

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 685**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/33** (2006.01)  
**A61K 39/40** (2006.01)  
**C12R 1/145** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**A61K 39/08** (2006.01)  
**C12N 15/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08756897 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2164862**

54 Título: **Toxina clostridial NetB**

30 Prioridad:

**08.06.2007 US 942858 P**

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

**11.11.2015**

73 Titular/es:

**AUSTRALIAN POULTRY CRC PTY LTD (100.0%)  
Building W21, Geography Road, University of  
New England  
Armidale, New South Wales 2351, AU**

72 Inventor/es:

**MOORE, ROBERT JOHN;  
ROOD, JULIAN IAN y  
KEYBURN, ANTHONY LESLIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 550 685 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

Toxina clostridial NetB

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una nueva toxina. La invención se refiere además a composiciones inmunogénicas que comprenden la toxina y métodos para vacunar animales, por ejemplo pollos, de modo que sean menos susceptibles a enfermedades clostridiales.

**Antecedentes de la invención**

10 El género *Clostridium* consiste en bacilos gram positivos, anaerobios, formadores de esporas. El hábitat natural de estos organismos es el ambiente y los tractos intestinales de seres humanos y otros animales. A pesar de la identificación de aproximadamente 100 especies de *Clostridium*, solamente se ha reconocido un pequeño número como agentes etiológicos de importancia médica y veterinaria. No obstante, estas especies se asocian con enfermedades graves, incluyendo botulismo, tétanos, celulitis anaerobia, gangrena gaseosa, bacteremia, colitis pseudomembranosa y gastroenteritis clostridial.

15 *Clostridium perfringens* es el agente etiológico para numerosas enfermedades clostridiales halladas en animales domésticos económicamente valiosos. La enteritis necrótica (EN) es un ejemplo de una enfermedad entérica clostridial causada por *C. perfringens*. La enteritis necrótica conduce al desarrollo de lesiones necróticas en la pared intestinal dando como resultado morbilidad y mortalidad de las aves de corral. También es una enfermedad multifactorial con epidemiología y patogénesis compleja y parcialmente desconocida (Kaldhusdal, 1999). La bacteria, *C. perfringens* se encuentra habitualmente en el tracto gastrointestinal de aves de corral (Tschirdewahn *et al.*, 1991), la aparición de enteritis necrótica, sin embargo, es esporádica (Cowen *et al.*, 1987). No obstante, el pienso contaminado con *C. perfringens* se ha implicado en brotes de enteritis necrótica en pollos (Kaldhusdal, 1999). Los estudios han mostrado también que los pollos sanos tiene un número relativamente bajo de *C. perfringens* en sus tractos gastrointestinales, mientras que un aumento en la concentración de las bacterias puede dar como resultado una afección de enteritis necrótica (Craven *et al.*, 1999).

25 Se cree que la enteritis necrótica clínica se produce cuando *C. perfringens* prolifera a altos números en el intestino delgado y produce toxinas extracelulares que dañan el intestino. La toxina principal que se cree que está implicada es la toxina alfa, pero su papel preciso en el proceso de enfermedad no se entiende completamente. Keyburn *et al.*, Infection and Immunity, 2006, p 6496-6500 indica que la toxina alfa no es un factor de virulencia esencial en la patogénesis de enteritis necrótica en pollos. La toxina alfa es una metaloenzima de cinc secretada que tiene actividad tanto fosfolipasa C como esfingomielinasa y es la toxina principal implicada en la patogénesis de la gangrena gaseosa humana (Awad, *et al.*, 1995; Songer, 1997). Los cinco tipos de toxina de *C. perfringens* (A a E) portan y expresan el gen estructural de toxina alfa, *plc*.

Hasta la fecha, no se ha identificado ninguna otra toxina como un factor de virulencia esencial en la enteritis necrótica.

**35 Sumario de la invención**

Los presentes inventores han identificado una nueva toxina clostridial. Los inventores han nombrado a este polipéptido NetB.

En consecuencia, la presente invención proporciona un polipéptido sustancialmente purificado o recombinante, en el que el polipéptido comprende:

- 40 i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEC ID N°: 2,
- ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 2 y/o
- iii) un fragmento antigénico de i) o ii); en el que i), ii) y iii) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria contra la secuencia de aminoácidos como se proporciona en la SEC ID N°: 2.

En una realización, el polipéptido tiene actividad de toxina.

45 En otra realización, el polipéptido tiene actividad de toxina reducida en comparación con un polipéptido codificado por SEC ID N°: 2.

En una realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEC ID N°: 2.

50 En una realización, el polipéptido puede purificarse a partir de una bacteria del género *Clostridium*. Preferentemente, el polipéptido puede purificarse a partir de *Clostridium perfringens*.

En otra realización de la presente invención, el polipéptido es un toxoide.

En otra realización más, el polipéptido es una proteína de fusión que comprende al menos otra secuencia polipeptídica.

5 El al menos otro polipéptido puede ser, por ejemplo, un polipéptido que potencia la estabilidad de un polipéptido de la presente invención, o un polipéptido que ayuda en la purificación de la proteína de fusión, o un polipéptido que potencia las propiedades inmunológicas del polipéptido de la presente invención.

En otra realización más, el polipéptido de la invención es un polipéptido sintético.

La presente invención proporciona además un polinucleótido aislado y/o recombinante que comprende:

i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEC ID N°: 1,

10 ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención, y/o

iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 1, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEC ID N°: 2.

La presente invención proporciona además un vector que comprende el polinucleótido de la invención.

15 Preferentemente, el polinucleótido en el vector se une operativamente con un promotor.

En una realización, el vector es un vector viral o un vector plasmídico.

La presente invención proporciona además una célula hospedadora que comprende el polipéptido recombinante de la invención, el polinucleótido recombinante de la invención y/o el vector de la invención.

20 Las células hospedadoras de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos un polipéptido de la presente invención, e incluyen células animales, vegetales, bacterianas, fúngicas (incluyendo levadura), parasitarias y de artrópodos.

Preferentemente, la célula hospedadora es una bacteria.

En una realización, la bacteria es *E. coli*. En una realización más preferida, la bacteria es *E. coli* seleccionada de CCEC22, CCEC31 y CCEC59.

25 La presente invención proporciona además un método para producir un polipéptido de acuerdo con la invención, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la invención, o un vector de la invención que codifica dicho polipéptido, en condiciones que permitan la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido y aislar dicho polipéptido.

30 La presente invención proporciona además un anticuerpo sustancialmente purificado o fragmento del mismo, que se une específicamente con un polipéptido de la invención.

La presente invención proporciona además una composición que comprende el polipéptido de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula hospedadora de la invención y/o el anticuerpo de la invención.

En una realización, la composición es una composición inmunogénica.

35 En una realización, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además una vacuna que comprende un antígeno, en la que el antígeno comprende un polipéptido de acuerdo con la invención.

40 En una realización, la vacuna comprende un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la vacuna comprende además uno o más antígenos adicionales.

La presente invención proporciona además una vacuna de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, en el que tras la administración a un sujeto el polipéptido se expresa y se produce una respuesta inmunitaria al polipéptido.

45 Se desvela en la presente memoria una bacteria atenuada que produce un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3, en la que la bacteria produce una cantidad reducida del polipéptido en comparación con una bacteria de tipo silvestre y/o tiene actividad de toxina reducida en comparación con el polipéptido en una bacteria de tipo silvestre.

Se desvela en la presente memoria que en algunas situaciones la bacteria atenuada no expresa el polipéptido.

5 Se desvela en la presente memoria que en algunas situaciones la bacteria atenuada se ha modificado adicionalmente para expresar un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo puede ser, por ejemplo, un polipéptido biológicamente activo o un antígeno. Los ejemplos de polipéptidos biológicamente activos incluyen citocinas, factores de crecimiento y enzimas. El antígeno puede ser, por ejemplo, de un agente de enfermedad bacteriano, fúngico, parasitario o viral.

Se desvela en la presente memoria que en algunas situaciones la bacteria atenuada pertenece al género *Clostridium*. Se desvela en la presente memoria que en algunas situaciones la bacteria es *Clostridium perfringens*.

10 La presente invención proporciona además un método para atenuar un método para atenuar la virulencia de una bacteria que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 2, comprendiendo el método mutar una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido para reducir la expresión y/o actividad de toxina del polipéptido, por lo que la bacteria atenuada tiene actividad de toxina reducida en comparación con la bacteria no atenuada.

15 Se desvela en la presente memoria un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto el polipéptido de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la composición de la invención, la vacuna de la invención, la célula hospedadora de la invención y/o la bacteria de la invención.

Se desvela en la presente memoria que en algunas situaciones la célula hospedadora o la bacteria está viva.

20 Se desvela en la presente memoria que en algunas situaciones el polipéptido, polinucleótido, composición, vector, célula hospedadora o bacteria se suministra en el huevo.

La presente invención proporciona además un método para determinar si un sujeto se ha expuesto a un patógeno que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 2, en el que el método comprende determinar la presencia o ausencia del polipéptido en una muestra obtenida del sujeto, en el que la presencia del polipéptido es indicativa de exposición al patógeno.

25 La presente invención proporciona además un método para determinar si un sujeto se ha expuesto a un patógeno que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 2, en el que el método comprende determinar la presencia o ausencia de anticuerpos en la muestra que se unen específicamente con un polipéptido de acuerdo con la invención, en el que la presencia de los anticuerpos es indicativa de exposición al patógeno.

30 La presente invención proporciona además un método para determinar si un sujeto se ha expuesto a un patógeno que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 1, en el que el método comprende determinar la presencia o ausencia del polinucleótido en una muestra obtenida del sujeto, en el que la presencia del polinucleótido es indicativa de exposición al patógeno.

35 Puede usarse cualquier técnica adecuada para determinar la presencia o ausencia del polinucleótido. Por ejemplo, la presencia o ausencia del polinucleótido puede detectarse por hibridación, por ejemplo por transferencia de Southern, o por amplificación del polinucleótido, por ejemplo por PCR.

En una realización el patógeno es del género *Clostridium*. En una realización preferida el patógeno es *Clostridium perfringens*.

En una realización de los métodos de la invención, el sujeto es aviar.

40 Preferentemente, el sujeto es un ave de corral. Por ejemplo, el sujeto puede ser un pollo, pavo, faisán, codorniz, pato, avestruz u otra ave de corral criada habitualmente en cantidades comerciales.

