvante B
ELISA anti-ToxA : concentraciones (µg/ml) en sueros Post II, III, Pre-refuerzo, Post IV
Post II
Post III
Pre-Refuerzo
Post IV
10000
1000
100
10
1
IM
Coadyuvante B
10µg Ag/ml
ToxA (aa 2387-2706)
ToxB (aa 1750-2360)
Fusión F1 2a gen
Fusión F2 2a gen
Fusión F3 2a gen
Fusión F4 2a gen
Fusión F5 2a gen
3µg Ag/ml
/

Figura 21

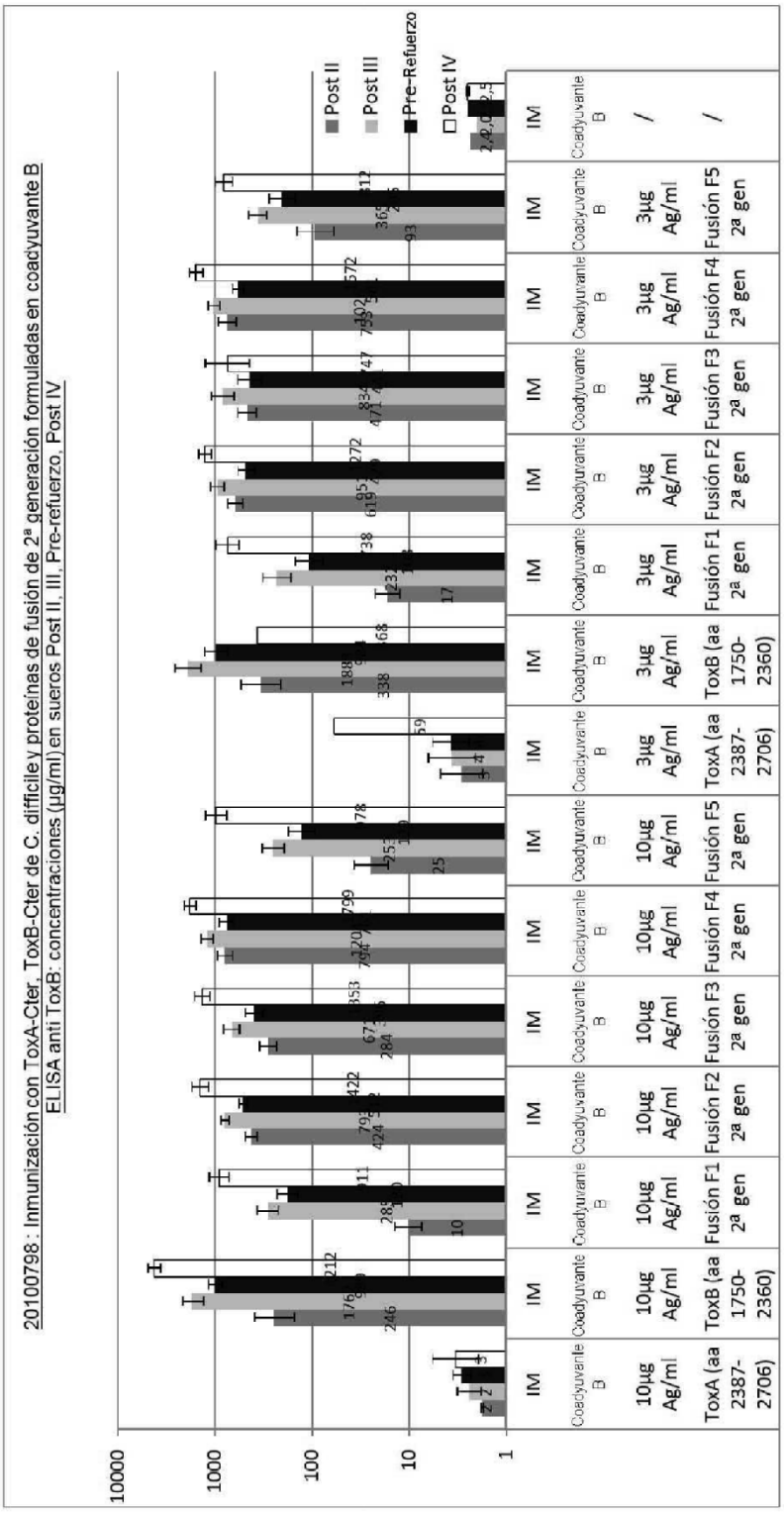

20100798 : Inmunización con ToxA-Cter, ToxB-Cter de C. difficile y proteínas de fusión de 2ª generación formuladas en coadyuvante B
ELISA anti ToxB: concentraciones (µg/ml) en sueros Post II, III, Pre-refuerzo, Post IV
Post II
Post III
Pre-Refuerzo
Post IV
10000
1000
100
10
1
IM
Coadyuvante B
10µg Ag/ml
ToxA (aa 2387-2706)
ToxB (aa 1750-2360)
Fusión F1 2ª gen
Fusión F2 2ª gen
Fusión F3 2ª gen
Fusión F4 2ª gen
Fusión F5 2ª gen
3µg Ag/ml
/

