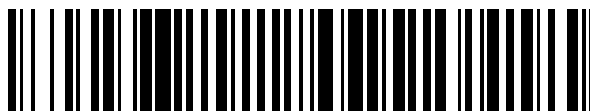


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 810**

51 Int. Cl.:

C07K 14/33 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2007** **E 07755417 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013** **EP 2007420**

54 Título: **Organismos clostridium atenuados y vacuna recombinante**

30 Prioridad:

17.04.2006 US 792553 P

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

24.04.2013

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer , NL

72 Inventor/es:

COCHRAN, MARK D.;
PETERSEN, GARY;
LAIR, STEVEN V. y
SYNENKI, RICHARD

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 401 810 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

Organismos *Clostridium* atenuados y vacuna recombinante

5 Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud es una solicitud no provisional que reivindica la prioridad según el Punto 119(e) del Título 35 del Código de los Estados Unidos de la solicitud provisional de los Estados Unidos con N° de Serie 60/792.553, presentada el 7 de abril de 2006.

10 Campo de la invención

Esta invención está relacionada con organismos *Clostridium* atenuados, a los procedimientos para prepararlos y utilizarlos y a las muteínas de las toxinas *alfa* y los ácidos nucleicos que la codifican.

15 Antecedente de la invención

Los patógenos bacterianos anaerobios constituyen una grave carga económica en la industria agrícola. Las bacterias de la familia *Clostridium* representan una carga concreta, debido a que estas bacterias producen graves enfermedades en las aves y otros animales domésticos económicamente valiosos. Los diversos esfuerzos para controlar estos organismos se han basado en las medidas sanitarias y en la administración de antibióticos en la alimentación de los animales.

En particular, *Clostridium perfringens* ("*C. perfringens*") es una bacteria anaerobia que se encuentra en el suelo, en materia orgánica podrida, y como parte de la flora del intestino de seres humanos y animales. Las diferentes cepas de *C. perfringens* se designan como los biotipos A a E, dependiendo del espectro de toxinas producidas [Justin y col., *Biochemistry* 41, 6253-6262 (2002); McDonel (1986) PHARMACOLOGY OF BACTERIAL TOXINS; F Damer y J Drews (Eds.) Pergamon Press, Oxford]. Las cepas del biotipo A son de particular importancia como los agentes etiológicos de diversos tipos de gangrena y enfermedades entéricas. Una enfermedad entérica particularmente grave producida por *C. perfringens* es la enteritis necrosante (conocida también en la técnica como "enteritis necrótica", una gangrena de los intestinos que da como resultado necrosis, sepsia, y hemólisis, en seres humanos y animales domesticados [véanse, Pearson y col., *J. Am. Vet. Med.* 188(11):1309-10 (1986); Al-Sheikhy y Truscott, *Avian Dis.* 21(2): 256-63 (1977)]. En aves, *por ejemplo*, pollos (*Gallus gallus*), la enteritis necrosante es un problema significativo. *C. perfringens* tanto de tipo A como de tipo C puede producir pérdidas importantes, especialmente en la producción de pollos de la variedad *Broiler* [Ficken y Wages, *Necrotic Enteritis*, en *Diseases of Poultry*, 10ª Ed. pps 261-264 (1997)]. Además de las pérdidas asociadas con los brotes producidos por enteritis necrosante, se ha notificado que la productividad se ve afectada en bandadas con enfermedades asociadas a *C. perfringens* [Lovl y Kaldhusdal, *Avian Pathology* 30:73-81 (2001)]. Tal como se ha señalado anteriormente, los agentes antibacterianos administrados en la alimentación del animal constituyen el procedimiento de control más común. Sin embargo, los agentes antibacterianos, *por ejemplo*, los antibióticos, son costosos y están sujetos a riesgos crecientes relacionados con la promoción de la resistencia bacteriana.

De forma más reciente, se han llevado a cabo intentos para proporcionar vacunas contra las especies de *Clostridium* perjudiciales. *Por ejemplo* Lovland, y col. [*Avian Pathology* 33(1): 83-92 (2004)] han ejemplificado vacunas candidatas basadas en los toxoides de tipo A y tipo C de *C. perfringens* con un adyuvante de hidróxido de aluminio. Se ha notificado la vacunación de gallinas reproductoras para proporcionar anticuerpos específicos para proteger a la progenie frente a las lesiones entéricas inducidas por un estímulo subclínico de *C. perfringens*. Se conocen otras vacunas basadas en toxoides preparadas a partir de toxinas de *C. perfringens* detoxificado [véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos N° 4.292.307, que describe toxoides de los tipos A, B y D de *C. perfringens*, *C. oedematiens*, y *C. septicum*].

Se han propuesto también preparaciones de toxoides recombinantes. *Por ejemplo*, Titball y col., [Patentes de los Estados Unidos N°s 5.851.827, 6.403.094, y 5.817.317] han notificado ácidos nucleicos que codifican péptidos antigénicos de *C. perfringens*, así como los propios péptidos, y las vacunas preparadas a partir de los péptidos. Se describe que los péptidos tienen, *por ejemplo*, de 261 a 300 restos de aminoácidos de la toxina *alfa* de *C. perfringens* natural, pero carecen de los dominios hidrolizantes de la fosfolipasa C y la esfingomielina de la toxina natural. Se ha notificado además que estos péptidos inducen la inmunoprotección frente a la toxina natural. Además, la Patente de los Estados Unidos N° 6.610.300 describe una vacuna basada en un fragmento antigénico de una muteína de la toxina beta de *C. perfringens*.

Sin embargo, no importa si una vacuna de toxoide se deriva del organismo nativo o se obtiene de forma recombinante, se considera que es económicamente laborioso producir y administrar proteínas de toxoides a los animales que necesitan la inmunización, excepto en circunstancias especiales (*por ejemplo*, para tratar seres humanos que pueden ser alérgicos o sensibles a otros componentes de una vacuna de un organismo completo). Además, las vacunas basadas en proteína/toxoide requieren normalmente repetidas vacunaciones de refuerzo con el fin de mantener una completa efectividad.

Otra solución propuesta ha sido construir mediante ingeniería genética un virus antigénicamente activo que produzca una muteína de la toxina *alfa*, en lugar de la toxina natural. Por ejemplo, Bennett y col. [Viral Immunol. 12(2): 97-105 (1999)] han ejemplarizado un vector de virus vaccinia recombinante que expresa un codominio no tóxico de la toxina *alfa* de *C. perfringens*. Desafortunadamente, aunque se han propuesto algunas vacunas de vaccinia recombinantes durante los últimos 20 años, sigue existiendo desde hace muchos años una preocupación acerca de la seguridad de la administración de virus de vaccinia vivos e infecciosos en un entorno en el que pueden transmitirse a las personas no son resistentes a este virus.

Se sabe que la toxina *alfa* (gen *plc*) de *C. perfringens* posee algunas actividades biológicas que incluyen la actividad hemolítica, de fosfolipasa C, de esfingomielasa, de fosfodiesterasa, y actividades letales. Existen numerosos informes en la técnica que hacen referencia a mutaciones de esta toxina *alfa* que reducen la toxicidad. Schoepe, y col. [Infect. and Immun. 69(11): 7194-7196 (2001)] describen una cepa de *C. perfringens* natural que produce una toxina *alfa* no tóxica. Sin embargo, sería difícil modificar esta cepa para estimular la inmunoprotección frente a otra variante de la especie *C. perfringens* natural, pero tóxica.

Williamson y Titball [Vaccine 11(12): 1253-1258 (1993)] mostraron que la región de la toxina procedente de los restos de aminoácidos 247 a 370 en solitario fue suficiente para inmunizar ratones contra la gangrena gaseosa inducida experimentalmente por *C. perfringens*. Alape-Giron y col. [Eur. J. Biochem. 267: 5191-5197 (2000)] han notificado que las sustituciones en Asp269, Asp336, Tyr275, Tyr307, y Tyr331 redujeron la toxicidad de la toxina *alfa*. Nagahama, y col. [Infect. and Immun. 65: 3489-3492 (1997)] notificaron que la sustitución de Asp-56, Asp-130, o Glu-152 dio como resultado una reducción en la toxicidad de la toxina *alfa*. Nagahama y col. [J. Bacteriology 177:1179-1185 (1995)] notificaron que la sustitución de la histidina en la posición 68 por un aminoácido neutro, tal como glicina, en la toxina *alfa* de *C. perfringens*, dio como resultado una pérdida completa de la actividad hemolítica, de fosfolipasa C, de esfingomielinasa, y la actividad letal de la muteína de la toxina *alfa*. Se cree que este único cambio de aminoácidos inactiva uno de los tres dominios de unión al cinc de la proteína. El dominio de unión al cinc inactivado mediante la sustitución de His68 fue posteriormente denotado como Zn2 [Justin y col., Biochemistry 41: 6253-6262 (2002)].

Schoepe y col, Anaerobe, Londres, GB, vol. 12, n° 1, febrero de 2006, páginas 44-48 se refieren a la protección de ratones contra la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* mediante la inmunización con la variante 121A191-R212H de una toxina *alfa*.

A pesar de lo anterior, sigue existiendo una necesidad en la técnica de un procedimiento seguro, económico y eficaz para proteger animales domésticos criados de forma intensiva, que incluyen aves, tales como pollos, de la infección por especies de *Clostridium*, incluyendo *C. perfringens*.

La cita de cualquier referencia en el presente documento no debe considerarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "técnica anterior" con respecto a la presente solicitud.

Resumen

Con el fin de abordar las carencias anteriormente descritas en la técnica, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens*.

En particular, la presente invención proporciona lo siguiente:

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* en la que la muteína de la toxina *alfa* comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos 9 restos de aminoácidos consecutivos que van desde Tyr62 a Trp70.

2. La molécula de ácido nucleico del apartado 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica una muteína en la que dichos nueve aminoácidos consecutivos que se han eliminado están sustituidos por un único resto de leucina.

3. La molécula de ácido nucleico del apartado 1 que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 2 en la que se han eliminado los nucleótidos 268-294 de la molécula de ácido nucleico.

4. La molécula de ácido nucleico del apartado 3, en la que los nucleótidos detectados están sustituidos por una secuencia de nucleótidos que codifica un único resto de Leu.

5. Una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens*, en la que la muteína de la toxina *alfa* comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos nueve restos de aminoácidos consecutivos que van desde Tyr62 a Trp70 que están eliminados.

6. la muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* del apartado 5; en la que los

nueve restos de aminoácidos consecutivos están eliminados y sustituidos por un único resto de Leu.

7. Un organismo *Clostridium perfringens* atenuado sustancialmente no tóxico desarrollado integrando la molécula de ácido nucleico de uno cualquiera de los apartados 1-4 en un cromosoma de un organismo *Clostridium perfringens* no atenuado.

8. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 7, en el que la molécula de ácido nucleico está localizada en una posición en el cromosoma que es homóloga a la localización de la molécula de ácido nucleico que codifica una toxina alfa natural presente en el *Clostridium perfringens* no atenuado.

9. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 7 o del apartado 8 que es un *Clostridium perfringens* de tipo A.

10. El organismo *Clostridium perfringens* de uno cualquiera de los apartados 7-9 en el que el *Clostridium perfringens* no atenuado a partir del cual se ha desarrollado el anterior ha sido aislado de un animal hospedador que es bien un mamífero o un ave.

11. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 10, en el que dicho mamífero se ha seleccionado entre el grupo que consiste de, bovino, ovino, y porcino.

12. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 10 en el que dicha ave es un pollo, un pavo, un ganso, un pato, un cisne, una paloma, un pichón, un urogallo, o una perdiz.

13. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de uno cualquiera de los apartados 7-12 que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido no de *Clostridium perfringens*.

14. El organismo *Clostridium perfringens* del apartado 13 en el que dicho polipéptido no de *Clostridium perfringens* es un polipéptido no bacteriano.

15. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 14 en el que el polipéptido no bacteriano es un polipéptido de ave o mamífero.

16. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 15 en el que el polipéptido no bacteriano es un polipéptido de ave.

17. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 15 en el que el polipéptido no bacteriano es una citoquina.

18. el organismo *Clostridium perfringens* atenuado del apartado 17 en el que la citoquina es IL-18 de pollo.

19. Un *Clostridium perfringens* atenuado tal como se ha definido en los apartados 7-18 anteriores para uso como una vacuna en un procedimiento para inducir inmunidad frente a las enfermedades producidas por infecciones con *Clostridium perfringens* en un animal, en el que dicho *Clostridium perfringens* atenuado se administra en una dosis inmunológicamente eficaz.

20. El *Clostridium perfringens* atenuado para uso de acuerdo con el apartado 19, en el que la vacuna es para la administración mediante las rutas oral, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, o intranasal.

21. El *Clostridium perfringens* atenuado para uso de acuerdo con el apartado 19, en el que la vacuna se reparte en el alimento del animal.

22. El *Clostridium perfringens* atenuado para uso de acuerdo con el apartado 19, en el que la vacuna es para la administración como una pulverización sobre los animales para proporcionar la administración oral.

23. Un organismo *Clostridium perfringens* que es CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-054 que tiene el N° de Depósito PTA7364 de la ATCC.

24. Un organismo *Clostridium perfringens* que es CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-053 que tiene el N° de Depósito PTA7365 de la ATCC.

25. Una vacuna que comprende el organismo *Clostridium perfringens* atenuado de uno cualquiera de los apartados 7-18, 23, o 24.

26. La vacuna del apartado 25 que comprende además uno o más de los siguientes: un tampón farmacológicamente aceptable, un excipiente, o un adyuvante.