En una realización más preferida, el sujeto es un pollo.

45 Se desvela en la presente memoria un método para explorar con respecto a un agonista o antagonista que modula la actividad de un polipéptido de la invención, comprendiendo el método poner en contacto el polipéptido de la invención con un compuesto candidato, y determinar si dicho compuesto aumenta o reduce la actividad de toxina del polipéptido de la invención. En una realización, el compuesto es un antagonista. Preferentemente, el compuesto es un anticuerpo.

Se desvela en la presente memoria un método para ensayar una muestra con respecto a actividad de toxina, comprendiendo el método:

50 (a) dividir una muestra que se sospecha que contiene un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en al menos primera y segunda submuestras,

- (b) poner en contacto la primera submuestra con un antagonista de un polipéptido de acuerdo con la invención y
- (c) determinar si las primera y segunda submuestras tienen actividad de toxina,

en el que la ausencia de actividad de toxina en la primera submuestra y presencia de actividad de toxina en la segunda muestra es indicativa de la presencia de un polipéptido que es al menos 40% idéntico a SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3.

5 Se desvelan en la presente memoria que en algunas situaciones la etapa (c) comprende incubar de forma independiente las primera y segunda submuestras con células animales en condiciones, y durante un periodo, suficientes para que el polipéptido ejerza un efecto citopático y determinar la presencia o ausencia de un efecto citopático en las células.

10 La presente invención proporciona además pienso y/o bebida que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Se desvela en la presente memoria el uso del pienso y/o bebida de la invención para reducir la infección y/o colonización de un animal por una bacteria que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3.

15 La presente invención proporciona además un organismo transgénico no humano que comprende un polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de acuerdo con la invención. Preferentemente, el organismo transgénico no humano es una planta.

La presente invención proporciona además un alimento y/o bebida que comprende el polipéptido de la invención.

20 Preferentemente, el polipéptido induce una respuesta inmunitaria contra un patógeno bacteriano cuando el organismo transgénico no humano y/o el alimento y/o la bebida se administran por vía oral a un sujeto. El patógeno bacteriano puede ser del género *Clostridium*, por ejemplo, *Clostridium perfringens*. Preferentemente, el sujeto es aviar, por ejemplo, un pollo, pavo o pato.

25 Como se entenderá por los expertos en la materia, el organismo transgénico no humano y/o el alimento y/o la bebida de la invención podrían usarse para administrar el polipéptido de la invención a un sujeto, de modo que se induzca una respuesta inmunitaria contra el polipéptido en el sujeto.

Se desvela en la presente memoria un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el polipéptido de la invención, comprendiendo el método administrar por vía oral al sujeto el organismo transgénico no humano de la invención y/o el pienso y/o la bebida de la invención.

30 Se desvela en la presente memoria un método para proporcionar inmunidad pasiva a la descendencia de un ave hembra, comprendiendo el método administrar el polipéptido de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula hospedadora de la invención, la composición de la invención, la vacuna de la invención, la bacteria atenuada de la invención, el organismo transgénico no humano de la invención y/o el alimento y/o la bebida de la invención al ave hembra antes de que el ave hembra ponga huevos que comprendan la descendencia, por lo que se proporciona a la descendencia inmunidad pasiva a una bacteria que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3.

35 La presente invención proporciona además uso del polipéptido de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la composición de cualquiera de la invención, la vacuna de la invención, la célula hospedadora de la invención, la bacteria de la invención y/o el alimento y/o la bebida de la invención en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

40 Se desvela en la presente memoria el uso del polipéptido de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la composición de la invención, la vacuna de la invención, la célula hospedadora de la invención, la bacteria de la invención, el animal transgénico no humano de la invención y/o el alimento o la bebida de la invención como un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

45 Como resultará evidente, los elementos y características preferidos de un aspecto de la invención son aplicables a muchos otros aspectos de la invención.

50 A lo largo de la presente memoria descriptiva la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa indicado, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

La invención se describe en lo sucesivo en la presente memoria por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a las Figuras adjuntas.

**Breve descripción de los dibujos adjuntos**

**Figura 1.** Alineamiento de ClustalW de NetB y toxina beta de *C. perfringens*; "\*" significa que los restos o nucleótidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en el alineamiento; ":" significa que se han observado sustituciones conservadas; "." significa que se observan sustituciones semiconservadas.

5 **Figura 2.** Diagrama esquemático de la región cromosómica de NE18- $\Delta netB$ . Los mutantes de *netB* se construyeron por intercambio alélico usando un plásmido suicida que contenía un gen *netB* inactivado por inserción con aproximadamente 2 kb de ADN homólogo en uno de los lados del gen y se introdujo en EHE-NE18.

10 **Figura 3.** Ensayo de citotoxicidad de sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* EHE-NE18 en células LMH. a. Medio de cultivo de TPG (puro); b. Sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* EHE-NE18 (dilución 1:16); c. Sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* JIR325 (Cepa 13 - cepa de enteritis no necrótica) (dilución 1:2); sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* NE18-M1 (mutante de plc) (dilución 1:16).

15 **Figura 4.** Ensayo de citotoxicidad de derivados negativos de *netB* del sobrenadante de cultivo de EHE-NE18 en células LMH. a. Sobrenadante de cultivo de EHE-NE18 (dilución 1:16); b. Sobrenadante de cultivo de *netB1* con NE18 suprimido (dilución 1:2); c. Sobrenadante de cultivo de *netB1* con NE18 suprimido + pJIR1457 (plásmido lanzadera) (dilución 1:2); d. Sobrenadante de cultivo de *netB1* con NE18 suprimido + pALK20 (plásmido de complementación de *netB*) (dilución 1:16); e. Medio de cultivo de TPG (puro); f. NetB recombinante purificado en columna (dilución 1:8).

20 **Figura 5.** Ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa de células LMH tratadas con NetB. Se midió LDH liberado en el sobrenadante como un indicador de citolisis con un kit de Cyto-Tox (Promega) y se proporcionó como un porcentaje de citotoxicidad. Cada dilución se realizó por triplicado y se calculó el ETM para cada dilución.

**Figura 6.** Exploración por PCR de cepas de *C. perfringens* EN y no EN con respecto a la presencia de *netB*. a. Cepas EN; b. Cepas no EN.

25 **Figura 7.** Estudio de transferencia de Western con respecto a la presencia de proteína en una diversidad de cepas de *C. perfringens* (EN y no EN). Análisis de transferencia de Western de cepas EN y cepas no EN de *C. perfringens* que se exploran con respecto a expresión de NetB. Se cultivaron cepas de *C. perfringens* en medio TPG hasta alcanzar una DO600 nm de 0,6 y los sobrenadantes de cultivo se separaron por SDS-PAGE. Las proteínas separadas se transfirieron a membrana de PDVF y se exploraron con antisero de rNetB de conejos. Los paréntesis indican cepas de *C. perfringens* EN y no EN.

30 **Figura 8.** Análisis de transferencia de Western de sueros de pollos vacunados con NetB. Carril 1: marcador de peso molecular (patrón preteñido Plus2 SeeBlue® de Invitrogen); Carriles 2-14: suero de aves vacunadas N° 1-N° 13.

**Clave del listado secuencias**

SEC ID N°: 1 - Secuencia de nucleótidos que codifica la toxina NetB de *Clostridium perfringens*.

SEC ID N°: 2 - Secuencia de aminoácidos madura de toxina NetB de *Clostridium perfringens*.

35 SEC ID N°: 3 - Secuencia de aminoácidos de toxina NetB de *Clostridium perfringens* incluyendo la secuencia de péptido señal.

SEC ID N°: 4 - Secuencia de aminoácidos de toxina beta de *Clostridium perfringens*.

SEC ID N°: 5 a 10 - Cebadores oligonucleotídicos.

**Descripción detallada de la invención****Técnicas generales y definiciones**

40 A no ser que se definan específicamente de otro modo, se interpretará que todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la técnica (por ejemplo, microbiología, cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

45 A no ser que se indique de otro modo, la proteína recombinante, el cultivo celular, las técnicas microbiológicas e inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen y explican a lo largo de la bibliografía en fuentes tales como J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D. M. Glover y B. D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F. M. Ausubel *et al.*, (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las

50

actualizaciones hasta la actualidad), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J. E. Coligan *et al*, (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad), y se incorporan en la presente memoria por referencia.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un animal, por ejemplo, un ave o mamífero. En una realización preferida, el sujeto es un ave, por ejemplo un pollo. En otra realización, el sujeto es un ser humano. Otras realizaciones preferidas incluyen animales de compañía tales como gatos y perros, así como animales de granja tales como caballos, vacas, ovejas y cabras.

- 10 El término “aves” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier especie, subespecie o raza de un organismo de la clase taxonómica Aves, tales como, pero sin limitación, organismos tales como pollo, pavo, pato, ganso, codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y ratites incluyendo avestruz, emú y casuarios. El término incluye las diversas cepas conocidas de *Gallus gallus*, o pollos (por ejemplo, White Leghorn, Brown Leghorn, Barred Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Cornish, Minorca, Amrox, California Gray, Italian Partidge colored), así como cepas de pavos, faisanes, codornices, patos, avestruces y otras aves de corral criadas  
15 habitualmente en cantidades comerciales.

- Como se usa en la presente memoria “actividad de toxina” se refiere a la capacidad de un polipéptido o péptido (por ejemplo toxina NetB) para matar, o provocar un efecto citopático en, células animales. En algunos casos puede ser deseable que un polipéptido tenga actividad de toxina reducida en comparación con toxina NetB. La reducción de la actividad de toxina es preferentemente de al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99%. La reducción en la actividad de  
20 toxina puede medirse, por ejemplo, como una reducción en el efecto citopático.

- Las expresiones “efecto citopático” o “CPE” como se usan en el presente documento describen cambios en la estructura celular como resultado de la actividad de una toxina celular (es decir, un efecto patológico). Los efectos citopáticos comunes incluyen la destrucción celular, el redondeo celular, la formación de sincitios (es decir, células gigantes fusionadas), formación de vacuolas y formación de cuerpos de inclusión. El CPE resulta de acciones de  
25 una toxina en células que afectan negativamente a la capacidad de las células para realizar sus funciones requeridas para permanecer viables. En sistemas de cultivo celular *in vitro*, el CPE es evidente cuando las células, como parte de una monocapa confluyente, muestra regiones de ausencia de confluencia después de contacto con una muestra que contiene una toxina. Los efectos citopáticos son fácilmente discernibles y distinguibles por los expertos en la materia.