Figura 22

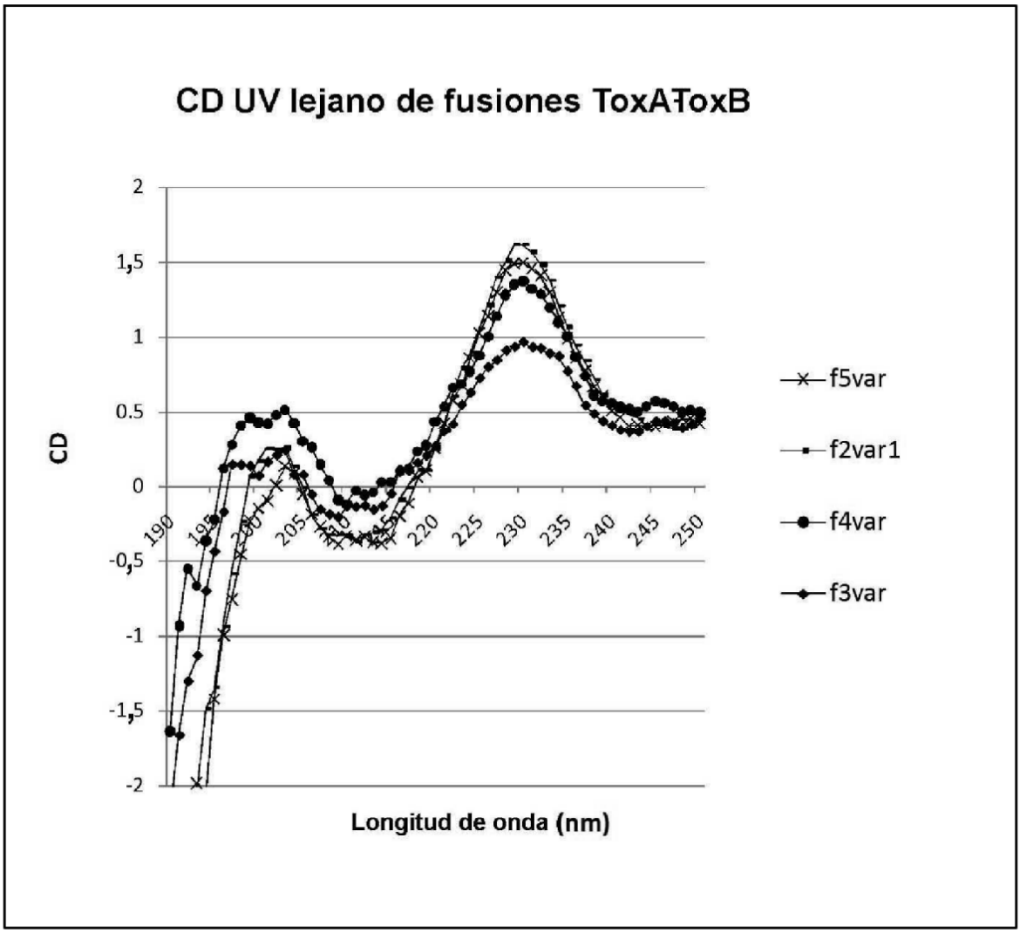

CD UV lejano de fusiones ToxATOxB
CD
2
1,5
1
0.5
0
-0,5
-1
-1,5
-2
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
Longitud de onda (nm)
f5var
f2var1
f4var
f3var