27. Un pienso animal que comprende del apartado 25 o 26.

- Se da a conocer además la molécula de ácido nucleico que codifica una muteína de la toxina *alfa* que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3, menos al menos 18 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la molécula de ácido nucleico que codifica una muteína de la toxina *alfa* que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3, menos al menos 12 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la molécula de ácido nucleico que codifica una muteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 9 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la molécula de ácido nucleico que codifica una muteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 6 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la molécula de ácido nucleico que codifica una muteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 3 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈.
- Se da a conocer además una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica una muteína en la que no se han eliminado más de 48 restos de aminoácidos consecutivos procedentes de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. Se da a conocer además una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína en la que no se han eliminado más de 36 restos de aminoácidos consecutivos procedentes de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. Se da a conocer además una molécula de ácidos nucleicos que codifica una muteína en la que no se han eliminado más de 24 restos de aminoácidos consecutivos procedentes de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. Se da a conocer además una moléculas de ácidos nucleicos que codifica una muteína en la que no se han eliminado más de 18 restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3.
- Se da a conocer además una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína en la que se han eliminado nueve restos de aminoácidos consecutivos procedentes de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3, uno de los cuales es His₆₈. En una realización concreta de este tipo, la molécula de ácido nucleico codifica una muteína en la que nueve restos de aminoácidos consecutivos van de Tyr₆₂ a Trp₇₀ de la SEC ID N°: 3. En una realización más concreta, la molécula de ácido nucleico codifica una muteína en la que estos nueve restos de aminoácidos que se han eliminado están sustituidos por un único resto de leucina.
- En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 2, en la que se han eliminado los nucleótidos 268-294. En una realización específica de este tipo, los nucleótidos 268-294 de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 2 están sustituidos por tres nucleótidos que codifican un único resto de leucina.
- Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona también muteínas sustancialmente no tóxicas de la toxina alfa de *Clostridium perfringens*. Se da a conocer además la muteína de la toxina alfa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 18 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la muteínas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 12 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la muteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 9 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la muteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 6 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈. Se da a conocer además la muteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos al menos 3 restos de aminoácidos consecutivos, en la que uno de los restos de aminoácidos que se han eliminado es His₆₈.
- Se da a conocer además una muteína que comprende no más de 48 restos de aminoácidos consecutivos que se han eliminado de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. Se da a conocer además la muteína que comprende no más de 36 restos de aminoácidos consecutivos que se han eliminado de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. Se da a conocer además la muteína que comprende no más de 24 restos de aminoácidos consecutivos que se han eliminado de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. Se da a conocer además la muteína que comprende no más de 18 restos de aminoácidos consecutivos que se han eliminado de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3.
- Se da a conocer además una muteína sustancialmente no tóxica en la que se han eliminado nueve restos de aminoácidos consecutivos procedentes de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3, uno de los cuales es His₆₈. En una realización más concreta de este tipo, los nueve restos de aminoácidos consecutivos que se han eliminado van de Tyr₆₂ a Trp₇₀ de la SEC ID N°: 3. En una realización aún más concreta, estos nueve aminoácidos consecutivos que se han eliminado están sustituidos por un único resto de leucina en la secuencia de aminoácidos de la muteína.
- La presente invención proporciona además organismos *Clostridium perfringens* atenuados que tienen una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens*

integrada en sus cromosomas. Esta molécula de ácido nucleico integrada está preferiblemente localizada en una posición en el cromosoma que es homóloga a la localización de la molécula de ácido nucleico que codifica la toxina *alfa* natural en el organismo *Clostridium perfringens* natural. De esta manera, un organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la presente invención puede ser sustancialmente no tóxico debido a la ausencia del gen *plc* natural funcional. Tal como se ha ejemplificado en el presente documento, el organismo *Clostridium perfringens* atenuado puede ser un *Clostridium perfringens* de tipo A.

En una realización particular de la presente invención, el organismo *Clostridium perfringens* atenuado es *Clostridium perfringens* CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-054 (N° de Depósito PTA7364 de la ATCC). En otra realización particular de la presente invención, el organismo *Clostridium perfringens* atenuado es *Clostridium perfringens* CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-053 N° de Depósito PTA7365 de la ATCC).

Un organismo *Clostridium perfringens* que se ha atenuado mediante los procedimientos de la presente invención se puede aislar de un animal hospedador que es bien un mamífero o un ave. Dichos mamíferos pueden incluir: bovinos, ovinos, y porcinos. Los ejemplos de aves adecuadas incluyen pollos, pavos, patos, pichones, gansos, palomas, cisnes, perdices, y urogallos.

La presente invención proporciona también vacunas. Dichas vacunas pueden comprender los organismos *Clostridium perfringens* atenuados de la presente invención. Las vacunas de la presente invención pueden incluir también tampones, excipientes, y/o adyuvantes farmacológicamente aceptables.

Además, la presente invención proporciona procedimientos para inducir la inmunidad frente a *Clostridium perfringens* en un animal. Una de dichas realizaciones comprende administrar una dosis inmunológicamente eficaz de una vacuna de la presente invención al animal. Las vacunas de la presente invención se pueden administrar mediante numerosas rutas que incluyen: por vía oral, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea e intranasal. Una vacuna de la presente invención se puede repartir en el alimento del animal y/o pulverizarse sobre los animales para proporcionar la administración oral. La presente invención además proporciona un pienso animal que incluye una vacuna de la presente invención.

La presente invención proporciona también un organismo de *Clostridium perfringens* atenuado de la presente invención que, además, expresa al menos un gen que codifica un polipéptido no de *Clostridium perfringens*. En una de dichas realizaciones, uno o más de los polipéptidos no de *Clostridium perfringens* son polipéptidos bacterianos, tales como proteínas antigénicas procedentes de *E. coli*, salmonella, lawsonia, o campylobacter, etc., y/o sus combinaciones. De forma alternativa, o en combinación con las anteriores, un polipéptido no de *Clostridium perfringens* puede ser un polipéptido no bacteriano. Los ejemplos de dichos polipéptidos no bacterianos incluyen proteínas de mamíferos o aves, por ejemplo, citoquinas, tales como IL-18 de pollo; virus tales como rotavirus o coronavirus, y parásitos tales como eimeria, isospora, y cryptosporidium.

Se da a conocer además un anticuerpo que se une selectivamente a un epítipo que falta en la muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens*. Dichos anticuerpos pueden distinguirse de la muteína sustancialmente no tóxica de una toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* natural.

Se dan a conocer también kits de ensayo que incluyen los anticuerpos dados a conocer para uso en la identificación bien sea de un sujeto animal que se ha vacunado, o alternativamente, que ha resultado infectado naturalmente por un organismo *Clostridium perfringens*.

De acuerdo con esto, se proporcionan también procedimientos para identificar y/o distinguir un animal que ha sido infectado naturalmente por un organismo *Clostridium perfringens* de uno vacunado con un organismo *Clostridium perfringens* atenuado. En una de dichas realizaciones el procedimiento conlleva poner en contacto una muestra de fluido procedente del animal con un anticuerpo que se une selectivamente a un epítipo que se encuentra en una toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* natural que se ha eliminado de la muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* de la presente invención. De este modo, el anticuerpo puede distinguir entre los animales que se han vacunado con una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* de la presente invención (y/o un organismo *Clostridium perfringens* atenuado que expresa la muteína) de aquellos que están infectados o que se han infectado con una toxina *alfa* de *Clostridium perfringens* de tipo natural. La siguiente etapa es determinar si el anticuerpo reacciona con la muestra de fluido, por ejemplo, se une a un antígeno contenido por la muestra de fluido. El animal se identifica como uno que se ha/ha sido infectado naturalmente por un organismo *Clostridium perfringens* cuando el anticuerpo reacciona con la muestra de fluido.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 ilustra una cartografía genómica de la región que codifica la toxina *alfa* de *C. perfringens*. Se muestran las localizaciones de los dos fragmentos grandes (de 1182 pares de bases y 1746 pares de bases), respectivamente, que se usaron para construir CPERF001. Se indica también la localización que resulta de la eliminación de 27 pares de bases. "Ypic" indica el gen *ypic* (CPE0035), "plc" indica el gen que codifica la toxina *alfa* (una fosfolipasa C), y "CobW" indica un gen en la dirección 3'.

La FIG. 2A ilustra la secuencia de una porción del gen *plc* de la cepa CP6 de *Clostridium perfringens* [SEC ID N°: 4, esta es una porción de la SEC ID N°: 22, (es decir, los nucleótidos 262-300) de un fragmento del gen *plc* de CP6] y la correspondiente secuencia peptídica (SEC ID N°: 5), en la que el subrayado indica el sitio de restricción de la endonucleasa BamH1 utilizado para crear la eliminación.

La FIG. 2B ilustra la secuencia del cebador (SEC ID N°: 6) utilizado para crear la eliminación en la cepa 1240 de *C. perfringens* progenitora, que da lugar al CPERF001 eliminador. El subrayado indica el sitio de restricción BamH1 incluido en el cebador para facilitar la construcción de la eliminación. Se ilustra también el correspondiente péptido (SEC ID N°: 7).

La FIG. 2C ilustra la secuencia de la eliminación resultante en CPERF001 (SEC ID N°: 8; nucleótidos 103-117) y en el péptido correspondiente (SEC ID N°: 9). El subrayado indica el sitio de restricción de la endonucleasa BamH1 restaurado.

La FIG. 3A ilustra una vez más la secuencia de una porción del gen *plc* procedente de la cepa CP6 de *C. perfringens* [SEC ID N°: 4, nucleótidos 262-300] y la secuencia peptídica correspondiente (SEC ID N°: 5), en la que el subrayado indica el sitio de la endonucleasa de restricción BamH1 utilizado en la creación de la eliminación.

La FIG. 3B ilustra la secuencia del cebador (SEC ID N°: 10) utilizado para crear la eliminación en la cepa 29 del *C. perfringens*, que da lugar al CPER002 eliminador. Se ilustra también el péptido correspondiente (SEC ID N°: 11).

La FIG. 3C ilustra la secuencia de la eliminación resultante en CPERF002 (SEC ID N°: 12) y el péptido correspondiente (SEC ID N°: 13).

Descripción detallada

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona organismos *Clostridia* modificados y cultivos que expresan una o más de las toxinas de *Clostridia*, por ejemplo, las toxinas *alfa*, como muteínas que no tienen toxicidad detectable, y/o sustancialmente baja toxicidad, con respecto a las toxinas de *Clostridia* nativas o naturales. De forma ventajosa, los organismos *C. perfringens* mutantes inventivos se administran fácilmente como vacunas vivas a animales. Se proporcionan también las muteínas de las toxinas *alfa* de *Clostridium perfringens* inventivas, junto con las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las muteínas, los vectores para expresar las toxinas *alfa*, y los procedimientos de utilización de las mismas.

Con el fin de proporcionar una descripción clara de la presente invención, algunos términos se definen como sigue. Una vacuna es una composición que incluye un inmunógeno y otros ingredientes farmacéuticamente aceptables opcionales, que incluyen, en algunas realizaciones, adyuvantes adecuados. Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunógeno” describe una composición, sustancia o vector que, cuando se introduce en un animal, estimula una respuesta inmune. Para los fines de la presente invención, se contempla que un inmunógeno incluya cualquier vector capaz de expresar o introducir la muteína de la toxina *alfa* inventiva en un animal que se va a inmunizar. Un vector incluye, *por ejemplo*, el *C. perfringens* inventivo u otro microorganismo adecuado, que expresa la muteína de la toxina *alfa* inventiva cuando el vector se introduce en un animal. Un vector incluye también moléculas de ácido nucleico conocidas en la técnica, *por ejemplo*, plásmidos y similares, que expresan la muteína de la toxina *alfa* inventiva cuando se introduce directamente en un animal; *por ejemplo*, introduciendo una célula del animal y expresando la muteína de la toxina *alfa* en el animal. Un inmunógeno es también una proteína, tal como la toxina *alfa* inventiva, empleada por sí misma o como parte de una composición de vacuna adecuada.

Tal como se usa en el presente documento, y a no ser que se especifique de otra manera, los términos “inmunizar” y “vacunar” son sinónimos y se usan de forma indistinta para describir la introducción de un inmunógeno en un animal para estimular una respuesta inmune en el animal. La respuesta inmune estimulada proporciona inmunidad protectora al animal tratado que limita o reduce los signos clínicos de la enfermedad, *por ejemplo*, gangrena gaseosa, y/o la mortalidad, en animales vacunado que se estimulan posteriormente con una dosis virulenta de una especie de *Clostridium perfringens* para la cual la vacuna inventiva es protectora.

El término “adyuvante” se define como una o más sustancias que dan lugar a la estimulación del sistema inmune. En este contexto, se utiliza un adyuvante para potenciar una respuesta inmune para uno o más antígenos/aislados de vacuna. Se puede administrar un adyuvante al animal diana antes, en combinación con, o después de la administración de la vacuna. Se pueden obtener adyuvantes de la presente invención a partir de cualquiera de numerosas fuentes, incluyendo fuentes naturales, fuentes recombinantes, y/o químicamente sintetizadas, etc. Los ejemplos de compuestos químicos utilizados como adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, compuestos de aluminio; aceites metabolizables y no metabolizables; polímeros en bloque; ISCOM (complejos inmunoestimuladores); vitaminas y minerales (incluyendo, pero sin limitarse a: vitamina E, vitamina A, selenio, y vitamina B12); Quil A (saponinas); polímeros reticulados basados en ácido acrílico (*por ejemplo*, polímeros de ácido prop-2-anoico), reticulados a diferentes niveles con un polialquienil poliéter, comercializados con la marca comercial CARBOPOL®, y/o gotículas de aceite de tamaño micrométrico uniformemente dispersas en emulsión en agua, *por ejemplo*, comercializadas con la marca comercial Emulsigen®.

Los ejemplos adicionales de adyuvantes, que algunas veces se han denominado específicamente como inmunoestimulantes, incluyen, componentes de la pared celular bacterianos y fúngicos (*por ejemplo*,

lipopolisacáridos; lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos de muramilo, beta-1,3/1,6-glucanos, diversos carbohidratos complejos derivados de plantas (*por ejemplo*, glicanos; acemanano), diversas proteínas y péptidos derivados de animales (*por ejemplo*, hormonas, citoquinas, factores coestimuladores), y novedosos ácidos nucleicos derivados de virus y otras fuentes (*por ejemplo*, ARN bicatenario, CpG). Además, cualquier número de combinaciones de las sustancias anteriormente mencionadas puede proporcionar un efecto adyuvante, y por tanto, puede formar un adyuvante de la presente invención.

Se pretende que el término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, se abarque anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y/o sus fragmentos o derivados recombinantes, que incluyen las proteínas de unión diseñadas mediante ingeniería genética que incorporan dominios variables de anticuerpos.

Tal como se usa en el presente documento, la numeración y la posición de los restos de las proteínas de la toxina alfa inventiva se basan en el sistema numérico descrito para la cepa 13 de *Clostridium perfringens*. La toxina alfa de cepa 13 de *Clostridium perfringens* está notificada con el N° de Acceso NC 003366 del GenBank tal como se ilustra mediante las SEC ID N°: 1. La proteína completa tiene 398 aminoácidos de longitud. La toxina alfa codificada por los vectores de la muteína ejemplificados a continuación en el presente documento corresponde a la proteína de la SEC ID N°: 1 que tiene una eliminación de los restos de aminoácidos 90-98. Existe una secuencia señal de 28 aminoácidos que se escinde durante la maduración de la proteína. Por tanto, la eliminación ejemplificada corresponde a los restos de aminoácidos 62-70 de la proteína madura, que tiene 370 aminoácidos de longitud (SEC ID N°: 3).

La numeración del codón del ADN que codifica las proteínas de la toxina alfa inventiva se basa en el gen plc de la cepa 13 de *Clostridium perfringens*, tal como se ha notificado en el N° de Acceso NP 560952 del GenBank, y tal como se ilustra mediante la SEC ID N°: 2. La secuencia de codificación de la toxina alfa se desarrolla desde el nucleótido 48590 al 49786 en la cepa 13 de *C. perfringens*. La eliminación del codón en las dos construcciones ejemplificadas en el presente documento corresponde a los nucleótidos de 48857 a (e incluyendo) 48883 del gen NP 560952. Esta eliminación se encuentra en el gen de la toxina alfa y corresponde a los nucleótidos 268-294 en la secuencia de codificación de la SEC ID N°: 2.

Además, el uso de términos en singular por comodidad de la descripción no se pretende que sea en forma alguna limitante. De esta manera, por ejemplo, las referencias a una composición que comprende una célula de *Clostridium perfringens* incluye referencias a una o más de dichas células.