- 30 Como se usa en la presente memoria el término “toxóide” se refiere a cualquier toxina al menos parcialmente inactivada pero no se pretende que limite de ningún modo los medios particulares de inactivar una toxina para producir un toxóide. Dichas tecnologías de inactivación incluyen: (i) métodos químicos que modifican la toxina intacta, por ejemplo tratamiento con formaldehído o glutaraldehído; (ii) métodos físicos tales como calentamiento, (iii) métodos enzimáticos que alternan la toxina, tales como una proteasa que escinde la toxina en fragmentos; (iv)  
35 métodos recombinantes, tales como ingeniería genética del gen de la toxina para retirar o alterar regiones enzimáticas de la toxina, pero que conservan uno o más epitopos antigénicos.

La expresión “tipo silvestre” como se usa en la presente memoria en relación con bacterias se refiere a bacterias de origen natural que producen un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 40% idéntica, más preferentemente al menos 90% idéntica a SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 que tiene actividad de toxina.

- 40 Como se usa en la presente memoria los términos “tratando”, “tratar” o “tratamiento” incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, polinucleótido, vector, célula hospedadora, composición, vacuna y/o bacteria atenuada de la invención suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma de la enfermedad provocada por infección con una bacteria que expresa un polipéptido que tiene actividad de toxina.

- 45 El término “prevenir” se refiere a proteger a un sujeto que puede estar expuesto a una bacteria de desarrollar al menos un síntoma resultante de la infección y/o colonización por la bacteria, o reducir la gravedad de un síntoma de la infección y/o colonización en un sujeto expuesto a las bacterias.

### **Polipéptidos/péptidos**

- Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan en general indistintamente y se refieren a una única cadena polipeptídica que puede modificarse o no por la adición de grupos no aminoácidos. Se entendería que dichas cadenas polipeptídicas pueden asociarse con otros polipéptidos o proteínas u otras moléculas tales como cofactores. Los términos “proteínas” y “polipéptidos” como se usa en el presente documento también incluyen  
50 variantes, mutantes, fragmentos biológicamente activos, modificaciones, análogos y/o derivados de los polipéptidos descritos en la presente memoria.

- Por “polipéptido sustancialmente purificado” o “polipéptido aislado” se entiende un polipéptido que se ha separado en general de los lípidos, ácidos nucleicos, otros péptidos y otras moléculas contaminantes con las que se asocia en su estado nativo. Preferentemente, el polipéptido sustancialmente purificado es al menos 60% libre, más preferentemente al menos 75% libre y más preferentemente al menos 90% libre de otros componentes con los que

se asocia en la naturaleza.

El término "recombinante" en el contexto de un polipéptido se refiere al polipéptido cuando se produce por una célula, o en un sistema de expresión sin células, en una cantidad alterada o a una velocidad alterada en comparación con su estado nativo. En una realización la célula es una célula que no produce de forma natural el polipéptido. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprenda un gen no endógeno que provoque la producción de una cantidad alterada, preferentemente aumentada, del polipéptido. Un polipéptido recombinante de la invención incluye polipéptidos que no se han separado de otros componentes de la célula transgénica (recombinante), o un sistema de expresión sin células, en el que se produce, y los polipéptidos producidos en dichas células o sistemas sin células que se purifican posteriormente de al menos algunos otros componentes.

El % de identidad de un polipéptido se determina por análisis de GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización de creación de hueco=5, y una penalización de extensión de hueco=0,3. La secuencia de consulta es de al menos 15 aminoácidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 15 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 50 aminoácidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 15 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 50 aminoácidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 100 aminoácidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos. Aún más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 250 aminoácidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 250 aminoácidos. Más preferentemente, las dos secuencias se alinean sobre su longitud completa.

Con respecto a un polipéptido definido, se apreciará que las cifras de % de identidad mayores que las proporcionadas anteriormente abarcarán realizaciones preferidas. Por lo tanto, cuando sea aplicable, a la luz de las cifras de % de identidad mínimas, se prefiere que el polipéptido comprenda una secuencia de aminoácidos que sea al menos 80%, más preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 91%, más preferentemente al menos 92%, más preferentemente al menos 93%, más preferentemente al menos 94%, más preferentemente al menos 95%, más preferentemente al menos 96%, más preferentemente al menos 97%, más preferentemente al menos 98%, más preferentemente al menos 99%, más preferentemente al menos 99,1%, más preferentemente al menos 99,2%, más preferentemente al menos 99,3%, más preferentemente al menos 99,4%, más preferentemente al menos 99,5%, más preferentemente al menos 99,6%, más preferentemente al menos 99,7%, más preferentemente al menos 99,8% y aún más preferentemente al menos 99,9% idéntica a la SEC ID N° nominada relevante.

Pueden prepararse mutantes de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico de la presente invención, o por síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Dichos mutantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de restos dentro de la secuencia de aminoácidos. Puede realizarse una combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que el producto peptídico final posea las características deseadas.

Pueden prepararse polipéptidos mutantes (alterados) usando cualquier técnica adecuada conocida en este campo. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede someterse a mutagénesis *in vitro*. Dichas técnicas de mutagénesis *in vitro* incluyen subclonación del polinucleótido en un vector adecuado, transformación del vector en una cepa "de mutación" tal como la *E. coli* XL-1 red (Stratagene) y propagación de las bacterias transformadas para un número adecuados de generaciones. En otro ejemplo, los polinucleótidos de la invención se someten a técnicas de barajado de ADN como se describe en general en Harayama (1998). Estas técnicas de barajado de ADN pueden incluir genes que codifican toxinas relacionados con los de la presente invención, tales como los de bacterias distintas de *Clostridium perfringens*. Los productos derivados de ADN mutado/alterado pueden explorarse fácilmente usando técnicas descritas en la presente memoria para determinar si poseen actividad de toxina.

Al diseñar mutantes de secuencia de aminoácidos, la localización del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la característica o las características para modificar. Los sitios para mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, (1) sustituyendo en primer lugar con elecciones de aminoácidos conservativas y después con selecciones más radicales dependiendo de los resultados conseguidos, (2) suprimiendo el resto diana o (3) insertando otros restos adyacentes al sitio localizado.

Las deleciones de secuencia de aminoácidos varían generalmente de aproximadamente 1 a 15 restos, más preferentemente de aproximadamente 1 a 10 restos y típicamente de aproximadamente 1 a 5 restos contiguos.

Los mutantes de sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula polipeptídica retirado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen sitios identificados como el sitio o los sitios activos. Otros sitios de interés son en los que restos particulares obtenidos de diversas cepas o especies son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. Estos sitios, especialmente los que quedan dentro de una secuencia de al menos otros tres sitios idénticamente conservados, se sustituyen preferentemente de una manera relativamente conservativa. Dichas sustituciones

conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “sustituciones ejemplares”.

**Tabla 1 - Sustituciones ejemplares.**

Resto Original	Sustituciones Ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

5 También se describen en el presente documento fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos de la presente invención. Como se usa en el presente documento un “fragmento biológicamente activo” es una parte de un polipéptido de la invención que mantiene una actividad definida del polipéptido de longitud completa. Los fragmentos biológicamente activos pueden ser de cualquier tamaño siempre que mantengan la actividad definida. Preferentemente, el fragmento biológicamente activo mantiene al menos 10% de la actividad de la proteína de longitud completa. Como se conocerá por el destinatario experto, se conocen en este campo técnicas para identificar un fragmento biológicamente activo de un polipéptido. Por ejemplo, un fragmento del polipéptido de la invención puede ensayarse en un ensayo adecuado para determinar si el fragmento tiene actividad de toxina, por ejemplo determinando si el fragmento es capaz de inducir un efecto citopático en una célula. En una realización, el fragmento biológicamente activo es de al menos 100 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 110 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 120 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 130 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 140 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 150 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 175 aminoácidos de longitud, o más preferentemente 200 o más aminoácidos de longitud.

20 Los términos “antígeno” y “antigénico” se entienden bien en la técnica y se refieren a la parte de una macromolécula que se reconoce específicamente por un componente del sistema inmunitario, por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de antígenos de linfocitos T. El término “antígeno” se refiere a un péptido, un polipéptido, u otra macromolécula para la que puede inducirse una respuesta inmunitaria en un hospedador. Por lo tanto, la invención incluye un fragmento antigénico de un polipéptido de la invención. El fragmento antigénico es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un patógeno bacteriano, por ejemplo una bacteria del género *Clostridium* incluyendo,

pero sin limitación, *Clostridium perfringens*. En una realización, el antígeno es un epítipo del polipéptido de la invención. En una realización, el fragmento antigénico es de 6 aminoácidos de longitud, más preferentemente 7 aminoácidos de longitud, más preferentemente 8 aminoácidos de longitud, más preferentemente 9 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 10 aminoácidos de longitud. Como alternativa el fragmento antigénico es de al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de longitud. En una realización, el antígeno cuando se administra a un sujeto es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en la SEC ID N°: 2.

Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición a los polipéptidos de la presente invención. Dichos aminoácidos incluyen, pero sin limitación, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como  $\beta$ -metil aminoácidos,  $C\alpha$ -metil aminoácidos,  $N\alpha$ -metil aminoácidos y análogos de aminoácidos en general.

También se incluyen dentro del alcance de la invención polipéptidos de la presente invención que se modifican diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo, por biotilación, bencilación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden actuar para aumentar la estabilidad y/o la bioactividad del polipéptido de la invención.

Los polipéptidos de la presente invención pueden producirse de diversas maneras, incluyendo producción y recuperación de polipéptidos naturales, producción y recuperación de polipéptidos recombinantes y síntesis química de los polipéptidos. En una realización, un polipéptido aislado de la presente invención se produce cultivando una célula capaz de expresar el polipéptido en condiciones eficaces para producir el polipéptido, y recuperando el polipéptido. Una célula preferida para cultivar es una célula hospedadora de la presente invención. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin limitación, condiciones de medios, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno eficaces que permiten la producción de polipéptidos. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultive una célula para producir un polipéptido de la presente invención. Dicho medio típicamente comprende un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales apropiadas, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de petri. El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Dichas condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto habitual en la materia.