Figura 23

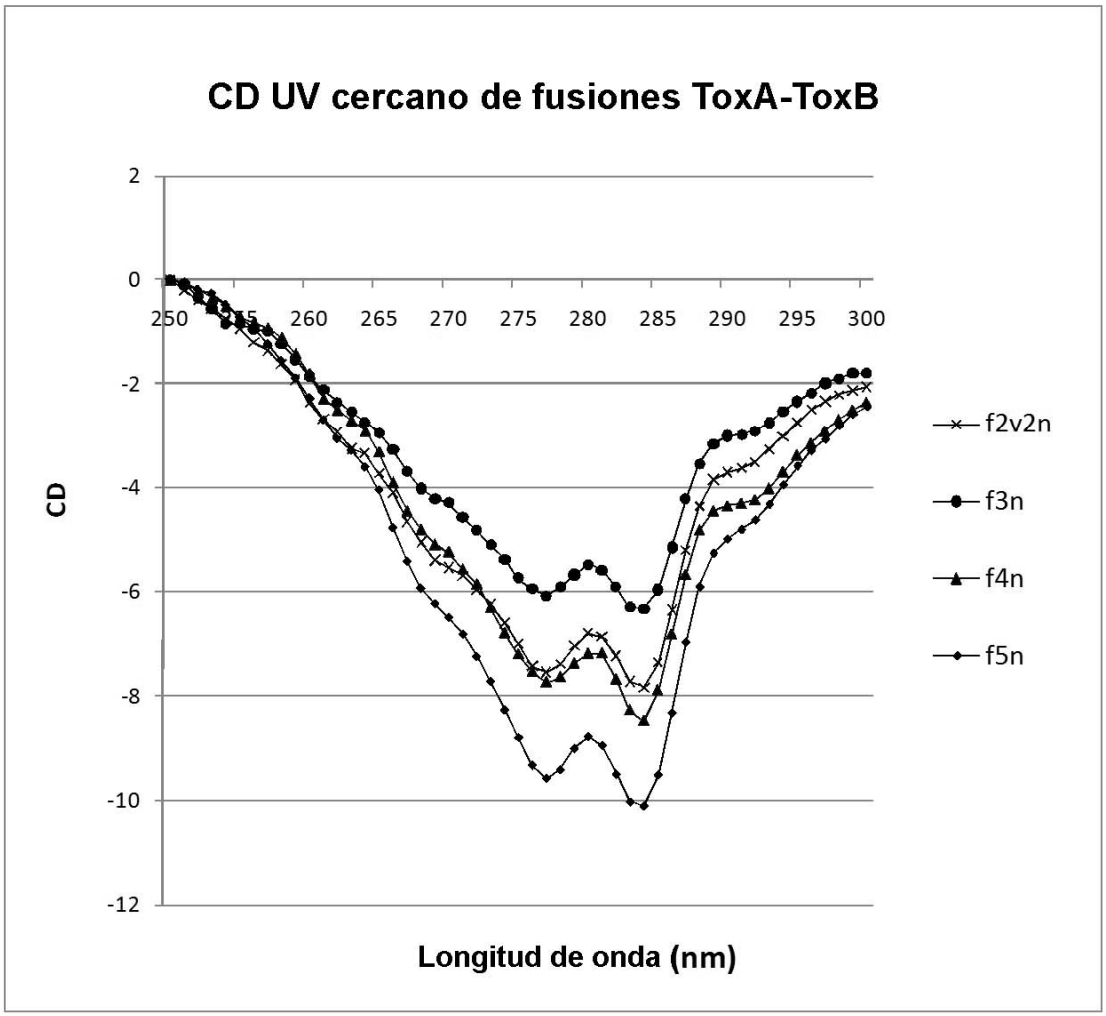

CD UV cercano de fusiones ToxA-ToxB
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
250
260
265
270
275
280
285
290
295
300
CD
Longitud de onda (nm)
f2v2n
f3n
f4n
f5n