En un aspecto particular de la presente invención, se proporcionan mutantes sin reversión de *C. perfringens* que son “sustancialmente no tóxicos”, es decir, organismos que expresan una toxina alfa inmunógena de poca o ninguna toxicidad volviéndolos por tanto adecuados para el uso como vacunas protectoras. Los organismos *C. perfringens* inventivos conllevan por tanto una toxicidad suficientemente reducida, con respecto a los organismos *C. perfringens* naturales, para volverlos tolerables como una vacuna o antígeno, cuando se emplean en condiciones eficaces para estimular una respuesta inmune contra la toxina alfa o contra *C. perfringens*, en un animal que se ha vacunado de esta manera. De esta manera, el *C. perfringens* inventivo, se ha “atenuado” con respecto al *C. perfringens* natural.

Se pretende también que la frase, “sustancialmente no tóxica” se aplique a las muteínas de la toxina alfa inmunógenas anteriormente señaladas que tienen una toxicidad suficientemente baja o no tienen toxicidad, haciéndolas también por tanto adecuadas para el uso en una vacuna protectora.

La reducción en la toxicidad se mide, *por ejemplo*, mediante una de las siguientes pruebas conocidas en la técnica: actividad hemolítica, actividad de la fosfolipasa C, actividad de la esfingomielinasa, actividad de la fosfodiesterasa, y actividad letal general en un grupo animal de prueba. Generalmente, no existe toxicidad residual detectable mediante dichas pruebas normalizadas. Sin embargo, la presencia de un nivel mínimo de una o más de estas actividades, *por ejemplo*, desde aproximadamente 10^{-4} a aproximadamente 10^{-2} , con respecto a la toxicidad de un número equivalente de unidades infecciosas de la toxina alfa de *C. perfringens* natural a partir de la cual se ha derivado la muteína, puede demostrar ser aceptable en un escenario veterinario.

En una realización, la presente invención se practica empleando las cepas del biotipo A de *C. perfringens*, que son de particular importancia como agentes etiológicos de diversos tipos de gangrena y enfermedades entéricas. En particular, la toxina alfa de *C. perfringens* es la diana para la eliminación-atenuación, debido a que la atenuación de esta toxina es suficiente para volver al *C. perfringens* suficientemente no letal, con respecto a las cepas naturales.

De forma amplia, el gen plc de *C. perfringens* expresa una muteína de la toxina alfa.

La muteína de la toxina alfa tiene una eliminación que incluye el resto His del bucle Zn², junto con los restos que lo flanquean, con el fin de reducir mucho la posibilidad de cualquier mutación que revierta a la forma tóxica. Se ha encontrado ahora que la eliminación del resto His del bucle Zn², por ejemplo, His₆₈ de la SEC ID N°: 3 junto con la eliminación de los restos adicionales que flanquean el resto His del bucle Zn², proporciona una toxina alfa que retiene suficiente inmunogenicidad para inducir inmunidad protectora en animales vacunados con el *C. perfringens* inventivo, siendo a la vez improbable que se experimente una mutación de reversión que codifique una toxina alfa

natural. Los restos adicionales que se pueden eliminar se eliminan en la dirección del extremo C y/o en la dirección del extremo N, con respecto a His₆₈ y pueden variar en número de aproximadamente 4 a aproximadamente 60 restos en cualquiera de esas direcciones. De forma alternativa, His₁₄₈ y los restos que la flanquean se pueden eliminar de forma similar.

Una muteína de la toxina *alfa* incluye además, además de la eliminación de His₆₈ una eliminación de al menos 30 restos de aminoácidos de cualquier lado (en la dirección del extremo C o del extremo N) de la posición His₆₈, con respecto a la SEC ID N°: 3. Una muteína de la toxina *alfa* descrita incluye, además de la eliminación de His₆₈, una eliminación de al menos 20 restos de aminoácidos de cualquier lado de His₆₈ con respecto a la SEC ID N°: 3. Una muteína de la toxina *alfa* descrita incluye, además de la eliminación de His₆₈, una eliminación de al menos 5 restos de aminoácidos de cualquier lado de His₆₈ con respecto a la SEC ID N°: 3. La muteína de la toxina *alfa* inventiva incluye una eliminación desde aproximadamente el resto 62 a aproximadamente el resto 70, con respecto a la SEC ID N°: 3. Opcionalmente, los restos de aminoácidos eliminados se sustituyen por uno o más de otros restos, tal como un único resto de leucina.

En otro aspecto más adicional, la muteína de la toxina alfa de *C. perfringens* se produce y aísla de *C. perfringens*, o a partir de un organismo recombinante alternativo, que se va a emplear como un reactivo de investigación, y/o en kits diagnósticos o de ensayos, por ejemplo, como una diana para anticuerpos dirigidos contra la toxina *alfa*. Otra utilidad más de la muteína de la toxina *alfa* de *C. perfringens* es en vacunas especializadas para animales, por ejemplo, seres humanos, que pueden no tolerar la vacunación con el organismo *C. perfringens* atenuado inventivo.

Además, se da a conocer un anticuerpo que se une específicamente a la toxina alfa natural con respecto a las muteínas de la toxina alfa de la presente invención

Se da a conocer además un anticuerpo que se une preferiblemente a una proteína de la toxina alfa de *C. perfringens* natural que presenta a la vez una unión mínima o no tiene unión con la muteína de la toxina alfa inventiva, *por ejemplo*, evitando la unión a una muteína de la toxina *alfa* que tiene una eliminación tal como se describe en detalle, más arriba. El anticuerpo proporcionado es por tanto útil para distinguir la eliminación de la muteína de la toxina *alfa* procedente de la toxina *alfa* natural, y por tanto, es también útil para distinguir animales vacunados con una vacuna de la presente invención de animales que han sido infectados por *C. perfringens* natural. Son conocidos en la técnica los procedimientos para estimular y cribar dichos anticuerpos selectivos. De forma similar, se pueden generar también, anticuerpos que reconocen la muteína de la toxina alfa inventiva de la presente invención, pero no la proteína natural. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales ("mAb") o fragmentos o fragmentos o derivados de dichos anticuerpos diseñados mediante ingeniería genética que retienen las propiedades selectivas de la unión.

Se han descrito ampliamente las técnicas para preparar y cribar anticuerpos monoclonales [véanse, por ejemplo Stites. y col. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, California (1988); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.), Academic Press, Nueva York (1986); y Kohler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975).

Por ejemplo, y sin limitación, se estimula una respuesta inmune en los animales adecuados, tales como ratones o pollos, mediante vacunación con una proteína *alfa* de *C. perfringens* natural purificada, por ejemplo, en combinación con un adyuvante adecuado. Por ejemplo, con el fin de evitar la toxicidad de la proteína alfa natural, el inmunógeno es un péptido que corresponde a los restos eliminados, y, si es necesario, la inmunogenicidad del péptido está potenciada por la combinación con un adyuvante adecuado mediante el acoplamiento con una proteína portadora adecuada. El acoplamiento a una proteína portadora es una técnica conocida, y se puede llevar a cabo, *por ejemplo*, proporcionando el péptido con una cisteína terminal, y acoplándolo a hemocianina de lapa californiana (KLH) o albúmina de suero bovino (BSA) utilizando tanto la química de acoplamiento de la maleimida como el enlazador (4-[N maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato) de sulfosuccinimidilo (de Pierce). Se puede emplear también un enlazador de carbodiimida sin que se requiera una cisteína terminal.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se pueden obtener linfocitos esplénicos procedentes de un animal inmunizado, se prepararon hibridomas a partir de dichos linfocitos, y se pueden obtener uno o más hibridomas potencialmente adecuados que expresan la proteína anti-alfa. Se cribaron los hibridomas frente a la muteína y la proteína alfa natural, y se identificaron, se clonaron y se emplearon para producir anticuerpos monoclonales que se unían solo a la proteína alfa natural. Opcionalmente, se obtuvo ADNc a partir de la línea clonal del hibridoma identificado, y se pueden producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en diferentes sistemas de expresión conocidos por la técnica.

Tal como se ha descrito anteriormente, una potencial desventaja de las vacunaciones en general es que los animales vacunados resultantes pueden generar falsos positivos cuando se prueban para la infección cuando se utilizan anticuerpos sensibilizados contra una cepa que se produce naturalmente, impidiendo, por tanto, la identificación de los animales infectados. Se da a conocer, por tanto, un kit de prueba para distinguir un sujeto animal que se ha infectado por un organismo *C. perfringens* que se produce naturalmente procedente de un animal vacunado con una muteína de toxina *alfa* de la presente invención.

Uno de dichos kits de prueba incluye una cantidad de anticuerpos selectivos dirigidos contra la toxina *alfa* natural que presentan mínima o ninguna unión a una muteína de la toxina *alfa* de la presente invención. El kit puede incluir también otros reactivos adecuados, suficientes para llevar a cabo al menos una prueba diagnóstica. En una realización adicional, el anticuerpo se etiqueta o se marca con un resto marcador fácilmente detectable, *por ejemplo*, cualquier marcador enzimático conocido en la técnica, *por ejemplo*, peroxidasa; etiqueta fluorescente, *por ejemplo*, fluoresceína; perlas, que incluyen perlas magnéticas; y similares. Opcionalmente, el kit puede incluir además un anticuerpo etiquetado que se une selectivamente al anticuerpo selectivo dirigido contra la toxina *alfa* natural. Se conocen bien en la técnica los inmunoensayos, e incluyen inmunoensayo de tipo sándwich, inmunoensayos competitivos, enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) y otros.

Se proporcionan también procedimientos para identificar y distinguir un animal que ha sido infectado por un organismo *C. perfringens* que se produce naturalmente, es *decir*, natural, de un animal vacunado con una vacuna que comprende el organismo *C. perfringens* atenuado de la presente invención, esto se lleva a cabo, por ejemplo, mediante las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto una muestra de fluido procedente del animal con el anticuerpo selectivo dirigido contra la toxina alfa natural anteriormente descrito que presenta mínima o ninguna unión a una muteína de la toxina alfa de la presente invención, y
- (b) determinar si el anticuerpo reacciona con la muestra de fluido;

en las que cuando el anticuerpo reacciona con la muestra de fluido, el animal se identifica como uno que se ha infectado por un organismo *C. perfringens* que se produce naturalmente.

Producción de cepas de *C. perfringens* atenuadas

Un procedimiento para convertir aislados de *C. perfringens* en una cepa atenuada, o sustancialmente no tóxica, adecuada para administrarse como una vacuna se puede llevar a cabo como sigue. Se puede sustituir el gen (*plc*) de la toxina *alfa* en el cromosoma bacteriano por un gen que codifica solo una muteína de toxina *alfa*, sin dejar capacidad remanente para que el organismo *C. perfringens* produzca toxina alfa natural. De forma muy amplia, el procedimiento para producir el organismo de la vacuna incluye, pero no se limita a, las siguientes etapas generales, no necesariamente en el orden presentado.

(1) Identificar el tipo de animal que se va a proteger mediante la vacunación y uno o más aislados clínicos obtenidos a fines de cribado. Esta etapa es normalmente opcional en el caso de la toxina *alfa*, debido a que es probable que los aislados de una especie animal no proporcionen protección para otras especies animales.

(2) Amplificar el gen *plc* procedente del aislado o aislados de *C. perfringens*, mediante la PCR u otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos conocida en la técnica, con cebadores flanqueantes adecuados, y empleando la amplificación con cebadores adecuados para crear la mutación de eliminación deseada. Alternativamente, se puede sondear una biblioteca adecuada.

(3) Crear un vector suicida que comprende el gen *plc* de la eliminación, en el que se ha eliminado el origen de la replicación de *C. perfringens*, y/o en el que no está sencillamente presente un origen de la replicación que puede replicarse en *C. perfringens*; y en cualquier caso, incluye marcadores seleccionables, *por ejemplo*, marcadores de antibióticos, adyacentes al gen *plc* mutado. A continuación se puede insertar dicho vector en organismos *C. perfringens*, *por ejemplo*, mediante electroporación, u otros procedimientos conocidos en la técnica.

(4) Seleccionar organismos *C. perfringens* en los que el gen *plc* de la muteína se ha integrado satisfactoriamente en el cromosoma bacteriano. Esto se lleva a cabo cultivando los organismos *C. perfringens* de la etapa (3) en presencia del agente de selección, por ejemplo, un(os) antibiótico(s) que corresponden a los marcadores seleccionables. Por ejemplo, los únicos organismos *C. perfringens* que podrían crecer con selección del antibiótico serían aquellos que a través de la recombinación homóloga tienen directamente integrado el vector suicida, con su(s) gen(es) de resistencia al(a los) antibiótico(s), en el cromosoma bacteriano. Estos organismos *C. perfringens* en crecimiento, podrían tener, por tanto, dos genes *plc* adyacentes, siendo uno natural, mientras que el otro tendría la mutación de la eliminación.

(5) Seleccionar los organismos *C. perfringens* que han experimentado un episodio de recombinación adicional que elimina los marcadores seleccionables, por ejemplo, los marcadores de antibióticos, junto con el gen *plc* natural. Esto se lleva a cabo cultivando los organismos de (4) en ausencia del agente de selección, *por ejemplo*, el antibiótico, y seleccionando los clones no hemolíticos en agar sangre.

Debido a que la inserción del ácido nucleico de la muteína se lleva a cabo mediante recombinación homóloga, la molécula de ácido nucleico que codifica la muteína de la toxina alfa se incorpora en una posición cromosómica que es homóloga a la localización de una molécula de ácido nucleico que codifica una toxina *alfa* natural que está presente en *Clostridium perfringens* no atenuados.

Con más detalle, se obtuvieron aislados de *Clostridium perfringens* en el campo procedentes de animales enfermos o de otras fuentes. De forma inicial, el ADN genómico obtenido de los aislados en el campo de interés se insertó en un vector lanzadera de microorganismo duplicado adecuado, *por ejemplo*, un plásmido lanzadera con marcadores

seleccionables, *por ejemplo*, marcadores de antibióticos para evaluar su transformabilidad. De forma amplia, un vector lanzadera adecuado incluirá una, dos, tres o más de las siguientes características, un sitio de clonación, un origen de replicación de *C. perfringens*, un origen de replicación de *E. coli*, y un gen de resistencia a los antibióticos y/o un marcador seleccionable. Los vectores conocidos en la técnica adecuados para este fin, o fácilmente adaptables para este fin incluyen, por ejemplo, el plásmido pHR106 lanzadera recombinante descrito por Roberts y col., [Appl Env Microbiol 54: 268-270 (1988)]; los plásmidos pJIR 750 y pJIR 751 descritos por Bannam, y col., [Plasmid 29: 233-235 (1993)]; el promotor menos el vector de selección del promotor pPSV de Matsushita, y col., 1994, Plasmid 31, 317-319; los plásmidos lanzadera pJIR1456 y pJIR1457, descritos por Lyras, y col., 1988, Plasmid 39, 160-164; y el vector lanzadera descrito por Kim y col., 1989, Appl Environ Microbiol 55, 360-365. La eliminación del origen de replicación de *C. perfringens* convierte el vector lanzadera en un vector suicida.

Por ejemplo, un plásmido lanzadera es pJIR418, descrito por Sloan, y col., 1992, Plasmid 27, 207-219.