### Anticuerpos

El término "anticuerpo" como se usa en la presente invención incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos quiméricos incluyendo moléculas intactas así como fragmentos de los mismos, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv que son capaces de unirse con el determinante epitópico y otras moléculas de tipo anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo conservan alguna capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor y se definen de la siguiente manera:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada;

(2) Fab', el fragmento una molécula de anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(3) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab)<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro;

(4) Fv, definido como un fragmento obtenido por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y

(5) Anticuerpo monocatenario ("SCA"), definido como una molécula obtenida por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unida con un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

Se conocen en la técnica métodos para realizar estos fragmentos (véase por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988), incorporado en la presente memoria por referencia).

(6) Anticuerpo de un único dominio, típicamente un dominio pesado variable desprovisto de una cadena ligera.

#### Anticuerpos policlonales

Un anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal. Se conocen por los expertos en la materia métodos para preparar anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales pueden inducirse en un mamífero o ave, por ejemplo, por una o más inyecciones de las células que expresan el polipéptido y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, las células y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero o ave por inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante de MPL-TDM (monofosforil Lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por un experto en la materia sin experimentación indebida.

#### 10 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos producidos por el método de la invención pueden, como alternativa, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos en Kohler y Milstein, (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza típicamente con las células que expresan el polipéptido de la primera especie derivada del mamífero transgénico para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente con el polipéptido de la primera especie.

En general, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de un mamífero no humano. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986) pp. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Son líneas celulares inmortalizadas preferidas las que se fusionan eficazmente, apoyan la expresión de alto nivel estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Son líneas celulares inmortalizadas más preferidas las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, Calif. y la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, 1985; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987 pp. 51-63).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede después ensayarse con respecto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de la primera especie. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en este campo. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle Modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como líquido ascítico en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir de medio de cultivo o líquido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos

5 monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituir los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o puede sustituir los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

10 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca en general en cualquier punto en la región Fc para prevenir el entrecruzamiento de cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína relevantes se sustituyen con otro resto de aminoácido o se suprimen para prevenir el entrecruzamiento.

15 Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. Puede conseguirse digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, usando técnicas rutinarias conocidas en este campo.

Los anticuerpos también pueden madurarse por afinidad usando métodos de selección y/o mutagénesis conocidos como se conocen en la técnica. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, aún más preferentemente 20 o 30 veces mayor que el anticuerpo de partida a partir del que se prepara el anticuerpo maduro.

#### 20 Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, una de las especificidades de unión puede ser para un polipéptido de la invención, la otra puede ser para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor.

25 Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, 1983). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue habitualmente por etapas de cromatografía de afinidad. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker (1991).

30 Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>). Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivos celulares recombinantes.

40 Hollinger *et al.* (1993) han proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv) también se ha presentado en Gruber *et al.* (1994).

45 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* (1991).

#### Anticuerpos heteroconjugados

50 Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteína sintética, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los desvelados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

## Polinucleótidos

Por "polinucleótido aislado" se entiende un polinucleótido que se ha separado en general de las secuencias polinucleotídicas con las que está asociado o unido en su estado nativo. Preferentemente, el polinucleótido aislado es al menos 60% libre, más preferentemente al menos 75% libre y más preferentemente al menos 90% libre de otros componentes con los que está asociado de forma natural. Además, el término "polinucleótido" se usa indistintamente en el presente documento con las expresiones "molécula de ácido nucleico", "gen" y "ARNm".

El término "recombinante" en el contexto de un polinucleótido se refiere al polinucleótido cuando está presente en una célula, o en un sistema de expresión sin células, en una cantidad alterada en comparación con su estado nativo. En una realización, la célula es una célula que no comprende de forma natural el polinucleótido. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un polinucleótido no endógeno que da como resultado un aumento de producción alterado, preferentemente aumentado, del polipéptido codificado. Un polinucleótido recombinante de la invención incluye polinucleótidos que no se han separado de otros componentes de la célula transgénica (recombinante), o sistema de expresión sin células, en el que está presente, y polinucleótidos producidos en dichas células o sistemas sin células que se purifican posteriormente de al menos algunos otros componentes.

El "polinucleótido" se refiere a un oligonucleótido, polinucleótido o cualquier fragmento de los mismos. Puede ser ADN o ARN de origen genómico o sintético, bicatenario o monocatenario, y combinado con carbohidrato, lípidos, proteína u otros materiales para realizar una actividad particular definida en la presente memoria.

El porcentaje de identidad de un polinucleótido se determina por análisis de GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización de creación de hueco=5, y una penalización de extensión de hueco=0,3. La secuencia de consulta es de al menos 45 nucleótidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 45 nucleótidos. Preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 150 nucleótidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 150 nucleótidos. Aún más preferentemente, la secuencia de consulta es de al menos 300 nucleótidos de longitud, y el análisis de GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 300 nucleótidos. Más preferentemente, las dos secuencias se alinean sobre su longitud completa.

Con respecto a los polinucleótidos definidos, se apreciará que las cifras del porcentaje de identidad mayores que las proporcionadas anteriormente abarcarán realizaciones preferidas. Por lo tanto, cuando sea aplicable, a la luz de las cifras de porcentaje de identidad mínimo, se prefiere que el polinucleótido comprenda una secuencia polinucleotídica que es al menos 80%, más preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 91%, más preferentemente al menos 92%, más preferentemente al menos 93%, más preferentemente al menos 94%, más preferentemente al menos 95%, más preferentemente al menos 96%, más preferentemente al menos 97%, más preferentemente al menos 98%, más preferentemente al menos 99%, más preferentemente al menos 99,1%, más preferentemente al menos 99,2%, más preferentemente al menos 99,3%, más preferentemente al menos 99,4%, más preferentemente al menos 99,5%, más preferentemente al menos 99,6%), más preferentemente al menos 99,7%, más preferentemente al menos 99,8%, y aún más preferentemente al menos 99,9% idéntica a la SEC ID N° nominada relevante.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden poseer, cuando se comparan con moléculas de origen natural, una o más mutaciones que son deleciones, inserciones o sustituciones de restos de nucleótidos. Los mutantes pueden ser de origen natural (es decir, aislados de una fuente natural) o sintéticos (por ejemplo, realizando mutagénesis dirigida o barajado de ADN en el ácido nucleico como se ha descrito anteriormente). Es por lo tanto evidente que los polinucleótidos de la invención pueden ser de origen natural o recombinantes.

También se describen en el presente documento polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 40% idéntica, más preferentemente al menos 90% idéntica, a SEC ID N°: 1. La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" y similares como se usa en el presente documento se refiere a parámetros con los que la técnica está familiarizada, incluyendo la variación de la temperatura de hibridación con la longitud de un oligonucleótido. Pueden encontrarse parámetros de hibridación de ácido nucleico en referencias que recopilan dichos métodos, Sambrook, *et al.* (mencionado anteriormente) y Ausubel, *et al.* (mencionado anteriormente). Por ejemplo, las condiciones de hibridación rigurosas, como se usan en la presente memoria, pueden hacer referencia a hibridación a 65 °C en tampón de hibridación (SSC 3,5x, Ficoll 0,02%, polivinil pirrolidona 0,02%, Albúmina de Suero Bovino 0,02%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM (pH 7), SDS 0,5%, EDTA 2 mM).

## Vectores y células hospedadoras

Una realización de la presente invención incluye un vector recombinante, que comprende al menos una molécula polinucleotídica aislada de la presente invención, insertada en cualquier vector capaz de suministrar la molécula polinucleotídica a una célula hospedadora. Dicho vector contiene secuencias polinucleotídicas heterólogas, es decir secuencias polinucleotídicas que no se encuentran de forma natural adyacentes a moléculas polinucleotídicas de la presente invención y que preferentemente derivan de una especie distinta de la especie de la que derivan la molécula o las moléculas polinucleotídicas. El vector puede ser de ARN o ADN, bien procarionta o bien eucariota, y

típicamente es un transposón (tal como se describe en el documento US 5.792.294), un virus o un plásmido.

“Unido operativamente” como se usa en la presente memoria se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de un elemento regulador de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor se une operativamente con una secuencia codificante, tal como un polinucleótido definido en la presente memoria, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula apropiada. En general, los elementos reguladores de la transcripción promotores que están unidos operativamente con una secuencia transcrita están físicamente contiguos a la secuencia transcrita, es decir, actúan en cis. Sin embargo, no es necesario que algunos elementos reguladores de la transcripción, tales como potenciadores, estén físicamente contiguos o localizados en proximidad estrecha a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

Como se usa en la presente memoria, un vector de expresión es un vector de ADN o ARN que es capaz de transformar una célula hospedadora y de efectuar la expresión de una molécula polinucleotídica específica. Preferentemente, el vector de expresión también es capaz de replicar dentro de la célula hospedadora. Los vectores de expresión pueden ser procariotas o eucariotas, y típicamente son virus o plásmidos. Los vectores de expresión de la presente invención incluyen cualquier vector que actúe (es decir, dirija la expresión génica) en células recombinantes de la presente invención, incluyendo en células bacterianas, fúngicas, endoparasitarias, de artrópodos, animales y vegetales.

En particular, los vectores de expresión de la presente invención contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de moléculas polinucleotídicas de la presente invención. En particular, las moléculas recombinantes de la presente invención incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, la elongación y la terminación de la transcripción. Son secuencias de control de la transcripción particularmente importantes las que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que puede actuar en al menos una de las células recombinantes de la presente invención. Los expertos en la materia conocen una diversidad de dichas secuencias de control de la transcripción.

Las moléculas recombinantes de la presente invención también pueden (a) contener señales secretoras (es decir, secuencias de ácido nucleico de segmento señal) para permitir que un polinucleótido expresado de la presente invención se secrete de la célula que produce el polipéptido y/o (b) contener secuencias de fusión que conducen a la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención como proteínas de fusión. Los ejemplos de segmentos señal adecuados incluyen cualquier segmento señal capaz de dirigir la secreción de un polipéptido de la presente invención. Las moléculas recombinantes también pueden incluir secuencias intermedias y/o no traducidas que rodean y/o dentro de las secuencias de ácido nucleico de moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

Otra realización de la presente invención incluye una célula hospedadora que comprende una o más moléculas recombinantes de la presente invención. La transformación de una molécula polinucleotídica en una célula puede conseguirse por cualquier método por el que puede insertarse una molécula polinucleotídica en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Una célula recombinante puede permanecer unicelular o puede crecer a un tejido, órgano o un organismo multicelular. Las moléculas polinucleotídicas transformadas de la presente invención pueden permanecer extracromosómicas o pueden integrarse en uno o más sitios dentro de un cromosoma de la célula transformada (es decir, recombinante) de tal manera que se conserve su capacidad para expresarse.