Figura 24

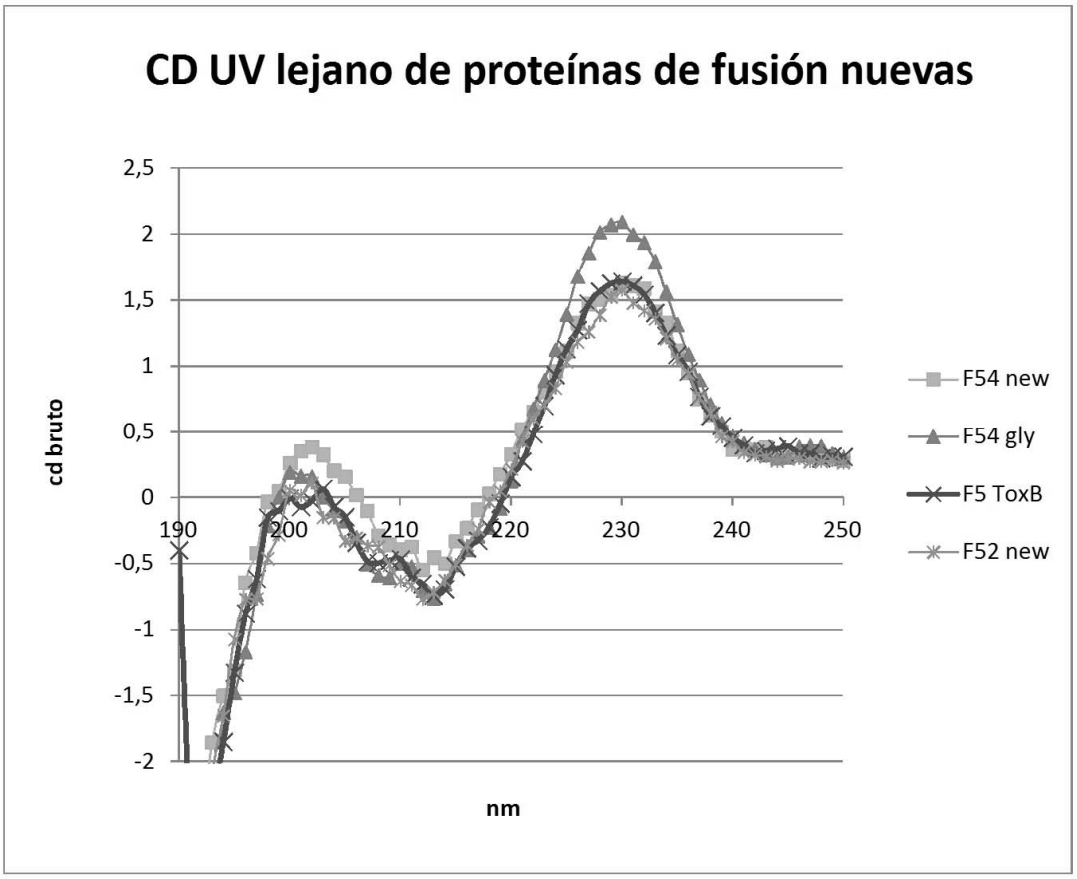
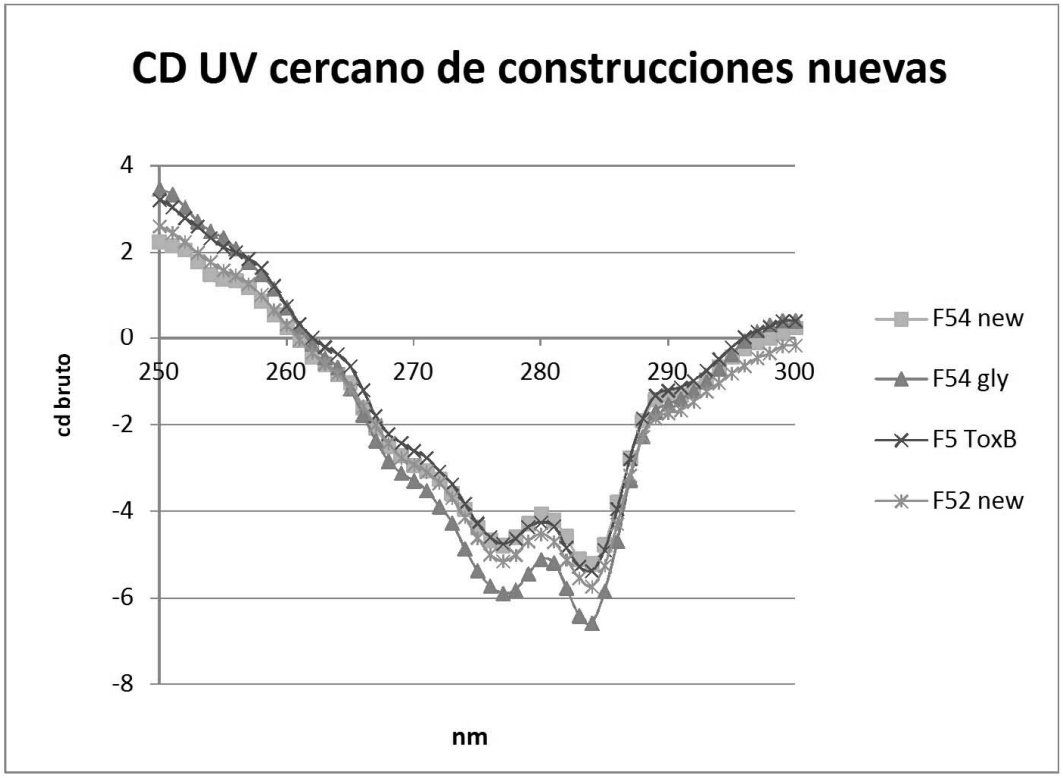

CD UV lejano de proteínas de fusión nuevas
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
-1
-1,5
-2
cd bruto
190
200
210
220
230
240
250
nm
F54 new
F54 gly
F5 ToxB
F52 new

Figura 25


CD UV cercano de construcciones nuevas
4
2
0
-2
-4
-6
-8
250
260
270
280
290
300
cd bruto
nm
F54 new
F54 gly
F5 ToxB
F52 new