Los aislados que dan como resultado $\geq 10^4$ transformantes por microorganismo de ADN plásmido, y que son susceptibles al marcador del antibiótico, *por ejemplo*, cloranfenicol o eritromicina, son potenciales candidatos para la eliminación. A continuación se usa el ADN genómico de las cepas candidatas como molde para una PCR de intervalo largo del gen *plc* (toxina *alfa*) y las secuencias flanqueantes de las cepas candidatas. Por ejemplo, tal como se ejemplifica a continuación en el presente documento, se utilizó el cromosoma de la cepa 13 de *C. perfringens* para identificar los cebadores de la amplificación del gen que codificaba la toxina *alfa*. A continuación se usaron estos cebadores para clonar el gen de la toxina *alfa* de otra cepa, que fue el aislado CP6 de aves.

Tras la subclonación de los productos de la PCR, el gen de la toxina *alfa* y las regiones flanqueantes se secuenciaron y se cartografió la restricción. Se sintetizaron nuevos cebadores de oligonucleótidos con los sitios de restricción flanqueantes y los productos de las dos amplificaciones separadas se clonaron en un plásmido suicida adecuado (se ha eliminado el origen de la replicación de *C. perfringens*), *por ejemplo*, ejemplificado a partir de ahora en el presente documento como plásmido 1192-23.1 para crear la cepa de vacuna deseada con la eliminación.

El(los) vector(es) suicida(s) proporcionado(s) específico(s) del(de los) aislado(s) se insertó(aron) en la cepa de *C. perfringens* del animal correspondiente, mediante cualquier procedimiento normalizado conocido en la técnica. Por ejemplo, esto se lleva a cabo mediante electroporación. Cuando el vector suicida se insertó en *C. perfringens* (sin el origen de replicación de *C. perfringens*, es incapaz de replicarse en el citoplasma, y no sobrevive a no ser que se integre satisfactoriamente en el cromosoma bacteriano). Los integrantes satisfactorios son los únicos organismos que crecerán en presencia del antibiótico que corresponde al gen marcador antibiótico introducido de forma reciente.

Se puede emplear cualquier gen marcador seleccionable conocido en la técnica, aunque se emplean los marcadores de cloranfenicol y/o eritromicina en los vectores ejemplificados a partir de ahora en el presente documento.

Estos episodios recombinantes son el resultado de la homología del gen *plc* natural con el ADN plásmido del gen *plc* de la eliminación. La bacteria recombinante resultante se denomina integrante. El integrante contiene una copia del vector de homología introducido que está integrado en el locus del gen *plc*. De esta manera, el integrante resultante incluye dos copias del gen *plc*, la copia normal original, y la versión eliminada introducida. Los genes de resistencia a antibióticos introducidos se localizan entre las dos copias del gen *plc*. Se pueden producir episodios de recombinación aleatoria raros entre las dos copias del gen *plc*. Este episodio de recombinación puede producir uno de dos resultados. En ambos casos, el ADN que interviene entre las dos copias del gen *plc* (que incluye los genes de resistencia) ha sido eliminado. En el primer resultado, el gen *plc* normal o natural está restaurado, dando como resultado la recuperación de la cepa progenitora original sin los marcadores de antibióticos. En el segundo resultado, el gen *plc* natural está sustituido por la copia eliminada, produciendo la construcción eliminadora de la toxina la deseada, sin los marcadores de antibióticos.

Eliminar el antibiótico del medio de cultivo permite sobrevivir y replicarse a aquellas bacterias que han experimentado la recombinación. A continuación se identificaron los clones recombinantes de la eliminación mediante el crecimiento en agar sangre, sin la hemólisis normalmente presentada por *C. perfringens* que expresa la toxina *alfa* natural.

Animales que se van a vacunar

Los animales para los cuales se puede producir una vacuna de *C. perfringens* atenuada, y a partir de los cuales se puede aislar una cepa de *C. perfringens* natural, incluyen, de forma amplia, cualquier animal para el cual la infección por *C. perfringens* es un problema. Los vertebrados de interés incluyen aves, mamíferos, y peces, y particularmente animales de importancia económica y/o agrícola. La siguiente lista de animales son aquellos que se contemplan para beneficiarse de una vacuna de *C. perfringens* y/o a partir de los cuales se pueden obtener aislados de *C. perfringens* natural. Aunque es algunas veces posible que cualquiera de dichas vacunas comprenda un componente (vivo o no vivo) que se haya aislado originalmente del mismo género o especie de animal que se va a vacunar, esto no es necesario.

- Una lista no limitante de dichos animales incluye aquellos que pertenecen a familias de aves, bovinos, ovinos, etc, así como animales acuáticos, por ejemplo, que pueden emplearse en acuicultura y/o recogerse de la naturaleza y mantenerse vivos en tanques de almacenamiento temporales durante un tiempo antes de la comercialización. Estos incluyen peces tales como trucha o salmón, y otras especies criadas o recolectadas por el beneficio económico. Los
- 5 animales acuáticos no vertebrados incluyen langostas, cangrejos, moluscos, por ejemplo, calamares, pulpos, almejas, ostras, mejillones, vieiras, y similares. Debe entenderse que las aves incluyen, por ejemplo, pollos, pavos, gansos, patos, etc. Debe entenderse que los bovinos incluyen, por ejemplo, ganado, ganado vacuno, terneras, etc. Debe entenderse que los ovinos incluyen, por ejemplo, corderos, etc.
- 10 Para los fines de la presente invención, el término “pez” debe entenderse que incluye sin limitación, el grupo de peces *Teleostei*, es decir, los teleósteos: El orden de los *Salmoniformes* (que incluye la familia *Salmonidae*) y el orden de los *Perciformes* (que incluye la familia *Centrarchidae*) están contenidos en el grupo de los *Teleostei*.
- Los ejemplos de peces receptores potenciales incluyen la familia *Salmonidae*, la familia *Serranidae*, la familia *Sparidae*, la familia *Cichlidae*, la familia *Centrarchidae*, el Roncador de Tres líneas (*Parapristipoma trilineatum*), y el Pleco de Ojos Azules (*Plecostomus spp*).
- 15

Familia Salmonidae	
NOMBRE TAXONÓMICO	NOMBRE COMÚN
<u><i>Coregonus clupeaformis</i></u>	Arenque de lago
<u><i>Coregonus hoyi</i></u>	Arenque
<u><i>Oncorhynchus keta</i></u>	Salmón del Pacífico (Salmón keta)
<u><i>Oncorhynchus gorbuscha</i></u>	Salmón rosado
<u><i>Oncorhynchus kisutch</i></u>	Salmón Coho (Salmón plateado)
<u><i>Oncorhynchus masou</i></u>	Salmón japonés (Salmón masu)
<u><i>Oncorhynchus nerka</i></u>	Salmón rojo
<u><i>Oncorhynchus tshawytscha</i></u>	(Salmon real, boquinegra o chinook)
<u><i>Prosopium cylindraceum</i></u>	Arenque del Atlántico
<u><i>Oncorhynchus clarki</i></u>	Trucha de agua dulce
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u>	Trucha arcoiris
<u><i>Salmo salar</i></u>	Salmón del Atlántico
<u><i>Salmo trutta</i></u>	Trucha común
<u><i>Salmo trutta</i> X <i>S. fontinalis</i></u>	Trucha tigre híbrida
<u><i>Salvelinus alpinus</i></u>	Trucha alpina
<u><i>Salvelinus confluentus</i></u>	Trucha toro
<u><i>Salvelinus fontinalis</i></u>	Trucha de arroyo
<u><i>Salvelinus leucomaenis</i></u>	Trucha japonesa (trucha de montaña)
<u><i>Salvelinus malma</i></u>	Salvelino (trucha de Miyabe)
<u><i>Salvelinus namaycush</i></u>	Trucha de lago
<u><i>Thymallus thymallus</i></u>	Tímalo
Algunos miembros de la Familia Serranidae	
NOMBRE TAXONÓMICO	NOMBRE COMÚN
<u><i>Centropristis ocyurus</i></u>	Lubina de mar
<u><i>Centropristis philadelphicus</i></u>	Lubina de roca
<u><i>Centropristis striata</i></u>	Lubina de mar negra
<u><i>Diplectrum bivittatum</i></u>	Perca enana de arena
<u><i>Diplectrum formosum</i></u>	Perca de arena
<u><i>Epinephelus flavolimbatus</i></u>	Mero amarillo
<u><i>Epinephelus morio</i></u>	Mero rojo
<u><i>Serranus phoebe</i></u>	Charlatán
<u><i>Serranus tortugarum</i></u>	Lubina gris
Algunos miembros de la familia Sparidae	
NOMBRE TAXONÓMICO	NOMBRE COMÚN
<u><i>Archosaurus probatocephalus</i></u>	Sargo
<u><i>Archosaurus rhomboidalis</i></u>	Besugo
<u><i>Calamus penna</i></u>	Pargo legítimo
<u><i>Laqodon rhomboides</i></u>	Sargo salema
<u><i>Pagrus Major</i></u>	Besugo rojo

NOMBRE TAXONÓMICO	NOMBRE COMÚN
<u>Sparus aurata</u>	Dorada
<u>Stenotomus chrysops</u>	Pez ratón
<u>Algunos miembros de la familia Cichlidae</u>	
<u>Aequidens latifrons</u>	Ácara azul
<u>Cichlisoma nigrofasciatum</u>	Cíclido del Congo
<u>Crenichichla sp.</u>	Cíclido lucio alargado
<u>Pterophyllum scalare</u>	Pez ángel
<u>Tilapia mossambica</u>	Tilapia de Mozambique
<u>Oreochromis spp</u>	Tilapia
<u>Sarotherodon aurea</u>	Tilapia dorada
<u>Algunos miembros de la familia Centrarchidae</u>	
NOMBRE TAXONÓMICO	NOMBRE COMÚN
<u>Ambloplites rupestris</u>	Perca de roca
<u>Centrarchus macropterus</u>	Pez volador
<u>Elassoma evergladei</u>	Perca sol pigmea de las Everglades
<u>Elassoma okefenokee</u>	Perca sol pigmea de Okefenokee
<u>Elassoma zonatum</u>	Perca sol pigmea de bandas
<u>Enneacanthus gloriosus</u>	Perca sol de puntos azules
<u>Enneacanthus obesus</u>	Perca sol de bandas
<u>Lepomis auritus</u>	Perca sol arlequín
<u>Lepomis cyanellus</u>	Perca sol verde
<u>Lepomis cyanellus X L. gibbosus</u>	Perca sol x verde
<u>Lepomis gibbosus</u>	Perca sol
<u>Lepomis gulosus</u>	Mojarrón
<u>Lepomis humilis</u>	Mojarra
<u>Lepomis macrochirus</u>	Mojarra azul (Mojarra de agallas azules)
<u>Lepomis megalotis</u>	Mojarra gigante
<u>Micropterus coosae</u>	Lubina de ojo rojo
<u>Micropterus dolomieu</u>	Lubina negra de boca pequeña
<u>Micropterus punctulatus</u>	Lubina moteada
<u>Micropterus salmoides</u>	Lubina de Florida
<u>Pomoxis annularis</u>	Perca blanca
<u>Pomoxis nigromaculatus</u>	Perca plateada

En una realización adicional el animal es un animal de compañía o un ser humano. Para los fines de la presente invención, el término animal de “compañía” debe entenderse que incluye todos los animales –caballos (equinos), gatos (felinos), perros (caninos), y roedores, incluyendo ratones, ratas, cobayas, especies de conejos, y aves, tales como pichones, loros, y similares.

Los pájaros que reciben dicha vacunación pueden asociarse tanto con avicultura comercial como no comercial. Estos incluyen, *por ejemplo*, *Anatidae*, tales como cisnes, gansos, y patos, *Columbidae*, *por ejemplo*, palomas y pichones, tales como pichones domésticos, *Phasianidae*, *por ejemplo*, perdices, urogallos y pavos, *Thesienidae*, *por ejemplo*, pollos domésticos, *Psittacidae*, *por ejemplo*, periquitos, guacamayos, y loros, criados, *por ejemplo*, para las mascotas o el mercado del coleccionismo. Se ejemplifican los pollos a continuación en el presente documento.

Fuentes de aislados naturales

Generalmente, los organismos *C. perfringens* atenuados de la presente invención pueden producirse comenzando con un *C. perfringens* que ha sido aislado originalmente a partir de cualquier animal infectado de interés, tal como se ha descrito más arriba y/o a partir del entorno. El entorno incluye cualquier material que contiene organismos *C. perfringens* viables y/o esporas de *C. perfringens* incluyendo, *por ejemplo*, alimento contaminado, suelo, agua, material de las camas animales, heces, y similares.

Justin y col., [Biochemistry 41, 6253-6262 (2002)] han caracterizado toxinas *alfa* de diferentes cepas de *C. perfringens* que son casi idénticas en secuencia y en las propiedades bioquímicas. Sin embargo, Justin y col., describen también una cepa se aisló de una fuente aviar (un cisne) que tenía una toxina *alfa* que presentaba un grado grande de variación de la secuencia y una especificidad por el sustrato alterada en comparación con otras cepas. Por este motivo, se cree que la mayor parte de aislados, cuando se conviertan en una forma atenuada,

estimularán una inmunidad protectora frente a la toxina *alfa* de otras muchas cepas de *C. perfringens* que se producen naturalmente. Sin embargo, dada la posibilidad de variación de la toxina *alfa* entre aislados, será ventajoso a menudo aislar y atenuar organismos *C. perfringens* procedentes de especies animales para las cuales se desea una vacuna dirigida contra *C. perfringens*. El aislado ejemplificado a continuación en el presente documento se aisló de pollo, y se probó en dicha especie.

Vacunas

Los organismos *C. perfringens* atenuados de la presente invención se formulan generalmente en composiciones de vacuna farmacéuticamente aceptables. Las composiciones de vacuna se formulan de acuerdo con la ruta de administración y son compatibles con el agente antigénico activo. El agente antigénico activo es, *por ejemplo*, una o más cepas de organismos *C. perfringens* de tipo A atenuados de acuerdo con la presente invención. Opcionalmente, la composición de vacuna puede incluir también uno o más tipos de proteína *alfa* no tóxica, en combinación con los organismos *C. perfringens* de tipo A atenuados.

Por ejemplo, sustancialmente todos los organismos *C. perfringens* de tipo A atenuados incluidos en la composición de vacuna están vivos y son viables, aunque para determinadas situaciones específicas, *por ejemplo*, para inmunizar determinados seres humanos o animales inmunocomprometidos, la vacuna comprenderá exclusivamente organismos *C. perfringens* de tipo A atenuados muertos.

La composición de vacuna incluye tampones y/o sales fisiológicamente compatibles, en combinación opcional con adyuvantes y/o inmunopotenciadores o inmunoestimuladores opcionales (administrados simultáneamente o administrados en serie, *por ejemplo*, antes o después de la vacunación).

Los inmunoestimuladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas, sobrenadantes procedentes de cultivos celulares de linfocitos, monocitos, células de órganos linfáticos, preparaciones celulares o extractos celulares (*por ejemplo*, preparaciones de *Staphylococcus aureus* o lipopolisacáridos), mitógenos, o adyuvantes que incluyen compuestos farmacéuticos de bajo peso molecular. Se puede administrar un inmunoestimulador *in ovo* en cualquier momento durante la incubación. En un aspecto concreto, el inmunoestimulador se administra en el medio que contiene los organismos *C. perfringens* de tipo A atenuados.