Las células hospedadoras adecuadas para transformar incluyen cualquier célula que pueda transformarse con un polinucleótido de la presente invención. Las células hospedadoras de la presente invención pueden ser capaces de forma endógena (es decir, de forma natural) de producir polipéptidos de la presente invención o pueden ser capaces de producir dichos polipéptidos después de transformarse con al menos una molécula polinucleotídica de la presente invención. Las células hospedadoras de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una proteína de la presente invención, e incluyen células animales, vegetales, bacterianas, fúngicas (incluyendo de levadura), parasitarias y de artrópodos. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula bacteriana. En una realización preferida, la célula hospedadora es una cepa de *E. coli* que tiene el antígeno de serotipo H, H10. Los ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen CCEC22, CCEC31 y CCEC59 como se describe en el documento WO 2007/025333.

Pueden usarse tecnologías de ADN recombinante para mejorar la expresión de una molécula polinucleotídica transformada manipulando, por ejemplo, el número de copias de la molécula polinucleotídica dentro de una célula hospedadora, la eficacia con la que esas moléculas polinucleotídicas se transcriben, la eficacia con la que los transcritos resultantes se traducen, y la eficacia de las modificaciones postraduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de moléculas polinucleotídicas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas polinucleotídicas unidas operativamente con plásmidos de alto número de copias, integración de la molécula polinucleotídica en uno o más cromosomas de células hospedadoras, adición de

secuencias estabilizadoras de vector a plásmidos, sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosomas, secuencias Shine-Dalgarno), modificación de moléculas polinucleotídicas de la presente invención para corresponder al uso codónico de la célula hospedadora y la delección de secuencias que desestabilizan los transcritos.

### Detección de polinucleótidos

Puede usarse cualquier técnica adecuada que permita la detección de un polinucleótido de la invención, incluyendo las que permiten la evaluación cuantitativa del nivel de expresión del polinucleótido en un tejido y/o una célula. Por ejemplo, la presencia en los niveles de un gen transcrito pueden determinarse por transferencia de Northern y/o amplificación del polinucleótido, tal como por PCR. Puede realizarse comparación por referencia a un control convencional. Por ejemplo, los niveles de un gen transcrito pueden determinarse por transferencia de Northern y/o RT-PCR. Con la aparición de la PCR cuantitativa (en tiempo real), puede conseguirse análisis cuantitativo de la expresión génica usando cebadores apropiados para el gen de interés. El ácido nucleico puede marcarse e hibridarse en una matriz génica, en cuyo caso la concentración del gen será directamente proporcional a la intensidad de la señal radiactiva o fluorescente generada en la matriz.

La "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") es una reacción en la que se realizan copias repetidas de un polinucleótido diana usando un "par de cebadores" o "conjunto de cebadores" que consisten en un cebador "cadena arriba" y uno "cadena abajo", y un catalizador de polimerización, tal como una ADN polimerasa, y típicamente una enzima polimerasa termoestable. Se conocen en las técnicas métodos para PCR, y se enseñan, por ejemplo, en "PCR" (Ed. M. J. McPherson y S. G Moller (2000) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford). La PCR puede realizarse en ADNc obtenido de la transcripción inversa de ARNm aislado de muestras biológicas. Sin embargo, será en general más fácil si se realiza PCR en ADN genómico.

Un cebador es un oligonucleótido, habitualmente de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, con un mínimo de aproximadamente 15 nucleótidos, que es capaz de hibridar de una manera específica de secuencia con la secuencia diana y que se extiende durante la PCR. Los amplicones o productos de PCR o fragmentos de PCR o productos de amplificación son productos de extensión que comprenden el cebador y las copias de nueva síntesis de las secuencias diana. Los sistemas de PCR múltiples contienen múltiples conjuntos de cebadores que dan como resultado producción simultánea de más de un amplicón. Los cebadores pueden ser perfectamente coincidentes con la secuencia diana o pueden contener bases desapareadas internas que pueden dar como resultado la inducción de enzima de restricción o sitios de reconocimiento/escisión de ácido nucleico catalítico en secuencias diana específicas. Los cebadores también pueden contener secuencias adicionales y/o nucleótidos modificados o marcados para facilitar la captura o la detección de amplicones. Los ciclos repetidos de desnaturalización por calor del ADN, hibridación de cebadores con sus secuencias complementarias y extensión de los cebadores hibridados con polimerasa dan como resultado amplificación exponencial de la secuencia diana. Las expresiones diana o secuencia diana o molde se refieren a secuencias de ácido nucleico que se amplifican.

El experto en la materia entenderá que hay numerosas técnicas alternativas para amplificar un polinucleótido de la presente invención. Los ejemplos de otras técnicas de amplificación incluyen reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), y también incluyen técnicas de amplificación isotérmicas tales como amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle de ADN (LAMP).

Como alternativa, pueden detectarse polinucleótidos de la presente invención en una muestra usando técnicas de hibridación adecuadas, por ejemplo hibridación de transferencia de Southern con sondas marcadas de forma adecuada. Una "sonda" es una molécula de ADN o ARN monocatenaria de secuencia definida que puede formar pares de bases con una segunda molécula de ADN o ARN que contiene una secuencia complementaria (la diana). La estabilidad de la molécula híbrida resultante depende del alcance de la formación de pares de bases que sucede, y se ve afectada por parámetros tales como el grado de complementariedad entre la sonda y la molécula diana y el grado de rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas específicas para los polinucleótidos descritos en la presente memoria, o partes de los mismos, pueden variar en longitud por cualquier número entero de al menos 8 nucleótidos a más de 500 nucleótidos, incluyendo cualquier valor entre medias, dependiendo del fin para el que, y las condiciones en las que, se use la sonda. Por ejemplo, una sonda puede ser de al menos 8, 10, 15, 20 o 25 nucleótidos de longitud o puede ser de al menos 30, 40, 50 o 60 nucleótidos de longitud, o puede ser de más de 100, 200, 500 o 1000 nucleótidos de longitud. Las sondas específicas para los polinucleótidos descritos en la presente memoria son en general de al menos 40%, 50%, 55% o 60%, o al menos 65%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o hasta 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria usando por ejemplo el programa Align (Myers y Miller, 1989).

El término "hibridación" como se usa en la presente memoria se refiere a la asociación de dos moléculas de ácido nucleico entre sí por enlaces de hidrógeno. Los factores que afectan a este enlace incluyen: el tipo y volumen de disolvente; la temperatura de reacción; el tiempo de hibridación; la agitación; los agentes para bloquear la unión no específica de la molécula de fase líquida con el soporte sólido (reactivo de Denhardt o BLOTTO); la concentración de las moléculas; uso de compuestos para aumentar la tasa de asociación de moléculas (dextrán sulfato o

polietilenglicol); y la rigurosidad de las condiciones de lavado después de hibridación (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989)). De acuerdo con estos principios, la inhibición de la hibridación de una molécula complementaria a una molécula diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación; una molécula sustancialmente homóloga que posee un mayor grado de homología competirá después por e inhibirá la unión de una molécula completamente homóloga de la molécula diana en diversas condiciones de rigurosidad, como se enseña en Wahl *et al.*, (1987).

Como se usa en la presente memoria en relación con la hibridación, las “condiciones rigurosas” son las que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo, NaCl 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/NaDodSO<sub>4</sub> 0,1% a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino 0,1%, Ficoll 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1%, tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50%, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1%, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 g/ml), SDS 0,1% y dextrán sulfato 10% a 42 °C en SSC 0,2 x y SDS 0,1%.

## 15 Bacterias atenuadas

Se conocen en la técnica métodos para atenuar la virulencia de patógenos bacterianos. Típicamente, se introducen mutaciones en un genoma bacteriano para prevenir o reducir la expresión de toxinas u otros genes de virulencia para suprimir o inactivar el gen. En algunos casos, anulan la función del gen completamente. Esto puede conseguirse anulando la síntesis de cualquier polipéptido en absoluto del gen o realizando una mutación que dé como resultado la síntesis de polipéptido no funcional. Para anular la síntesis de polipéptido, puede suprimirse bien el gen completo o bien su extremo 5'. Puede usarse una delección o inserción dentro de la secuencia codificante de un gen para crear un gen que sintetice solamente el polipéptido no funcional (por ejemplo polipéptido que contiene solamente la secuencia N terminal de la proteína de tipo silvestre). En el caso de un gen de toxina, la mutación puede hacer al producto génico no tóxico.

Una “mutación” incluye cualquier alteración en la secuencia de ADN, es decir genoma, de un organismo, en comparación con la cepa parental. Las alteraciones pueden surgir exponiendo al organismo a un estímulo mutagénico, tal como un producto químico mutagénico, energía, radiación, técnicas recombinantes, apareamiento o cualquier otra técnica usada para alterar el ADN. Una mutación puede incluir una alteración en cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria, o puede incluir una alteración en una secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria.

Una mutación puede “atenuar la virulencia” si, como resultado de la mutación, el nivel de virulencia de la célula mutante se reduce en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%, en comparación con la cepa parental. La reducción de virulencia también puede medirse por una reducción de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en la expresión y/o actividad de toxina de un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 2, o un fragmento o variante del mismo, en la cepa mutante en comparación con la cepa parental.

El experto en la materia apreciará que un patógeno bacteriano atenuado descrito en la presente memoria puede ser adecuado para suministro de uno o más polipéptidos biológicamente activos a un sujeto. Los ejemplos de polipéptidos biológicamente activos adecuados para suministro por una bacteria atenuada descritos en la presente memoria incluyen algunos que son capaces de actuar local o sistémicamente, por ejemplo, es un polipéptido capaz de ejercer actividades endocrinas que afectan al metabolismo local o de cuerpo completo.

En una realización, el polipéptido biológicamente activo puede ser un polipéptido heterólogo. La expresión “polipéptido heterólogo” se entiende bien en la técnica y se refiere a un polipéptido que no es endógeno para una célula. La molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés puede originarse de cualquier organismo capaz de producir el polipéptido de interés o puede ser un gen completamente sintético. La molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido puede añadirse a la célula, por ejemplo, por infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

Por ejemplo, el polipéptido biológicamente activo puede ser uno que sea capaz de regular el sistema inmuno-hemopoyético. Como alternativa, el polipéptido biológicamente activo puede ser uno que sea capaz de afectar a la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación de una diversidad de células normales o neoplásicas en el cuerpo. Como alternativa, el polipéptido biológicamente activo puede ser uno que sea capaz de afectar a la regulación inmunitaria o inducción de respuestas inflamatorias de fase aguda a lesión e infección. Como alternativa, el polipéptido biológicamente activo puede ser uno que sea capaz de potenciar o inducir la resistencia a infección de células y tejidos mediada por quimiocinas que actúan en sus receptores de células diana, o la proliferación de células epiteliales o la promoción de curación de heridas.

Los ejemplos específicos de dichos polipéptidos incluyen insulina, hormona del crecimiento, prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, somatostatina, hormona estimulante del tiroides, polipéptido intestinal vasoactivo, una citocina de grupo estructural 1 tal como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11,

IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-32, cMGF, LT, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ , EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL o IFN $\alpha/\beta$ , una citocina del grupo estructural 2 tal como la familia de citocinas TNF, por ejemplo, ligandos TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , CD40, CD27 o FAS, la familia de citocinas de IL-1, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento derivados de plaquetas, factor de crecimiento transformante  $\beta$  y factores de crecimiento nervioso, una citocina de grupo estructural 3, por ejemplo, la familia de citocinas del factor de crecimiento epidérmico, las quimiocinas, las citocinas relacionadas con la insulina, una citocina de grupo estructural 4 tal como las heregulinas o neuregulinas, por ejemplo, EGF.

Como alternativa, el polipéptido biológicamente activo puede ser un receptor o antagonista para polipéptidos biológicamente activos como se ha definido anteriormente.

En otra realización de la invención, el polipéptido biológicamente activo es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo recombinante.

Como alternativa, el polipéptido biológicamente activo puede ser un péptido antimicrobiano o una variante sintética del mismo. Los péptidos antimicrobianos incluyen cecropinas, magaininas y defensinas. Las cecropinas fueron la primera familia bien caracterizada de péptidos antimicrobianos estructuralmente relacionados y se encuentran en una amplia distribución de insectos (Boman, 2003). En vertebrados, la familia de magainina de péptidos antimicrobianos se ha aislado de las glándulas de la piel y el tracto gastrointestinal de *Xenopus laevis*, y se cree que forman la base del sistema de defensa de las superficies de mucosa anfibia contra la infección (Soravia *et al.*, 1988).

Las defensinas son péptidos antimicrobianos hallados en células fagocíticas aisladas de varias especies de mamífero incluyendo el hombre y pueden caracterizarse por ocho restos invariantes dentro de la secuencia (Gabay *et al.*, 1989). El mecanismo de actividad antimicrobiana de péptidos tales como las defensinas es mediante una alteración de membrana selectiva que conduce a un amplio espectro característico de la actividad antibiótica (Boman, 1995). El espectro antimicrobiano de las defensinas incluye bacterias gram positivas y gram negativas, microbacterias, muchos hongos y algunos virus con envoltura.

Se conocen péptidos antimicrobianos de origen bacteriano como microcinas, colicinas y bacteriocinas (Jack *et al.*, 1995; Ingham *et al.*, 2003). Se sabe que la secuencia, la estructura y los mecanismos de la actividad de bacteriocinas son diversos. Las bacteriocinas más abundantes y exhaustivamente estudiadas incluyen las bacteriocinas de clase I (antibióticos) y de clase II (péptidos que no contienen lantionina pequeños termoestables) (Ennahar *et al.*, 2000). Las bacteriocinas de clase II forman un importante subgrupo debido a sus actividades y aplicaciones potenciales. Las bacteriocinas de clase IIa incluyen Piscicolina 126, leucocina A y enterocina P entre otros. Las bacteriocinas de clase IIa tienen el motivo N-terminal común: YGNGVXaaCXaa(K/N)XaaXaaCXaaV(N/D)(W/K/R)Xaa-(G/A/S)(A/N), en el que los restos con mayor variabilidad están representados por Xaa (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996). En un ejemplo que demuestra las propiedades antimicrobianas de bacteriocinas, se mostró que Piscicolina 126, cuando se inyectó en ratones, presentaba actividad antimicrobiana *in vivo* y redujo significativamente la carga de listeria en el hígado y el bazo (Ingham *et al.*, 2003).

Como alternativa, el polipéptido biológicamente activo puede ser una enzima. La enzima puede ser cualquier enzima que tenga una actividad deseada. Por ejemplo, puede ser deseable suministrar una enzima que desempeñe un papel en la mejora de la capacidad de digestión del alimento o la retirada de compuestos antinutritivos. Por ejemplo, pueden suministrarse enzimas degradantes de polisacáridos y fibrolíticas tales como xilanasas (Liu *et al.*, 2005), glucanasas (Cho *et al.*, 2000), celulasas (Liu *et al.*, 2005), amilasas, levansacarinas e inulosacarinas para aumentar la capacidad de digestión del alimento. También pueden suministrarse proteinasas, peptidasas y lipasas para aumentar el valor nutritivo de los alimentos ingeridos. Pueden suministrarse fitasas (Vohra y Satyanarayana, 2003; Nahashon *et al.*, 1994) y fosfatasas ácidas (Palacios *et al.*, 2005) para reducir los efectos antinutritivos de fitato que se encuentra en semillas vegetales.

En otra realización, el patógeno bacteriano atenuado descrito en la presente memoria puede expresar un antígeno. Si el antígeno es de, por ejemplo, un agente de enfermedad bacteriano, fúngico, parasitario o viral, la cepa bacteriana atenuada puede usarse para vacunar a un sujeto contra enfermedades provocadas por dichos agentes. Por ejemplo, la cepa bacteriana atenuada podría usarse para suministrar un antígeno de un microorganismo patógeno aviar. Dichos microorganismos incluyen, pero sin limitación, especies de *Corynebacteria*, *Mycoplasma*, *Listeria*, *Borrelia*, *Chlamydia*, *Clostridia*, *Coxiella*, *Eysipelothrix*, *Flavobacteria*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Streptococcus*. Son ejemplos de patógenos fúngicos y aviares parasitarios que se sabe que infectan a las aves de corral especies de *Amoebotaenia*, *Aproctella*, *Ascaridia*, *Aspergillus*, *Candida*, *Capillaria*, *Cryptosporidium*, *Cyathostroma*, *Dispharynx*, *Eimeria*, *Fimbriaria*, *Gongylonema*, *Heterakis*, *Histomonas*, *Oxyspirura*, *Plasmodium*, *Raillietina*, *Strongyloides*, *Subulura*, *Syngamus*, *Tetrameres* y *Trichostrongylus*. Los virus que se sabe que infectan a las aves de corral incluyen adenovirus (por ejemplo, virus de la enteritis hemorrágica), astrovirus, coronavirus (por ejemplo, virus de bronquitis infecciosa), paramixovirus (por ejemplo, virus de la enfermedad de Newcastle), picornavirus (por ejemplo, virus de la encefalomiелitis aviar), virus de la viruela, retrovirus (por ejemplo, virus de leucosis/sarcoma aviar), reovirus y rotavirus. Los ejemplos específicos incluyen Gripe Aviar, Virus de Enfermedad de Marek y Virus de Anemia de Pollo. Los productos génicos preferidos para uso como antígenos son polipéptidos y péptidos, incluyendo glucoproteínas y lipoproteínas. Los genes que codifican antígenos de estos organismos procariotas y eucariotas pueden clonarse y expresarse en las bacterias atenuadas usando

técnicas convencionales.

### Composiciones y administración

Una "composición inmunogénica" se refiere a una composición que comprende materiales que inducen una respuesta inmunitaria deseada e incluyen una "vacuna". El término "vacuna" abarca cualquier composición que induzca una respuesta inmunitaria al menos parcialmente protectora contra el patógeno diana o que proteja eficazmente contra el patógeno; por ejemplo, después de la administración o inyección al animal (por ejemplo, aviar tal como pollo o porcino tal como cerdo), induce una respuesta inmunitaria al menos parcialmente protectora contra el patógeno diana o proporciona protección eficaz contra el patógeno (por ejemplo, *C. perfringens*). Una subunidad de un patógeno, por ejemplo un antígeno o inmunógeno o epítipo aislado del patógeno, y una composición subunitaria comprende o consiste esencialmente en uno o más antígenos, inmunógenos o epítipos aislados del patógeno. Por la inducción de una respuesta inmunitaria "al menos parcialmente protectora" se entiende que una vacuna reduce la infección y/o colonización por una bacteria que expresa un polipéptido de la invención o reduce al menos un síntoma provocado por infección con una bacteria que expresa un polipéptido de la invención.

Una composición inmunogénica puede seleccionar, activar o expandir células del sistema inmunitario incluyendo linfocitos B y T de memoria, por ejemplo, para permitir la eliminación de agentes infecciosos, tales como patógenos bacterianos que expresan un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3, o fragmentos antigénicos de los mismos.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica incluye un vehículo adecuado, tal como un adyuvante, que es un agente que actúa de una manera no específica para aumentar la respuesta inmunitaria a un antígeno específico, o a un grupo de antígenos, permitiendo la reducción de la cantidad de antígeno en cualquier dosis dada, o la reducción de la frecuencia de dosificación requerida para generar la respuesta inmunitaria deseada. Una respuesta inmunitaria deseada puede incluir, por ejemplo, protección completa o parcial contra desprendimiento de (presencia en heces de un animal infectado, por ejemplo, mamífero o ave) o colonización (presencia en el intestino de un animal infectado, por ejemplo, mamífero o ave) por un patógeno bacteriano. Por ejemplo, una respuesta inmunitaria deseada puede incluir cualquier valor de entre 10% y 100%, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, de protección contra el desprendimiento de o colonización por un patógeno bacteriano en una animal vacunado cuando se compara con un animal no vacunado.

Los adyuvantes son útiles para mejorar la respuesta inmunitaria y/o aumentar la estabilidad de preparaciones de vacuna. Los adyuvantes se describen típicamente como estimulantes no específicos del sistema inmunitario, pero también pueden ser útiles para dirigirse a ramas específicas del sistema inmunitario. Pueden añadirse uno o más compuestos que tienen esta actividad a la vacuna. Por lo tanto, las vacunas particulares de la presente invención comprenden además un adyuvante. Los ejemplos de compuestos químicos que pueden usarse como adyuvantes incluyen, pero sin limitación, compuestos de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio), aceites metabolizables y no metabolizables, aceites minerales incluyendo derivados de manida oleato en solución de aceite mineral (por ejemplo, MONTANIDE ISA 70 de Seppic SA, Francia), y aceites minerales ligeros tales como DRAKEOL 6VR, polímeros en bloque, ISCOM (complejos inmunoestimulantes), vitaminas y minerales (incluyendo pero sin limitación: vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12) y CARBOPOL®.