Procedimientos de administración de vacunas

Las vacunas anteriormente descritas se administran, *por ejemplo*, mediante inyección o inoculación por una o una combinación de las siguientes rutas: administración oral, intranasal, parenteral, subcutánea, escarificación, y/o intramuscular en cualquier formulación adecuada conocida en la técnica, *por ejemplo*, un tampón compatible y/o una solución salina fisiológicamente aceptable, en combinación opcional con adyuvantes y/o inmunopotenciadores o inmunoestimuladores (administrados simultáneamente o administrados en serie, *por ejemplo*, antes o después de la vacunación). Para vacunas/procedimientos de vacunación administrados por vía oral, se emplean fácilmente cualquiera de los tampones o agentes suspensores fisiológicamente adecuados que se conocen en la técnica. Además, la composición se puede incorporar, *por ejemplo*, premezclarse en agua de grifo o pulverizarse sobre concentrados de alimento, espolvorearse o pulverizarse sobre granos de maíz u otros, y similares.

El tracto gastrointestinal es un sitio común de infección por *C. perfringens*, y por tanto, se contempla la administración oral como un procedimiento de inoculación. Se contempla la presencia en el tracto gastrointestinal de organismos *C. perfringens* atenuados vivos de la presente invención para estimular reacciones inmunoprotectoras localizadas en la capa de la mucosa del tracto gastrointestinal, y puede también actuar de forma competitiva para evitar la posterior colonización por *C. perfringens* natural.

Para aves, tales como aves de corral domésticas, que incluyen pollos, patos, gansos, etc, el procedimiento oral, o la inyección *in ovo* están entre las rutas útiles para la vacunación. Se ejemplifica a continuación en el presente documento la ruta *in ovo*, y se produjo una inmunización y protección activas procedentes del estímulo en pollitos empollados.

Expresión génica extraña en *C. perfringens*

Utilizando las técnicas desarrolladas en los ejemplos anteriores, cualquier gen que no se produce naturalmente, es decir, extraño a *C. perfringens*, se puede insertar opcionalmente en el ADN cromosómico de *C. perfringens*. Para la expresión de proteínas extrañas, se pueden llevar a cabo fusiones génicas que preservan las secuencias que flanquean el gen de la toxina *alfa*, el promotor de la toxina *alfa* y su secuencia señal. En una realización, la mayor parte de la secuencia de codificación del gen *plc* está sustituida con el gen extraño. Los nucleótidos restantes del gen *plc* en la dirección 3' del gen insertado están fuera del marco, y por tanto no se produce toxina *alfa* funcional. De forma alternativa, se puede insertar el gen extraño en marco con la secuencia de nucleótidos que codifica la toxina *alfa* formando una proteína de fusión de la toxina *alfa* – proteína extraña.

Se pueden sintetizar cebadores de oligonucleótidos del gen extraño, *por ejemplo*, con una secuencia de la etiqueta FLAG del extremo N en los sitios de restricción adecuados. Se pueden clonar los productos de la PCR en el vector suicida; la etiqueta FLAG y el gen extraño se insertan en marco con la secuencia señal de la toxina alfa. La proteína extraña se expresa bajo el control del promotor de la toxina *alfa* y se dirige para la secreción por la secuencia señal de *plc*. La proteína extraña secretada se puede detectar en los medios sobrenadantes mediante transferencia Western utilizando una etiqueta anti-FLAG.

Se puede insertar cualquier gen extraño adecuado en el genoma de *C. perfringens* de esta manera. Esto incluye, *por ejemplo*, el ADN que codifica antígenos de patógenos del tracto gastrointestinal, incluyendo, *por ejemplo*, proteínas antigénicas de bacterias tales como *E. coli*, especies de salmonella, especies de campylobacter, especies de lawsonia, y similares; proteínas antigénicas de parásitos tales como especies de eimeria, especies de isospora, especies de cryptosporidium y similares; y proteínas antigénicas de virus tales como rotavirus, coronavirus, y similares, con el fin de inmunizar el animal tratado con dicho *C. perfringens* recombinante. Otras proteínas que se pueden expresar por dicho *C. perfringens* recombinante incluyen proteínas o péptidos terapéuticos. Opcionalmente, estas incluyen péptidos que son endógenos para el tracto gastrointestinal, incluyendo el factor trébol, o cualquier tipo de citoquina conocido en la técnica, *por ejemplo* IL-18 de pollo, y similares.

Una de dichas construcciones de *C. perfringens* expresa la proteína IL-18 de pollo. La administración de bacterias vivas que contienen la fusión génica permite administrar dosis terapéuticas de IL-18 en el intestino además de ser relativamente inocuas en el animal hospedador en virtud de la ausencia de producción de toxina *alfa*. Se pueden expresar también otros agentes terapéuticos utilizando este sistema. Se incluyen los siguientes ejemplos específicos a fines de ilustración, y no se pretende que limiten el alcance de la invención, a no ser que se indique otra cosa.

EJEMPLO 1

VECTOR DE HOMOLOGÍA ELIMINADOR DE LA TOXINA ALFA DE *C. PERFRINGENS*

Se creó un vector 1162-55-20 plásmido de homología útil en la construcción de los de los eliminadores de la toxina *alfa* de *C. perfringens*. El plásmido incorpora varios elementos importantes; la región de replicación procedente del plásmido pUC18 de *E. coli*, los genes de resistencia al cloranfenicol (*catP*) y la eritromicina (*ermBP*) de *C. perfringens* (ambos de los cuales se expresan también en *E. coli*) y el gen (*plc*) de la toxina *alfa* de *C. perfringens* inactivado mediante una eliminación específica de 9 aminoácidos. El plásmido 1162-55-20 se creó en varias etapas, como sigue.

En primer lugar, se clonó el gen *plc* a partir de un aislado de ave reciente de *C. perfringens* (cepa CP6). Se usó la secuencia de la cepa 13 de *C. perfringens* (Genbank NC 003366; SEC ID N°: 2) para diseñar los cebadores de oligonucleótidos que se van a usar en la clonación del gen *plc*. Estos y todos los cebadores posteriores se obtuvieron comercialmente de Sigma Genosys, Woodlands, TX. El cebador en la dirección 5' localizado en el gen *ypic* (CPE0035), 5' AGCTGCATAAGCAAAAGTTCCAACCTC 3' (SEC ID N°: 14) corresponde a los nucleótidos 47675-47700 de la cepa 13 (SEC ID N°: 2). El cebador en la dirección 3' localizado en el gen *cobW* (CPE0037), 5' GCAGAACTCTTCTTAGACCTATTCTTTTAGGC 3' (SEC ID N°: 15), es complementario a los nucleótidos 50597-50629 de la cepa 13. Estos cebadores se utilizaron junto con el ADN genómico de la cepa CP6 de *C. perfringens* en una reacción en cadena de la polimerasa de intervalo largo (PCR). Se realizó una predicción de un producto de 2955 pares de bases procedentes del gen *ypic* en la dirección 5' al gen *cobW* en la dirección 3' a partir de la secuencia conocida de la cepa 13 (tal como se ilustra por la FIG. 1). El promotor de la toxina *alfa*, la secuencia señal y la secuencia de codificación del gen *plc* (CPE0036) están contenidos en este fragmento, es decir, entre el gen *ypic* y el gen *cobW* en la dirección 3'. El fragmento de la PCR de 2955 pares de bases se clonó a continuación en el vector de clonación pCR-Blunt (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) dando como resultado el plásmido 1162-52.1. La secuencia de nucleótidos de la región de codificación *plc* del fragmento de 2955 pares de bases de la cepa CP 6, se determinó a partir de este fragmento (SEC ID N°: 22; y el polipéptido correspondiente es la SEC ID N°: 23) y se mostró que era sustancialmente homólogo que el del gen *plc* de la cepa 13 de *C. perfringens* (SEC ID N°: 2).

A continuación, la región de replicación de *E. coli* y los genes de resistencia de *C. perfringens* se clonaron a partir del plásmido lanzadera pJIR418 (Sloan, y col, 1992, Plasmid 27, 207-219; Genebank M77169). El plásmido pJIR418 se digirió con las enzimas de restricción Bam HI y Spe I y los extremos se rellenaron con la polimerasa Klenow. La ligadura del fragmento grande produjo el plásmido 1162-45.1 y restauró el sitio de restricción Bam HI. Este plásmido retiene la región de replicación de *E. coli*, pero, a diferencia de pJIR418, no contienen un origen de replicación de *C. perfringens*. El plásmido es por tanto capaz de replicación autónoma en *E. coli*, pero no en *C. perfringens*.

En la siguiente etapa, la mitad del extremo C del gen *plc* se subclonó en el plásmido intermedio 1162-45.1. La digestión del plásmido 1162-52.1 con Bam HI y Eco RI liberó un fragmento de 1742 pares de bases que contenían la porción C terminal del gen de la toxina *alfa* procedente del único sitio Bam HI localizado en el gen *plc* en la dirección 3' hacia el gen *cobW* en un sitio Eco RI localizado en el sitio de clonación múltiple del plásmido 1162-45.1. En el plásmido 1162-53.7 resultante, la mitad C terminal del gen *plc* está en la misma orientación transcripcional que los genes *catP* y *ermBP* del plásmido parental.

En la etapa final, la mitad del extremo N del gen *plc* se clonó en un único sitio Bam HI del plásmido 1162-53.7. Esto se llevó a cabo creando un fragmento de la PCR derivado del gen de la toxina *alfa* subclonado en el plásmido 1162-52.1. El cebador en la dirección 5', 5' ggatccAGCTGCATAAGCAAMGTTCCMCTC 3' (SEC ID N°: 16) era idéntico al cebador de *ypc* anteriormente señalado (SEC ID N°: 4) excepto en que se incluyó un sitio Bam HI flanqueante. El cebador en la dirección 3' localizado en el gen de la toxina *alfa*, 5' ggatccaATGCATTCTTATCATMTCTGGATMGTAGMCC 3' (SEC ID N°: 17) era complementario a los nucleótidos 48824-48857 de la cepa 13 e incluía un sitio de restricción Bam HI flanqueante y un nucleótido separador para mantener el marco de lectura (minúsculo). El fragmento Bam HI resultante de la PCR con estos cebadores y el molde de ADN del plásmido 1162-52-1 se clonó en un sitio Bam HI único del plásmido 1162-53.7. Se aisló un plásmido que contenía las regiones de los dos genes *plc* en la misma orientación transcripcional. Este plásmido 1162-55.20 contiene el gen *plc* con la eliminación de los nueve aminoácidos deseados y la adición de un resto de Leu entre el resto ala 61 y el resto asp 71 de la toxina natural (véase la FIG. 2). La secuenciación del ADN del plásmido confirmó el marco de lectura y la eliminación neta de 24 codones (que codifican ocho restos de aminoácidos).

EJEMPLO 2

CONSTRUCCIÓN DE CPERF001 RECOMBINANTE DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

La versión eliminada del gen *plc* construido en el Ejemplo 1 se introdujo en *C. perfringens* utilizando la siguiente estrategia. El vector de homología 1162-55.20 se denomina "plásmido suicida" de *C. perfringens* debido a que se ha eliminado su origen de replicación de *C. perfringens*.

Cuando este plásmido se transforma en *C. perfringens*, es incapaz de replicarse y no sobrevive. Sin embargo si la bacteria transformada se coloca bajo selección con cloranfenicol y/o eritromicina, se puede forzar que el ADN plásmido se recombine en el genoma bacteriano mediante homología con el gen *plc*. La bacteria recombinante resultante se denomina un integrante. El integrante contenía una copia del vector de homología introducido que se integró en el locus del gen *plc*. De esta manera, el integrante resultante contenía dos copias del gen *plc*, la copia formal original, y la versión eliminada introducida. Los genes de resistencia introducidos se localizaron entre las dos copias del gen *plc*. Cuando se eliminó la selección por antibiótico del integrante, se produjo la recombinación entre las dos copias del gen *plc*. Este episodio de recombinación puede producir uno de dos resultados. En ambos casos, se ha eliminado el ADN que interviene entre las dos copias del gen *plc* (incluyendo los genes de resistencia). En el primer resultado, se restauró el gen *plc* normal, dando como resultado una recuperación de la cepa progenitora original. En el segundo resultado, el gen *plc* normal esta sustituido por la copia eliminada, produciendo la construcción eliminadora de la toxina *alfa* deseada. Debido a que la toxina *alfa* de la cepa eliminadora está inactivada, esta cepa no era hemolítica. Por tanto se identificó el integrante eliminador deseado cribando los clones no hemolíticos en placas de agar sangre.

Debido a que se esperaba que el episodio de recombinación que da como resultado el integrante deseado se produjera a una frecuencia baja, un aspecto crítico fue el empleo de cepas de *C. perfringens* progenitoras que tenían una elevada eficacia de transformación. De este modo, se analizaron algunos aislados recientes de *C. perfringens* de aves para establecer la eficacia de la transformación. Se transformaron los aislados con el plásmido lanzadera pJIR418 tal como describen Allen y Blaschek (Applied and Environmental Microbiology 54. 2322 (1988)) con ligeras modificaciones (descritas a continuación). La cepa 1240 presentó la eficacia de transformación más elevada (véase la Tabla 1), $9,2 \times 10^6$ transformaciones/ μ g de pJIR418 de ADN plásmido. Se seleccionó esta cepa para que fuera la cepa progenitora de la construcción de la CPERF001 eliminadora. Se seleccionó la cepa 29 para que fuera la cepa progenitora de CPERF002.

Tabla 1
Eficacia de transformación de aislados de *C. perfringens* de aves

Cepa A de <i>C. perf.</i> A	Transformantes/ μ g de pJIR418
29	$3,6 \times 10^4$
23	$5,6 \times 10^2$
1220	$4,0 \times 10^8$
1240	$9,2 \times 10^6$
CP-2	Ninguno
1230	$7,1 \times 10^3$
5227	Ninguno
5230	Ninguno
La fuente de las cepas anteriormente relacionados fue el Dr J. Glenn Songer Dept. of Veterinary Sciences and Microbiology, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721	

Se diluyeron células de la cepa 1240 de *C. perfringens* procedentes de un cultivo anaerobio durante la noche en medio TSYC (30 g/l de caldo tríptico de soja, 5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de cisteína) 1:25 y se hicieron crecer hasta $A_{600} = 0,5436$. Después de la centrifugación de 100 ml de células a $18.000 \times g$ durante 10 minutos, se

prepararon células electrocompetentes volviendo a suspender dos veces las células en un volumen igual de tampón de fosfato de sacarosa magnesio reducido ("SMP" se preparó como sacarosa 270 mM, MgCl₂ 1 mM, NaPO₄ 7 mM, pH 7,3) seguido por una resuspensión con 0,5 ml de SMP. Esto dio como resultado un volumen final de ~ 2,0 ml.

- 5 Se sometieron a electroporación alícuotas de 100 µl de células con 4 µg del plásmido 1162-55.20 en cubetas de 0,2 cm. Se utilizó un Bio-Rad Gen Pulser II a 1,37 kilovoltios, 100 ohmios de resistencia y 50 microfaradios de capacitancia. Inmediatamente después de la electroporación, se diluyeron las células con 2,0 ml de medio triptico de soja levadura cisteína prerreducido ("TSYC" se preparó como 30 g de caldo triptico de soja, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de cisteína, 950 ml de agua) y se incubó durante tres horas a 37° C en una jarra anaerobia. Tras el periodo de recuperación, se plaquearon las diluciones de las células on TSYC + 25 µg/ml de placas de cloranfenicol. Se incubaron estas placas a 37° C durante la noche en una jarra anaerobia.