Otros adyuvantes adecuados, que en ocasiones se han denominado estimulantes inmunitarios incluyen, pero sin limitación: citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, sobrenadantes de cultivos celulares de linfocitos, monocitos, células de órganos linfoides, preparaciones celulares y/o extractos de plantas, bacterias o parásitos (*Staphylococcus aureus* o preparaciones de lipopolisacáridos) o mitógenos.

En general, se administra un adyuvante al mismo tiempo que un antígeno de la presente invención. Sin embargo, los adyuvantes pueden también, o como alternativa, administrarse dentro de un periodo de dos semanas antes de la vacunación y/o durante un periodo de tiempo después de la vacunación, es decir, siempre que el antígeno, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 3 o un fragmento antigénico del mismo, persista en los tejidos.

Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención pueden incluir los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico descritos en la presente memoria, o fragmentos inmunogénicos de los mismos, y pueden administrarse usando cualquier forma de administración conocida en la técnica o descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones de la invención, la composición inmunogénica o vacuna puede incluir un patógeno bacteriano vivo, un patógeno bacteriano muerto o componentes de los mismos. Los patógenos bacterianos vivos, que pueden administrarse en forma de una vacuna oral, pueden atenuarse para reducir la virulencia del patógeno bacteriano, pero no su inducción de una respuesta inmunitaria. Una vacuna viva puede ser capaz de colonizar los intestinos del animal inoculado, por ejemplo, ave.

En algunas realizaciones, los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico descritos en la presente memoria, o fragmentos antigénicos de los mismos, o las bacterias mutadas (por ejemplo, bacterias atenuadas) descritas en la presente memoria pueden administrarse a aves de corral, por ejemplo, pollo, patos, pavos, etc., para inducir una respuesta inmunitaria por ejemplo, inducir anticuerpos, en las aves de corral. Pueden administrarse huevos, o

5 productos de los mismos, obtenidos de dichas aves de corral, que muestren una respuesta inmunitaria contra los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico descritos en la presente memoria, o fragmentos inmunogénicos de los mismos, a un animal, por ejemplo, seres humanos, vacas, cabras, ovejas, etc., para inducir una respuesta inmunitaria a los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico descritos en la presente memoria, o fragmentos inmunogénicos de los mismos, en el animal. Se describen métodos para inducir anticuerpos en aves de corral, y administrar dichos anticuerpos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.750.113 y Patente de Estados Unidos Nº 6.730.822.

10 Las composiciones inmunogénicas y vacunas de acuerdo con la invención pueden complementarse además por la adición de otros antígenos recombinantes o purificados que pueden dar como resultado la producción de anticuerpos de una diversidad de especificidades cuando se administran a un sujeto animal. No es necesario que todos estos anticuerpos sean protectores contra una enfermedad. En una realización particular de este tipo, dichos antígenos también son de *C. perfringens*. Por lo tanto, una vacuna de la presente invención puede contener diversos otros factores patógenos activos o inactivados, junto con el polipéptido de la invención. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el polipéptido de la invención puede combinarse con otras células clostridiales y no clostridiales, toxoides y extractos.

15 Los antígenos adicionales pueden comprender un antígeno viral y/o un antígeno bacteriano y/o un antígeno parasitario. Por ejemplo, el antígeno puede derivar de un microorganismo incluyendo, pero sin limitación, especies de *Corynebacteria*, *Mycoplasma*, *Listeria*, *Borrelia*, *Chlamydia*, *Clostridia*, *Coxiella*, *Eysipelothrix*, *Flavobacteria*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Campylobacter*, y *Streptococcus*. Son ejemplos de patógenos aviares, fúngicos y parasitarios que se sabe que infectan aves de corral las especies de *Amoebotaenia*, *Aproctella*, *Ascaridia*, *Aspergillus*, *Candida*, *Capillaria*, *Cryptosporidium*, *Cyathostroma*, *Dispharynx*, *Eimeria*, *Fimbriaria*, *Gongylonemia*, *Heterakis*, *Histomonas*, *Oxyspirura*, *Plasmodium*, *Raillietina*, *Strongyloides*, *Subulura*, *Syngamus*, *Tetrameres* y *Trichostrongylus*. Los virus que se sabe que infectan a las aves de corral incluyen adenovirus (por ejemplo, virus de la enteritis hemorrágica), astrovirus, coronavirus (por ejemplo, virus de la bronquitis infecciosa), paramixovirus (por ejemplo, virus de enfermedad de Newcastle), picornavirus (por ejemplo, virus de la encefalomiелitis aviar), virus de la viruela, retrovirus (por ejemplo, virus de leucosis/sarcoma aviar), reovirus y rotavirus.

20 Una vacuna multivalente de la presente invención también puede comprender uno o más de los siguientes antígenos: toxina beta de *C. perfringens*, toxina beta 2 de *C. perfringens*, enterotoxina de *C. perfringens*, toxina épsilon de *C. perfringens*, toxina iota de *C. perfringens*, toxina kappa de *C. perfringens*, toxina lambda de *C. perfringens*, toxina theta de *C. perfringens*, toxina hemorrágica de *C. sordellii*, toxina letal de *C. sordellii*, toxina A de *C. difficile*, toxina B de *C. difficile*, toxina alfa de *C. septicum*, toxina alfa de *C. novyi* y toxina beta de *C. novyi*.

25 Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención pueden administrarse como un líquido, una emulsión, un polvo seco y/o en una bruma a través de cualquier vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, mediante escarificación, por vía subcutánea, por vía intramuscular o inoculada por una vía mucosa, por ejemplo, por vía oral, por vía intranasal, como un aerosol, por colirio, por administración en el huevo, o implantada como un polvo liofilizado.

30 La administración de las moléculas polipeptídicas y de ácido nucleico descritas en la presente memoria, o fragmentos inmunogénicos de las mismas, las bacterias mutadas (por ejemplo, bacterias atenuadas) y/o las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria pueden unirse convenientemente mediante inyección en el huevo de un ave (por ejemplo, ave de corral) y generalmente inyección en el saco aéreo. A pesar de que el saco aéreo es la vía preferida de administración en el huevo, también pueden inocularse otras regiones tales como el saco vitelino o el líquido alantoides coriónico mediante inyección. La tasa de eclosibilidad podría reducirse ligeramente cuando el saco aéreo no sea la diana para la administración aunque no necesariamente a niveles comercialmente inaceptables. El mecanismo de inyección no es crítico para la práctica de la presente invención, aunque se prefiere que la aguja no provoque daño indebido al huevo o a los tejidos y órganos del embrión en desarrollo o las membranas extraembrionarias que rodean al embrión.

35 En general, una jeringa hipodérmica equipada con una aguja de calibre aproximadamente 22 es adecuada. El método de la presente invención está particularmente bien adaptado para su uso con un sistema de inyección automático, tal como los descritos en los documentos US 4.903.635, US 5.056.464, US 5.136.979 y US 20060075973.

40 También se describen en la presente memoria métodos para proporcionar inmunidad pasiva a la descendencia de un animal hembra (por ejemplo, una hembra embarazada) que comprenden administrar una vacuna de la presente invención al animal hembra (por ejemplo, madre) antes del nacimiento de su descendencia. La "inmunidad pasiva" se refiere a la transferencia de inmunidad de la madre a la descendencia y puede conseguirse entre otros mediante la ingestión de calostros, como sucede en mamíferos, o la absorción de anticuerpos al torrente sanguíneo desde la yema del huevo, como sucede en las aves de corral.

45 En una realización, la hembra es un ave y la vacuna se administra a la hembra aviar antes de su puesta de los huevos que comprenden la descendencia. De esta manera se proporciona a su descendencia inmunidad pasiva. En una de dichas realizaciones, el ave es ave de corral. Preferentemente, el ave de corral es un pollo, pavo o pato.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un vehículo veterinariamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o uno estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

En general, los ingredientes de formulaciones de la invención se proporcionan bien separados o bien mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de agente activo.

También se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido de la invención, polinucleótido de la invención, vector de la invención y/o célula hospedadora de la invención. Como se apreciará por el experto en la materia, las composiciones pueden comprender vehículos o excipientes adecuados.

#### Vacunas de ADN

La vacunación de ADN implica la introducción *in vivo* directa de ADN que codifica un antígeno en células y/o tejidos de un sujeto para expresión del antígeno por las células del tejido del sujeto. Dichas vacunas se denominan en la presente memoria "vacunas de ADN" o "vacunas basadas en ácido nucleico". Se describen ejemplos de vacunas de ADN en los documentos US 5.939.400, US 6.110.898, WO 95/20660 y WO 93/19183. La capacidad del ADN inyectado directamente que codifica un antígeno de inducir una respuesta inmunitaria protectora se ha demostrado en numerosos sistemas experimentales (véase, por ejemplo, Conry *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1996; Montgomery *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1997).

Un factor que se sabe que afecta a la respuesta inmunitaria inducida por inmunización por ADN es el método de suministro de ADN, por ejemplo, las vías parenterales pueden producir bajas tasas de transferencia génica y producir una variabilidad considerable de expresión génica (Montgomery *et al.*, 1993). La inoculación a alta velocidad de plásmidos, usando una pistola génica, potenció las respuestas inmunitarias de ratones (Fynan *et al.*, 1993), supuestamente debido a una mayor eficacia de transfección de ADN y presentación de antígenos más eficaz por células dendríticas. También pueden introducirse vectores que contienen la vacuna basada en ácido nucleico de la invención en el hospedador deseado por otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, lipofección (fusión de lisosomas) o un transportador de vector de ADN.

#### Vacunas derivadas de plantas transgénicas

El término "planta" se refiere a plantas completas, órganos vegetales (por ejemplo hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales y similares. Las plantas contempladas para su uso en la práctica de la presente invención incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Las dicotiledóneas ejemplares incluyen maíz, tomate, patata, judía, soja y similares. Típicamente la planta transgénica se usa rutinariamente como una fuente de alimento para animales de granja, particularmente pollos.