Tras el crecimiento durante la noche, se observó un promedio de 50 colonias resistentes al cloranfenicol por microgramo de ADN de 1162-55.20. Las colonias individuales de siete presuntos integrantes se hicieron crecer en medio TSYC no selectivo durante cuatro rondas sucesivas de crecimiento y se plaquearon en placas de agar sangre no selectivo. Una de las reservas no seleccionadas, 1192-31.7, presentó algunas colonias no hemolíticas. Veintiuna de estas colonias no hemolíticas se dividieron en placas maestras no selectivas y las réplicas se plaquearon en placas de TSYC + cloranfenicol. Dos de las colonias fueron sensibles al cloranfenicol.

20 Uno de los presuntos eliminadores sensibles al cloranfenicol, 1192-32.14 se hizo crecer junto con la cepa 1240 natural y el integrante 1192-31.7 y se plaqueó en placas de agar sangre. La cepa 1240 natural mostró zonas transparentes de beta hemolisis mientras que el eliminador 1192-32.14 fue un cultivo puro de colonias no hemolíticas y se renombró CPERF001.

25 Se utilizaron otras placas de agar sangre como maestras y se plaquearon las réplicas en medio no selectivo y selectivo. La cepa 1240 natural y CPERF001 fueron sensibles al cloranfenicol y a la eritromicina. El integrante, 1192-31.7, fue resistente al cloranfenicol y a la eritromicina tal como se esperaba.

30 Para descartar la posibilidad de que genes resistentes a antibióticos estuvieran presentes, pero no se expresaran en CPERF001, se sintetizaron cebadores específicos de la PCR para los genes del cloranfenicol y la eritromicina a usar en reacciones de la PCR. Se prepararon los ADN genómicos a partir de la cepa natural, el integrante y las cepas CPERF001 y se usaron como moldes para las reacciones de la PCR con los cebadores del gen resistente al antibiótico. Los resultados del análisis de la PCR mostraron respuestas positivas procedentes solo del plásmido suicida y el integrante y no de la cepa 1240 progenitora o de la CPERF001 eliminadora. Esto confirma la pérdida prevista de las secuencias del gen de la resistencia.

40 Para confirmar la eliminación en el gen de la toxina alfa, se amplificó mediante la PCR una región de 1086 pb de la región que rodeaba la eliminación utilizando los cebadores adecuados específicos de la toxina *alfa*. El fragmento amplificado se clonó y se secuenció. Los resultados de la secuenciación confirmaron la eliminación de los nueve aminoácidos desde tyr 62 a trp 70 del gen de la toxina *alfa* y la inserción de una única Leu (véanse las FIG. 2A-2C).

45 Se evaluó CPERF001 para determinar la expresión de la proteína inactivada del toxoide *alfa*. Después de 6 horas de crecimiento anaerobio, se recogieron alícuotas de 1 ml de células y se centrifugaron. Se analizaron quince microlitros de medio sobrenadante no concentrado mediante electroforesis en gel de poliácridamida y se sometieron al análisis de transferencia Western con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la proteína de la toxina *alfa* recombinante (Vaccine 11(12): 1253-1258 (1993)). Los resultados mostraron reactividad específica del anticuerpo con una proteína del tamaño esperado de la proteína del toxoide *alfa*.

50 CPERF001 es una cepa de *Clostridium perfringens* de Tipo A eliminadora diseñada mediante ingeniería genética. Esta cepa sepa secreta una forma de toxoide inactivado de la toxina *alfa* de *C. perfringens*. Debido a que esta cepa ya no expresa la toxina *alfa* activa pero retiene aún una porción significativa de la antigenicidad de la toxina, será útil como vacuna para proteger contra la enfermedad producida por *C. perfringens*.

EJEMPLO 3

55

Construcción de CPERF002 recombinante de *Clostridium perfringens*

60 Con el fin de compensar la baja eficacia de transformación de la cepa 29 de *C. perfringens* (véase la Tabla 1, *más arriba*) se construyó un nuevo vector de homología. El nuevo vector incorporaba secuencias de *C. perfringens* clonadas directamente a partir del genoma de la cepa 29. Se realizó una predicción de que el resultado daría una etapa de recombinación más eficaz. El nuevo vector fue 1192-38.3, creado como sigue.

65 En la primera etapa, la región de replicación de *E. coli* y los genes de resistencia de *C. perfringens* se clonaron a partir del plásmido lanzadera pJIR418 (Sloan y col, Plasmid 27, 207 (1992); Genebank M77169). El plásmido pJIR418 se digirió con el enzima de restricción NdeI. La ligadura del fragmento grande produjo el plásmido 1192-23.1. Este plásmido carece de un origen de replicación de *C. perfringens*, pero a diferencia del plásmido 1162-45.1,

que se construyó en el Ejemplo 1, retiene el sitio de clonación múltiple completo de pJIR418.

En la siguiente etapa, la mitad del extremo C del gen *plc* se subclonó en el plásmido intermedio 1192-23.1. Se usó el ADN genómico de la cepa 29 como molde para una PCR de intervalo largo. Se amplificó la región del gen *plc* (toxina alfa) del sitio Bam HI mediante una porción del gen CPE0038. El cebador *plc* en la dirección 5', 5' CTGGGATCCTGATACAGATAATAATTCTCAAAGGAT 3' (SEC ID N°: 18) corresponde a los nucleótidos 48880-48916 de la cepa 13 (Genbank NC 003366). El cebador en la dirección 3' en el gen CPE0038, 5' actctgcagTTGTCATATCAATTAATACTATAATCCC 3' (SEC ID N°: 19) es complementario con los nucleótidos 51244-51275 de la cepa 13 y contiene nucleótidos flanqueantes que incluyen un sitio de restricción Pst I (minúsculo). Se obtuvo un producto de 2402 pares de bases que se digirió con las enzimas de restricción Bam HI y Pst I. Este fragmento se ligó con el fragmento grande de Bam HI y Pst I digirió 1192-23.1 para producir el plásmido 1192-36.10.

En la etapa final, la mitad del extremo N del gen *plc* se clonó mediante la PCR. El cebador en la dirección 5', 5' actgagctcCTAGACACTTTGCTTCAATATTTGGGAA 3' (SEC ID N°: 20) corresponde a los nucleótidos 46513-46540 de la cepa 13 e incluye los nucleótidos flanqueantes y un sitio Sac I (minúsculo). El cebador en la dirección 3', 5' actggatccGCATTCTTATCATAATCTGGATAAGTAGAACC 3' (SEC ID N°: 21) es complementario con los nucleótidos 48824-48855 de la cepa 13 e incluye nucleótidos flanqueantes y un sitio Bam HI. Se produjo un producto de 2363 pares de bases que se digirió con los enzimas de restricción Sac I y Bam HI. El fragmento digerido se ligó con el fragmento grande de Sac I y Bam HI digirió 1192-36.10 para producir el plásmido 1192-38.3. La posterior secuenciación de la región flanqueante del sitio Bam HI de *plc* en 1192-36 confirmó la eliminación de nueve aminoácidos desde tyr 62 a trp 70.

Se usó el plásmido 1192-38.3 para electroporar células de la cepa 29 de *C. perfringens*. Se había demostrado anteriormente que la cepa 29 se transformaba con una eficacia de $3,6 \times 10^4$ transformantes/ μ g de ADN del plásmido pJIR418. Se hicieron crecer células de la cepa 29 y se sometieron a electroporación como en el Ejemplo 2 con la excepción de que se usó una técnica de selección en medio líquido después de las tres horas del periodo de recuperación. En vez de plaquear, se diluyeron alícuotas de 0,67 ml en 12 ml de TSYC + 25 μ g/ml de cloranfenicol y se hicieron crecer durante la noche a 37° C en una jarra anaerobia. Se utilizó esta modificación debido a las bajas eficacias de transformación y plaqueo de la cepa 29 frente a la cepa 1240. Tras el crecimiento durante la noche, se diluyeron las células de nuevo en medio de selección. A continuación se pasaron las células de la segunda ronda de crecimiento cinco veces sin selección antes de plaquear en placas de agar sangre. Ninguna de las colonias procedentes de placas de agar sangre fueron no hemolíticas. A continuación se plaquearon por replicado dos placas de agar sangre en TSYC, placas de TSYC + 25 μ g/ml de cloranfenicol y TSYC + 50 μ g de eritromicina. Todas las colonias fueron sensibles a la eritromicina pero solo una de las 130 colonias fue sensible al cloranfenicol. Esta colonia, 1192-45.4B, se renombró CPERF002. El análisis de la PCR del ADN genómico de CPERF002 con cebadores específicos de la toxina alfa mostró una banda positiva para la toxina *alfa*. Esta banda fue más pequeña que la banda correspondiente de ADN de la cepa 29 natural. Los cebadores específicos para los genes de resistencia al cloranfenicol y la eritromicina fracasaron en amplificar el ADN de CPERF002 pero mostraron fuertes bandas positivas procedentes del plásmido 1192-38.3. La secuenciación de la toxina alfa de CPERF002 confirmó la eliminación de los nueve aminoácidos (véase la FIG. 3).

Se evaluó CPERF002 para determinar la expresión de la proteína del toxoide alfa inactivada. Después de 6 horas de crecimiento anaerobio, se recogieron alícuotas de 1 ml de células y se centrifugaron. Se analizaron quince microlitros de medio sobrenadante no concentrado mediante electroforesis en gel de poliácridamida y se sometieron al análisis por transferencia Western con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la proteína de la toxina *alfa* recombinante (Vaccine 11: 1253 (1993)). Los resultados mostraron reactividad específica contra el anticuerpo con una proteína del tamaño esperado de la proteína del toxoide *alfa*.

CPERF002 es una cepa eliminadora de *C. perfringens* de Tipo A diseñada mediante ingeniería genética. Esta cepa secreta una forma toxoide inactivada de la toxina alfa de *C. perfringens*. Debido a que esta cepa ya no expresa la toxina alfa activa, y retiene además una porción significativa de la antigenicidad de la toxina, será útil como vacuna para proteger contra la enfermedad producida por *C. perfringens*.

EJEMPLO 4

Vacunas eliminadoras de *C. perfringens*

Las cepas de vacuna eliminadora CPERF001 y CPERF002 descritas en los ejemplos 2 y 3 se evaluaron con respecto a su capacidad de proporcionar protección contra el estímulo de *C. perfringens* de tipo natural. La primera parte del estudio se diseñó para determinar si la administración de las cepas de vacuna viva tenía algún efecto adverso sobre la capacidad de incubación de los huevos con embrión. La asignación de grupos experimentales y los resultados de seguridad se han descrito en las Tablas 2.

TABLA 2
RESULTADOS DE SEGURIDAD

Grupo*	Vacuna {dosis}**	Número de huevos incubados (%)
1	CPERF001 (0,8 x 10 ⁻²) ^x	18 (90%)
2	CPERF001 (0,8 x 10 ⁻³)	17 (85%)
3	CPERF001 (0,8 x 10 ⁻⁴)	11 (55%)
4	CPERF001 (0,8 x 10 ⁻⁵)	16 (80%)
5	CPERF002 (1,9 x 10 ⁻²)	16 (80%)
6	CPERF002 (1,9 x 10 ⁻³)	17 (85%)
7	CPERF002 (1,9 x 10 ⁻⁴)	14 (70%)
8	CPERF002 (1,9 x 10 ⁻⁵)	12 (60%)
9	Cepa 1240 (1,5 x 10 ⁻³)	16 (80%)
10	Cepa 29 (3,7 x 10 ⁻⁵)	13 (65%)
11	Controles de los medios	19 (95%)
12	Controles no inoculados	18 (90%)

* 20 huevos por grupo
 ** Dosis de 100 µl proporcionadas *in ovo* a los 18 desde la formación del embrión (IM)
 X El título por dosis se mide como Unidades formadoras de colonias (ufc")

5 A la dosis de 10³ o menos, la capacidad de incubación de estos grupos no fue significativamente inferior a la observada en el grupo inoculado solamente con medio (grupo 11) o el grupo no inoculado (grupo 12). A la dosis inferior, CPERF001 mostró la misma capacidad de incubación que el control de los medios, y mejor que el grupo de control no inoculado.

10 Puesto que las dosis más elevadas de eliminadores pueden tener un efecto adverso sobre la capacidad de incubación de los huevos, solo los dos grupos con la dosificación inferior de cada eliminador se incluyeron en la parte de eficacia del estudio. Estos grupos, junto con las aves del control de medios (grupo 11), se sometieron a estímulo con la cepa CP6 de *C. perfringens* (tipo natural), que fue administrada por vía oral a aproximadamente 10⁸ ufc/ave cuando las aves tenían 20, 21 y 22 días de edad. Todas las aves se sometieron a necropsia a los 25 días de edad y las lesiones del intestino delgado se puntuaron con la escala de puntuación para la enteritis necrosante que se resume a continuación.

0 Puntuación	Enteritis necrosante 1+	Enteritis necrosante 2+	Enteritis necrosante 3+	Enteritis necrosante 4+
No hay grandes lesiones NE en el intestino delgado; el intestino tiene una elasticidad normal (se enrolla sobre sí mismo tras abrirse).	Pared intestinal delgada y flácida (el intestino permanece plano cuando se abre y no se enrolla sobre sí mismo en posición normal); mucus espeso o en exceso que cubre la membrana mucosa o leve enrojecimiento focal o multifocal de la mucosa o congestión de los vasos serosos.	Una única o pocas áreas multifocales de enrojecimiento e hinchazón de la pared intestinal; una única o pocas zonas multifocales de ulceración y necrosis de la mucosa intestinal.	Extensas zonas multifocales de necrosis y ulceración de la mucosa intestinal ± hemorragia significativa o capa de fibrina o restos necróticos en la superficie de la mucosa (aspecto de toalla de felpa).	Animal muerto con grandes lesiones NE con una puntuación 2+ o superior.

Puntuación con modificaciones menores de acuerdo con el Dr. Charles Hofacre, D.V.M., M.A.M., University of Georgia, Poultry Diagnostic and Research Center, 953 College Station Road, Athens, GA 30602

20 Cinco (5) aves del grupo del control sin vacunar (no estimulados) se sometieron a necropsia al término del estudio para confirmar que no hubo exposición a *C. perfringens* durante el curso del estudio. Los resultados se representan en la Tabla 3

TABLA 3

GRUPOS DE TRATAMIENTO PARA PROTECCIÓN*				RESULTADOS	
Grupo*	Vacuna	Dosis para vacuna <i>In-ovo</i> (ufc)	Días de edad al estímulo con <i>C. perfringens</i>	N	Promedio
1	CPERF001	1x10 ²	20, 21 y 22	9	0,67
2	CPERF001	1x10 ³	20, 21 y 22	13	0,46

GRUPOS DE TRATAMIENTO PARA PROTECCIÓN*				RESULTADOS	
Grupo*	Vacuna	Dosis para vacuna <i>In-ovo</i> (ufc)	Días de edad al estímulo con <i>C. perfringens</i>	N	Promedio
5	CPERF002	1x10 ²	20, 21 y 22	12	1,33
6	CPERF002	1x10 ³	20, 21 y 22	12	1,08
11	Control de los medios	Ninguno	20, 21 y 22	15	1,80
12	Ninguno	Ninguno	No estimulado	5	0,00
*necropsia a los 25 días de edad					

Cada una de las puntuaciones de los Grupos 1 y 2 fue significativamente inferior de forma estadística en comparación con los Grupos 11 (Prueba de la Suma de Rangos Exactos de Wilcoxon $p \geq 0,2177$). Se llevó a cabo una estimación de la eficacia de la vacuna de acuerdo con el procedimiento descrito por David Siev [Journal of Modern Applied Statistical Methods Vol. 4, Nº 2, 500-508 (2005)]. Se estimó la eficacia de la vacuna en la reducción de la gravedad de la enfermedad en un 54% para el Grupo 1, 65% para el Grupo 2, 20% para el Grupo 5 y 27% para el Grupo 6 cuando se comparó con el Grupo 11.

EJEMPLO 5

Construcción de una cepa eliminadora de *C. perfringens* de porcino

Se usaron las estrategias utilizadas en los ejemplos 1 y 2, *más arriba*, para construir mutantes de eliminación de la toxina *alfa* procedentes de cepas de *C. perfringens* de porcino. Inicialmente, los aislados en el campo procedentes de porcinos enfermos se sometieron a electroporación con el plásmido pJIR418 para evaluar su transformabilidad. Los aislados dieron como resultado $\geq 10^4$ transformantes por microgramo de ADN plásmido y, puesto que son susceptibles tanto al cloranfenicol como a la eritromicina, son candidatos para la eliminación.

El ADN genómico de las cepas candidatas se utilizó como molde para una PCR de intervalo largo del gen *plc* (toxina *alfa*) y las secuencias flanqueantes. Tras la subclonación de los productos de la PCR, el gen de la toxina *alfa* y se secuenciaron las regiones flanqueantes y se cartografió la restricción. Se sintetizaron nuevos cebadores de oligonucleótidos con los sitios de restricción flanqueantes y se clonaron los productos de dos amplificaciones separadas en el plásmido suicida 1192-23.1 para crear la eliminación de 27 pares de bases como en el Ejemplo 1.

El vector suicida de porcino se sometió a electroporación en la cepa de *C. perfringens* de porcino correspondiente y los mutantes de la eliminación se aislaron utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 2, *más arriba*. Se confirmaron los mutantes de eliminación por la ausencia de beta hemólisis en las placas de agar sangre y mediante la secuenciación del ADN del gen de la toxina *alfa*.

Esta construcción es una cepa eliminadora de *C. perfringens* de Tipo A diseñada mediante ingeniería genética. Esta cepa secreta una forma toxoide inactivada de la toxina *alfa* de *C. perfringens*. Debido a que esta cepa ya no expresa la toxina *alfa* activa y retiene además una significativa porción de la antigenicidad de la toxina, es útil como vacuna para proteger al ganado porcino frente a las enfermedades producidas por *C. perfringens*.

DEPÓSITO BIOLÓGICO

Se han depositado cultivos de los siguientes materiales biológicos en el siguiente depositario internacional:

American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209, EE.UU. bajo condiciones que satisfacen el Tratado de Budapest con respecto al Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a Fines del Procedimiento de Patente.

Organismo	Nº de Acceso	Fecha del Depósito
<i>Clostridium perfringens</i> CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-054	PTA7364	7 de febrero de 2006
<i>Clostridium perfringens</i> CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-053	PTA7365	7 de febrero de 2006

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cochran, Mark Lair, Steven Synenki, Richard Petersen, Gary

<120> ORGANISMOS CLOSTRIDIUM ATENUADOS Y VACUNA RECOMBINANTE

<130> AH06175

<150> 60/792.553
<151> 17-04-2006

5 <160> 23

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
<211> 398
<212> PRT
<213> Cepa 13 de *Clostridium perfringens*

<400> 1

```

Met Lys Arg Lys Ile Cys Lys Ala Leu Ile Cys Ala Thr Leu Ala Thr
 1           5           10           15

Ser Leu Trp Ala Gly Ala Ser Thr Lys Val Tyr Ala Trp Asp Gly Lys
          20           25           30

Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr Gln Gly Val Ser
 35           40           45

Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser Lys Asn Glu Pro Glu Ser Val Arg Lys
 50           55           60

Asn Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asn Met His Glu Leu Gln Leu Gly Ser
 65           70           75           80

Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His
          85           90           95

Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asp Asn Asn Phe Ser Lys Asp Asn Ser Trp
          100          105          110

Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser Gln Ile Arg Lys
          115          120          125

Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly Asn Tyr Lys Gln
          130          135          140

Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe Gly Asp Ile Asp
          145          150          155          160

```

15

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

<210> 2
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Cepa 13 de *Clostridium perfringens*

<400> 2

```

atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctacgc tagcaactag cctatgggct    60
ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaagattg atggaadagg aactcatgct    120
atgattgtaa ctcaaggggt ttcaatctta gaaatgacg tgcctaaaaa tgaaccagaa    180
agtgtaagaa aaaacttaga gattttaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct    240
acttatccag attatgataa gaatgcatac gatctatata aagatcattt ctgggaccc    300
gatacagata ataattcttc aaaggataat agttgggtatt tagcttattc tatacctgac    360
acaggggaat cacaataaag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga    420
aactataaac aagctacatt ctatcttggg gagggctatgc actattttgg agatatagat    480
actccataac atcctgctaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagttgaa    540
acttttgcag aggaaagaaa agaacagtat aaaataaaca cagcagggtg caaaactaat    600
gaggattttt atgctgatat cttaaaaaac aaggatttta atgcatgggc aaaagaatat    660
gcaagagggt ttgctaaaac aggaaaatca atatactata gtcctgctag catgagtcac    720
agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaca    780
gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga    840
aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca    900
gatgactaca tgtattttgg aatcaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg    960
gacaacccag gaaatgattt tatgactgga agtaaagaca cttatacttt caaattaaaa   1020
gatgaaaatc taaaaattga tgatatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca   1080
gcattcccag atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaatgg aaaagttgta   1140
gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa     1197

```

<210> 3

<211> 370

<212> PRT

<213> Cepa 13 de *Clostridium perfringens*

<400> 3

```

Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr
 1          5          10          15

Gln Gly Val Ser Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser Lys Asn Glu Pro Glu
          20          25          30

Ser Val Arg Lys Asn Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asn Met His Glu Leu
          35          40          45

Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu
          50          55          60

Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asp Asn Asn Phe Ser Lys
          65          70          75          80

```

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

Ala Tyr Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ile Ala Asn Gly Lys Val Val
340 345 350

Val Asp Lys Asp Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly Asn Ser Thr Tyr Asn
355 360 365

Ile Lys
370

5 <210> 4
<211> 39
<212> ADN
<213> Oligonucleótido

10 <400> 4
aacgcctatg atctatatca agatcatttc tgggacct 39

15 <210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Oligopéptido

<400> 5

Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro
1 5 10

20 <210> 6
<211> 14
<212> ADN
<213> Oligonucleótido

25 <400> 6
aatgcattgg atcc 14

30 <210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Oligopéptido

<400> 7

35 Asn Ala Leu Asp
1

40 <210> 8
<211> 15
<212> ADN
<213> Oligonucleótido

<400> 8
aatgcattgg atcct 15

45 <210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Oligopéptido

50 <400> 9

Asn Ala Leu Asp Pro
1 5

ES 2 401 810 T3

5	<210> 10 <211> 14 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
	<400> 10 aatgcggatc cagt	14
10	<210> 11 <211> 4 <212> PRT <213> Oligopéptido	
15	<400> 11	
		Asn Ala Asp Pro
		1
20	<210> 12 <211> 12 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
25	<400> 12 aatgcggatc ct	2
30	<210> 13 <211> 4 <212> PRT <213> Oligopéptido	
	<400> 13	
		Asn Ala Asp Pro
		1
35	<210> 14 <211> 26 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
40	<400> 14 agctgcataa gcaaaagttc caactc	26
45	<210> 15 <211> 33 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
50	<400> 15 gcagaaactc ttcttagacc tattcttta ggc	33
55	<210> 16 <211> 32 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
	<400> 16 ggatccagct gcataagcaa aagttccaac tc	32
60	<210> 17 <211> 41 <212> ADN <213> Oligonucleótido	

	<400> 17 ggatccaatg cattcttatc ataatctgga taagtagaac c	41
5	<210> 18 <211> 37 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
10	<400> 18 ctgggacatc gatacagata ataattctc aaaggat	37
15	<210> 19 <211> 40 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
20	<400> 19 actctgcagt tgcataatc attaaattaa ctataatccc	40
25	<210> 20 <211> 37 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
	<400> 20 actgagctcc tagacacttt gcttcaatat ttgggaa	37
30	<210> 21 <211> 41 <212> ADN <213> Oligonucleótido	
35	<400> 21 actggatccg cattcttatc ataatctgga taagtagaac c	41
40	<210> 22 <211> 1197 <212> ADN <213> Cepa CP6 de <i>Clostridium perfringens</i>	
	<400> 22	

```

atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctgcgc tagcaactag cctatgggct    60
ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaaaattg atggaacagg aactcatgct    120
atgattgtaa ctcaaggggt ttcaactcta gaaatgatac tgtctaaaaa tgaaccagaa    180
agtgtaaaga aaaacttaga gattttaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct    240

acttatccag attatgataa gaacgcctat gatctatata aagatcattt ctgggatcct    300
gatacagata ataatttctc aaaggataat agttggcatt tagcttattc tatacctgac    360
acaggggaat cacaataag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga    420
aactataaac aagctacatt ctatcttggg gaggctatgc actattttgg agatatagat    480
actccatata atcctgctaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagtttgag    540
acttttgcag aggaagaaa agaacagtat aaaaataaca cagcaggttg caaaactaat    600
gaggattttt atgctgatat cttaaaaaac aaagatttta atgcatgggc aaaagaatat    660
gcaagagggt ttgctaaaac aggaatatca atatactata gtcatgctag catgagtcac    720
agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaca    780
gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga    840
aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca    900
gatgactaca tgtatttttg aatcaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg    960
gacaacccag gaaatgattt tatgactgga agtaagaca cttatacttt caaattaaaa   1020
gatgaaatc taaaaattga tgatatacaa aatattgtga ttagaaaaag aaaatatata   1080
gcattcccag atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaatgg aaaagttgta   1140
gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa     1197

```

<210> 23

<211> 398

<212> PRT

<213> Cepa CP6 de *Clostridium perfringens*

<400> 23

Met	Lys	Arg	Lys	Ile	Cys	Lys	Ala	Leu	Ile	Cys	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr
1				5					10					15	
Ser	Leu	Trp	Ala	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys	Val	Tyr	Ala	Trp	Asp	Gly	Lys
			20					25					30		
Ile	Asp	Gly	Thr	Gly	Thr	His	Ala	Met	Ile	Val	Thr	Gln	Gly	Val	Ser
		35					40					45			
Ile	Leu	Glu	Asn	Asp	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Pro	Glu	Ser	Val	Arg	Lys
	50					55				60					
Asn	Leu	Glu	Ile	Leu	Lys	Glu	Asn	Met	His	Glu	Leu	Gln	Leu	Gly	Ser
65					70					75					80
Thr	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Asp	Lys	Asn	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Gln	Asp	His
				85					90					95	
Phe	Trp	Asp	Pro	Asp	Thr	Asp	Asn	Asn	Phe	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Trp
			100					105						110	

Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser Gln Ile Arg Lys
 115 120 125
 Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly Asn Tyr Lys Gln
 130 135 140
 Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe Gly Asp Ile Asp
 145 150 155 160
 Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp Ser Ala Gly His
 165 170 175
 Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu Gln Tyr Lys Ile
 180 185 190
 Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr Ala Asp Ile Leu
 195 200 205
 Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr Ala Arg Gly Phe
 210 215 220
 Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala Ser Met Ser His
 225 230 235 240
 Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr Leu Ala Asn Ser
 245 250 255
 Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu His Asp Val Ser
 260 265 270
 Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val Gly Lys Asn Val Lys Glu Leu Val Ala
 275 280 285
 Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu Lys Asp Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Met
 290 295 300
 Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys Asp Gly Lys Thr Gln Glu Trp Glu Met
 305 310 315 320
 Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr
 325 330 335
 Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn Leu Lys Ile Asp Asp Ile Gln Asn Met
 340 345 350
 Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Pro Asp Ala Tyr Lys Pro
 355 360 365

Glu Asn Ile Lys Ile Ile Ala Asn Gly Lys Val Val Val Asp Lys Asp
370 375 380

Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly Asn Ser Thr Tyr Asn Ile Lys
385 390 395

LISTADO DE SECUENCIAS

- | | |
|----|--|
| 5 | <110> Cochran, Mark D
Petersen, Gary R
Lair, Stephen V
Synenki, Richard M |
| 10 | <120> Organismos Clostridium atenuados y vacuna recombinante

<130> AH06175WO |
| 15 | <140> PCT/US2007/009135
<141> 12-04-2007

<150> US 60/792.553
<151> 17-04-2006 |
| 20 | <160> 23

<170> PatentIn versión 3.4 |
| 25 | <210> 1
<211> 398
<212> PRT
<213> Cepa 13 de <i>Clostridium perfringens</i> |
| 30 | <400> 1 |

ES 2 401 810 T3

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

Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp Ser Ala Gly His
165 170 175

Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu Gln Tyr Lys Ile
180 185 190

Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr Ala Asp Ile Leu
195 200 205

Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr Ala Arg Gly Phe
210 215 220

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

Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr Leu Ala Asn Ser
245 250 255

Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu His Asp Val Ser
260 265 270

Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val Gly Lys Asn Val Lys Glu Leu Val Ala
275 280 285

Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu Lys Asp Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Met
290 295 300

Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys Asp Gly Lys Thr Gln Glu Trp Glu Met
305 310 315 320

Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr
325 330 335

Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn Leu Lys Ile Asp Asp Ile Gln Asn Met
340 345 350

Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Pro Asp Ala Tyr Lys Pro
355 360 365

Glu Asn Ile Lys Ile Ile Ala Asn Gly Lys Val Val Val Asp Lys Asp
370 375 380

Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly Asn Ser Thr Tyr Asn Ile Lys
385 390 395

<210> 2

<211> 1197

<212> ADN

<213> Cepa 13 de *Clostridium perfringens*

<400> 2

atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctacgc tagcaactag cctatgggct	60
ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaagattg atggaacagg aactcatgct	120
atgattgtaa ctcaaggggt ttcaatctta gaaaatgatc tgtccaaaaa tgaaccagaa	180
agtgtaagaa aaaactraga gatTTTtaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct	240
acttatccag attatgataa gaatgcatat gatctatatac aagatcattt ctgggacct	300
gatacagata ataatttctc aaaggataat agttgggtatt tagcttattc tatacctgac	360
acaggggaat cacaataag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga	420
aactataaac aagctacatt ctatcttgggaggctatgc actatttttg agatatagat	480
actccatatac atcctgctaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagtttgaa	540
acttttgtag aggaaagaaa agaacagtat aaaataaaca cagcagggtt caaaactaat	600
gaggattttt atgctgatat cttaaaaaac aaggatttta atgcatgggc aaaagaatat	660
gcaagagggt ttgctaaaac aggaaaatca atatactata gtcattgctag catgagtcac	720
agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaca	780
gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga	840
aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca	900
gatgactaca tgtatttttg aatcaaaaac aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg	960
gacaaccag gaaatgattt tatgactgga agtaaagaca cttatacttt caaattaaaa	1020
gatgaaaatc taaaaattga tgatatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca	1080
gcattcccag atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaattg aaaagttgta	1140
gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa	1197

<210> 3

<211> 370

<212> PRT

<213> Cepa 13 de *Clostridium perfringens*

<400> 3

ES 2 401 810 T3

Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Val Ser Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser Lys Asn Glu Pro Glu
 20 25 30
 Ser Val Arg Lys Asn Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asn Met His Glu Leu
 35 40 45
 Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu
 50 55 60
 Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asp Asn Asn Phe Ser Lys
 65 70 75 80
 Asp Asn Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser
 85 90 95

Gln Ile Arg Lys Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly
 100 105 110
 Asn Tyr Lys Gln Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe
 115 120 125
 Gly Asp Ile Asp Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp
 130 135 140
 Ser Ala Gly His Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu
 145 150 155 160
 Gln Tyr Lys Ile Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr
 165 170 175
 Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr
 180 185 190
 Ala Arg Gly Phe Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala
 195 200 205
 Ser Met Ser His Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr
 210 215 220
 Leu Ala Asn Ser Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu
 225 230 235 240
 His Asp Val Ser Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val Gly Lys Asn Val Lys
 245 250 255
 Glu Leu Val Ala Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu Lys Asp Ala Gly Thr
 260 265 270
 Asp Asp Tyr Met Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys Asp Gly Lys Thr Gln
 275 280 285
 Glu Trp Glu Met Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys
 290 295 300
 Asp Thr Tyr Thr Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn Leu Lys Ile Asp Asp
 305 310 315 320
 Ile Gln Asn Met Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Pro Asp
 325 330 335
 Ala Tyr Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ile Ala Asn Gly Lys Val Val
 340 345 350
 Val Asp Lys Asp Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly Asn Ser Thr Tyr Asn
 355 360 365

Ile Lys
370

5 <210> 4
<211> 39
<212> ADN
<213> *Clostridium perfringens*

10 <400> 4
aacgcctatg atctatatca agatcatttc tgggaccc 39

15 <210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> *Clostridium perfringens*

<400> 5

Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro
1 5 10

20 <210> 6
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Sintetizado químicamente

30 <400> 6
aatgcattgg atcc 14

35 <210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos contenida/insertada en una proteína después de una delección. Se puede sintetizar químicamente

40 <400> 7

Asn Ala Leu Asp
1

45 <210> 8
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> sintetizado químicamente

<400> 8
aatgcattgg atcct 15

55 <210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos contenida/insertada en una proteína después de una delección. Se puede sintetizar químicamente

<400> 9

5

Asn Ala Leu Asp Pro
1 5

<210> 10

<211> 14

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

15

<400> 10

aatgcggatc cagt 14

<210> 11

<211> 4

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> Secuencia de aminoácidos contenida/insertada en una proteína después de una delección. Puede ser sintetizado químicamente

<400> 11

Asn Ala Asp Pro
1

30

<210> 12

<211> 12

<212> ADN

35

<213> Artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

40

<400> 12

aatgcggatc ct 12

<210> 13

<211> 4

45

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50

<223> Secuencia de aminoácidos contenida/insertada en una proteína después de una delección. Se puede sintetizar químicamente

<400> 13

Asn Ala Asp Pro
1

55

<210> 14

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

60

<220>

<223> sintetizado químicamente

	<400> 14 agctgcataa gcaaaagttc caactc	26
5	<210> 15 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> sintetizado químicamente	
	<400> 15 gcagaaactc ttcttagacc tattctttta ggc	33
15	<210> 16 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> sintetizado químicamente	
	<400> 16 ggatccagct gcataagcaa aagttccaac tc	32
25	<210> 17 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sintetizado químicamente	
	<400> 17 ggatccaatg cattcttatc ataatctgga taagtagaac c	41
35	<210> 18 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> sintetizado químicamente	
	<400> 18 ctgggatcct gatacagata ataatttctc aaaggat	37
45	<210> 19 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintetizado químicamente	
	<400> 19 actctgcagt tgtcatatca attaaattaa ctataatccc	40
55	<210> 20 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sintetizado químicamente	
65	<220> <223> sintetizado químicamente	

ES 2 401 810 T3

	<400> 20 actgagctcc tagacacttt gcttcaatat ttgggaa	37
5	<210> 21 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintetizado químicamente	
	<400> 21 actggatccg cattcttctc ataactctgga taagtagaac c	41
15	<210> 22 <211> 1197 <212> ADN <213> Cepa CP6 de <i>Clostridium perfringens</i>	
20	<400> 22	
	atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctgcgc tagcaactag cctatgggct	60
	ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaaaattg atggaacagg aactcatgct	120
	atgattgtaa ctcaaggggt ttcaatctta gaaaatgac tgtctaaaaa tgaaccagaa	180
	agtgtagaagaa aaaacttaga gattttaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct	240
	acttatccag attatgataa gaacgcctat gatctatatc aagatcattt ctgggaccc	300
	gatacagata ataatttctc aaaggataat agttgggtatt tagcttattc tatacctgac	360
	acaggggaat cacaaataag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga	420
	aactataaac aagctacatt ctatcttggg gaggtctatgc actattttgg agatatagat	480
	actccatata atcctgctaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagtttgag	540
	acttttgcag aggaaagaaa agaacagtat aaaataaaca cagcagggtg caaaactaat	600
	gaggattttt atgctgatat cttaaaaaac aaagatttta atgcatgggtc aaaagaatat	660
	gcaagagggt ttgctaaaac aggaaaatca atatactata gtcattgctag catgagtc	720
	agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaca	780
	gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga	840
	aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca	900
	gatgactaca tgtattttgg aatcaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg	960
	gacaacccag gaaatgattt tatgactgga agtaaagaca cttatacttt caaattaaaa	1020
	gatgaaaatc taaaaattga tgatatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca	1080
	gcattcccag atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaatgg aaaagttgta	1140
	gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa	1197
25	<210> 23 <211> 398 <212> PRT <213> Cepa CP6 de <i>Clostridium perfringens</i> <400> 23	

Met Lys Arg Lys Ile Cys Lys Ala Leu Ile Cys Ala Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Trp Ala Gly Ala Ser Thr Lys Val Tyr Ala Trp Asp Gly Lys
 20 25 30
 Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr Gln Gly Val Ser
 35 40 45
 Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser Lys Asn Glu Pro Glu Ser Val Arg Lys
 50 55 60
 Asn Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asn Met His Glu Leu Gln Leu Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His
 85 90 95
 Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asp Asn Asn Phe Ser Lys Asp Asn Ser Trp
 100 105 110
 Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser Gln Ile Arg Lys
 115 120 125
 Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly Asn Tyr Lys Gln
 130 135 140
 Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe Gly Asp Ile Asp
 145 150 155 160
 Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp Ser Ala Gly His
 165 170 175
 Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu Gln Tyr Lys Ile
 180 185 190
 Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr Ala Asp Ile Leu
 195 200 205
 Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr Ala Arg Gly Phe
 210 215 220
 Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala Ser Met Ser His
 225 230 235 240
 Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr Leu Ala Asn Ser
 245 250 255

ES 2 401 810 T3

Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu His Asp Val Ser
260 265 270

Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val Gly Lys Asn Val Lys Glu Leu Val Ala
275 280 285

Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu Lys Asp Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Met
290 295 300

Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys Asp Gly Lys Thr Gln Glu Trp Glu Met
305 310 315 320

Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr
325 330 335

Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn Leu Lys Ile Asp Asp Ile Gln Asn Met
340 345 350

Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Pro Asp Ala Tyr Lys Pro
355 360 365

Glu Asn Ile Lys Ile Ile Ala Asn Gly Lys Val Val Val Asp Lys Asp
370 375 380

Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly Asn Ser Thr Tyr Asn Ile Lys
385 390 395

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina alfa de *Clostridium perfringens*, en la que la muteína de la toxina alfa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos 9 restos de aminoácidos consecutivos que van de Tyr₆₂ a Trp₇₀.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica una muteína en la que dichos nueve aminoácidos consecutivos eliminados están sustituidos dichos por un único resto de leucina.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 2, en la que están eliminados los nucleótidos 288-294 de la molécula de ácido nucleico.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que los nucleótidos eliminados están sustituidos por una secuencia de nucleótidos que codifica un único resto de Leu.
5. Una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina alfa de *Clostridium perfringens*, en la que la muteína de la toxina alfa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 menos nueve restos de aminoácidos consecutivos que van de Tyr₆₂ a Trp₇₀.
6. La muteína sustancialmente no tóxica de la toxina alfa de *Clostridium perfringens* de la reivindicación 5, en la que dichos nueve restos de aminoácidos consecutivos están eliminados y sustituidos por un único resto de Leu.
7. Un organismo *Clostridium perfringens* atenuado sustancialmente no tóxico construido integrando la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en un cromosoma de un organismo *Clostridium perfringens* no atenuado.
8. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 7, en el que la molécula de ácido nucleico está localizada en una posición en el cromosoma que es homóloga a la locación de una molécula de ácido nucleico que codifica una toxina alfa natural presente en el *Clostridium perfringens* no atenuado.
9. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 7 o de la reivindicación 8 que es un *Clostridium perfringens* de tipo A.
10. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en el que el *Clostridium perfringens* no atenuado a partir del cual se construyó el anterior fue aislado de un animal hospedador que es bien un mamífero o un ave.
11. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 10, en el que dicho mamífero se selecciona entre el grupo que consiste en un bovino, ovino, y porcino.
12. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 10 en el que dicha ave es un pollo, un pavo, un ganso, un pato, un cisne, una paloma, un pichón, un urogallo, o una perdiz.
13. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido no de *Clostridium perfringens*.
14. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 13 en el que dicho polipéptido no de *Clostridium perfringens* es un polipéptido no bacteriano.
15. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 14 en el que el polipéptido no bacteriano es un polipéptido de ave o de mamífero.
16. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 15 en el que el polipéptido no bacteriano es un polipéptido de ave.
17. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 15 en el que el polipéptido no bacteriano es una citoquina.
18. El organismo *Clostridium perfringens* atenuado de la reivindicación 17 en el que la citoquina es IL-18 de pollo.
19. Un *Clostridium perfringens* atenuado tal como se define en las anteriores reivindicaciones 7-18 para uso como una vacuna en un procedimiento para inducir inmunidad a enfermedades producidas por infecciones con *Clostridium perfringens* en un animal, en el que dicho *Clostridium perfringens* atenuado se administra en una dosis inmunológicamente eficaz.

20. El *Clostridium perfringens* atenuado para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la vacuna es para administración mediante las rutas oral, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, o intranasal.
- 5 21. El *Clostridium perfringens* atenuado para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la vacuna se reparte en el alimento del animal.
22. El *Clostridium perfringens* atenuado para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la vacuna es para la administración como una pulverización sobre los animales para proporcionar la administración oral.
- 10 23. Un organismo *Clostridium perfringens* que es CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-054 que tiene el N° de Depósito PTA7364 de la ATCC.
24. Un organismo *clostridium perfringens* que es CPERF/ $\Delta\alpha$ Toxin 365-053 que tiene el N° de depósito PTA7365 de la ATCC.
- 15 25. Una vacuna que comprende el organismo *Clostridium perfringens* atenuado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-18, 23, o 24.
- 20 26. La vacuna de la reivindicación 25 que comprende además uno o más de los siguientes: un tampón farmacológicamente aceptable, un excipiente, o un adyuvante.
27. Un pienso animal que comprende la vacuna de la reivindicación 25 o 26.

FIG. 1

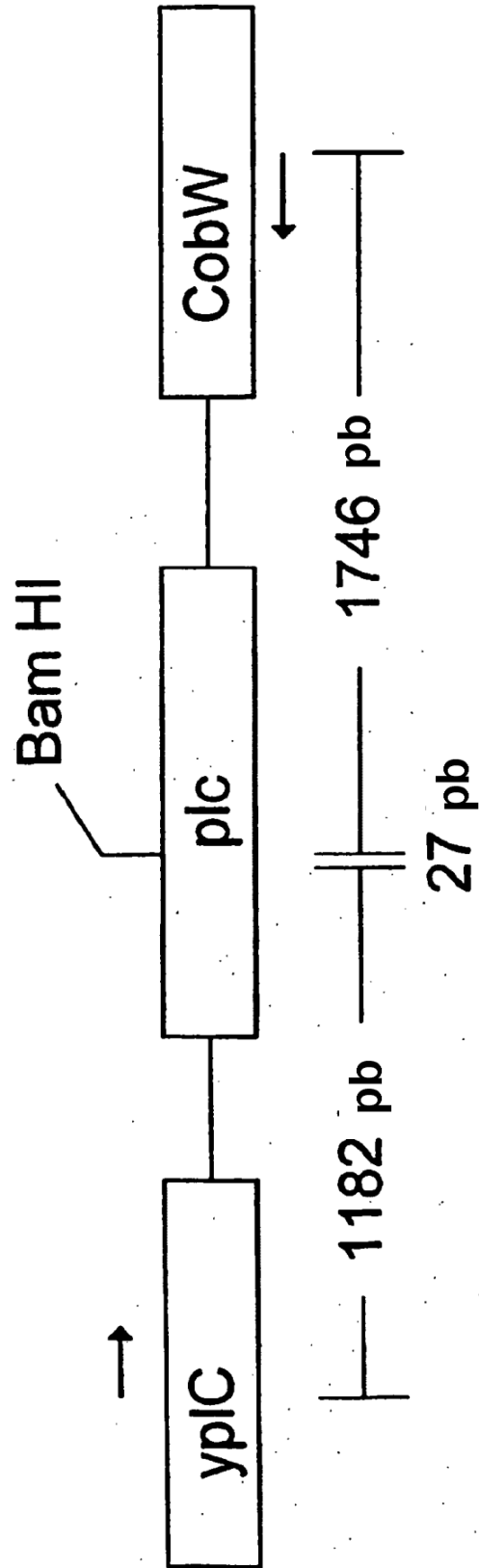


FIG. 2A

SECID N°: 4 -AAC GCC TAT GAT CTA TAT CAA GAT CAT TTC TGG GAT CCT-
 SECID N°: 5 -Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro-

FIG. 2B

SECID N°: 6 -AAT GCa ttg gat cc
 SECID N°: 7 -Asn Ala Leu Asp

FIG. 2C

SECID N°: 8 -AAT GCA TTG GAT CCT-
 SECID N°: 9 -Asn Ala Leu Asp Pro-

FIG. 3A

SEC ID N°: 4 -AAC GCC TAT GAT CTA TAT CAA GAT CAT TTC TGG GAT CCT-
 SEC ID N°: 5 -Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro-

FIG. 3B

SEC ID N°: 10 -AAT GCG gat cca gt
 SEC ID N°: 11 -Asn Ala Asp Pro

FIG. 3C

SEC ID N°: 12 -AAT GCG GAT CCT-
 SEC ID N°: 13 -Asn Ala Asp Pro-