Las plantas transgénicas, como se define en el contexto de la presente invención incluyen plantas (así como partes y células de dichas plantas) y su descendencia que se han modificado genéticamente usando técnicas de ADN recombinante para provocar o potenciar la producción de al menos un polipéptido de la presente invención en la planta o el órgano vegetal deseado.

Existen varias técnicas para introducir material genético ajeno en una célula vegetal, y para obtener plantas que mantienen de forma estable y expresan el gen introducido. Dichas técnicas incluyen la aceleración del material genético que recubre micropartículas directamente a células (véase, por ejemplo, documento US 4.945.050 y US 5.141.131). Las plantas pueden transformarse usando tecnología de *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, documentos US 5.177.010, US 5.104.310, US 5.004.863, US 5.159.135). También se ha usado tecnología de electroporación para transformar plantas (véase, por ejemplo, documentos WO 87/06614, US 5.472.869, 5.384.253, WO 92/09696 y WO 93/21335). Además de numerosas tecnologías para transformar plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes ajenos también puede variar. Dicho tejido incluiría pero no se limitaría al tejido embriogénico, tejido calloso de tipo I y II, hipocótilo, meristemo y similares. Casi todos los tejidos vegetales pueden transformarse durante el desarrollo y/o la diferenciación usando técnicas apropiadas descritas en la presente memoria.

Se han descrito varios vectores adecuados para transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas en, por ejemplo, Pouwels *et al.*, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, sup. 1987; Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; y Gelvin *et al.*, Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Típicamente, los vectores de expresión vegetal incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control transcripcional de secuencias

reguladoras 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Dichos vectores de expresión vegetal también pueden contener una región reguladora promotora (por ejemplo, una región reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada ambientalmente o por el desarrollo, o específica de célula o tejido), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

Los ejemplos de promotores vegetales incluyen, pero sin limitación subunidad pequeña de la ribulosa-1,6-bisfosfato carboxilasa, promotor de beta-conglicinina, promotor de faseolina, promotor de ADH, promotores de choque térmico y promotores específicos de tejido. Los promotores también pueden contener ciertos elementos de secuencia potenciadores que pueden mejorar la eficacia de transcripción. Los potenciadores típicos incluyen pero sin limitación intrón 1 de Adh e intrón 6 de Adh.

Los promotores constitutivos dirigen la expresión génica continua en todos los tipos celulares y en todo momento (por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S). Los promotores específicos tisulares son responsables de la expresión génica en tipos celulares o tisulares específicos, tales como las hojas o las semillas (por ejemplo, zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y estos promotores también pueden usarse. Los promotores también pueden estar activos durante un cierto estadio del desarrollo de las plantas así como activos en tejidos y órganos vegetales. Los ejemplos de dichos promotores incluyen pero sin limitación promotores específicos de polen, específicos de embrión, específicos de barba del maíz, específicos de fibra de algodón, específicos de raíz, específicos de endospermo de semillas y similares.

En ciertas circunstancias puede ser deseable usar un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (genes de choque térmico); luz (RUBP carboxilasa); hormona (Em); metabolitos; y tensión. Pueden usarse otros elementos de transcripción y traducción deseables que actúan en plantas.

Además de promotores vegetales, pueden usarse promotores de una diversidad de fuentes eficazmente en células vegetales para expresar genes ajenos. Por ejemplo, pueden usarse promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de la manopina sintasa; promotores de origen viral, tales como el virus del mosaico de la coliflor (35S y 19S) y similares.

Se están desarrollando actualmente varias vacunas comestibles derivadas de plantas para patógenos tanto animales como humanos (Hood y Jilka, 1999). También han resultado respuestas inmunitarias de inmunización oral con plantas transgénicas productoras de partículas de tipo viral (VLP), o virus vegetales quiméricos que presentan epítomos antigénicos (Modelska *et al.*, 1998; Kapustra *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la forma en partículas de estas VLP o virus quiméricos puede dar como resultado mayor estabilidad del antígeno en el estómago, aumentando eficazmente la cantidad de antígeno disponible para captación en el intestino (Modelska *et al.* 1998).

#### Pienso

En una realización, una composición de la invención es un alimento o pienso. Para fines de la presente invención, "alimento" o "piensos" incluyen cualquier comida o preparación para consumo humano o animal (tales como vacas, caballos, cabras y ovejas) (incluyendo para consumo entérico y/o parenteral) que cuando se toman en el cuerpo (a) actúan para nutrir o hacer crecer tejidos o proporcionar energía; y/o (b) mantener, restaurar o apoyar el estado nutricional adecuado o la función metabólica.

Los alimentos incluyen sustancias nutricionales tales como macronutrientes comestibles, vitaminas y/o minerales en cantidades deseadas para un uso particular. Las cantidades de estos ingredientes variarán dependiendo de si se pretende usar la composición con individuos normales o con individuos que tengan necesidades especiales, tales como individuos que padezcan trastornos metabólicos y similares.

Los ejemplos de sustancias con valor nutricional incluyen, pero sin limitación, macronutrientes tales como grasas comestibles, carbohidratos y proteínas. Los ejemplos de dichas grasas comestibles incluyen, pero sin limitación, aceite de coco, aceite de borraja, aceite fúngico, aceite de grosella negra, aceite de soja y mono y diglicéridos. Los ejemplos de dichos carbohidratos incluyen (pero sin limitación): glucosa, lactosa comestible y almidón hidrolizado. Adicionalmente, los ejemplos de proteínas que pueden utilizarse en la composición nutricional de la invención incluyen (pero sin limitación) proteínas de soja, suero electrodiálizado, leche desnatada electrodiálizada, suero de leche o los hidrolizados de estas proteínas.

Con respecto a vitaminas y minerales, puede añadirse lo siguiente a las composiciones de alimento de la presente invención: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio y vitaminas A, E, D, C y el complejo B. También pueden añadirse otros de dichos minerales y vitaminas.

Los componentes utilizados en las composiciones de alimento de la presente invención pueden ser de un origen semipurificado o purificado. Por semipurificado o purificado se entiende un material que se ha preparado por purificación de un material natural o por síntesis de novo.

En una realización, el polipéptido de la invención se usa en la producción del alimento. Por ejemplo, puede usarse alimento que comprende el polipéptido de la invención para vacunar animales para proporcionar al menos protección parcial de la infección y/o colonización por un patógeno bacteriano que expresa un polipéptido con actividad de toxina, preferentemente el patógeno bacteriano expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 40% idéntica a SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3. En una realización, el patógeno bacteriano es del género *Clostridium*, por ejemplo, el patógeno bacteriano es *Clostridium perfringens*.

En otra realización, el alimento comprende una planta transgénica de la invención, y/o parte de dicha planta y/o un extracto de dicha planta.

### Agonistas y antagonistas - ensayos y moléculas

Los polipéptidos de la invención pueden emplearse en un proceso de exploración con respecto a compuestos que activan (agonistas) o inhiben (antagonistas) la actividad de toxina del polipéptido.

Los ejemplos de antagonistas potenciales incluyen anticuerpos, oligosacáridos y derivados de los mismos. Un antagonista potencial incluye una molécula pequeña que se une con el polipéptido de la invención, haciéndolo inaccesible a un sustrato del polipéptido. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, péptidos pequeños o moléculas de tipo peptídico pequeñas. Las moléculas pequeñas pueden imitar la estructura de un sustrato del polipéptido de acuerdo con la invención.

La invención también comprende ensayos de exploración de alto rendimiento (HTS) para identificar compuestos que interaccionan con o inhiben la actividad biológica (es decir, afectan a la actividad enzimática) de un polipéptido que tiene actividad de toxina. Los ensayos de HTS permiten la exploración de grandes números de compuestos de una manera eficaz. Los ensayos de HTS están diseñados para identificar “aciertos” o “compuestos candidatos” que tienen la propiedad deseada, a partir de los que pueden diseñarse modificaciones para mejorar la propiedad deseada. La modificación química del “acierto” o “compuesto candidato” se basa con frecuencia en una relación estructural/de actividad identificable entre el “acierto” y el polipéptido de toxina.

Los antagonistas del polipéptido de la invención pueden utilizarse para proteger animales de la enfermedad añadiéndolos al alimento o la bebida de los animales. Dicho tratamiento puede reducir la carga de organismos derivados de ambiente activos a los que está expuesto el animal. En consecuencia, la invención proporciona alimento y/o bebida que comprende un antagonista del polipéptido de la invención. El antagonista puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que se une con un polipéptido de la invención. La presente invención también proporciona el uso de alimento y/o bebida que comprende dichos antagonistas para reducir la infección y/o colonización de un animal con una bacteria que exprese un polipéptido de la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1. Toxina NetB de *Clostridium perfringens*

##### Secuenciación del gen que codifica NetB

Se usaron 10 µg de ADN genómico aislado de la cepa de *Clostridium perfringens* EHE-NE18 para obtener lecturas de secuencia, contig y puntuaciones de calidad de secuencia. Una secuencia de aminoácidos se dedujo de la secuencia de nucleótidos. Se realizó predicción de un péptido señal usando el programa SignalP v 3.0 (Bendtsen *et al*, 2004). Se buscaron secuencias homólogas de la secuencia de aminoácidos deducida usando el programa BLAST con huecos (Altschul *et al*, 1997).

Las secuencia de nucleótidos del gen que codifica NetB se proporciona como SEC ID N°: 1 y la secuencia de aminoácidos de NetB que incluye la secuencia señal se proporciona como SEC ID N°: 3. La secuencia del péptido señal se escinde de la proteína secretada madura (SEC ID N°: 2). Una búsqueda de BLAST identificó que la toxina beta de *C. perfringens* compartía menos del 39% de identidad con NetB (Figura 1).

##### Purificación de NetB recombinante y generación de antisueros anti rNetB de conejo

El gen *netB* se amplificó por PCR y se clonó en pENTR/SD/D-TOPO y se subclonó, en fase, en el vector de expresión pDest41BA. La proteína se purificó en una columna de afinidad de níquel seguido de filtración en gel (S200). Las fracciones máximas se agruparon y el TEV se escindió y se volvió a cargar en una columna de níquel para retirar la proteína no escindida y el TEV. La proteína recombinante (~1,3 mg) se envió a Chemicon para la producción de anticuerpos (Chemicon-Millipore, CA, Estados Unidos). El antisuero anti rNetB se usó en análisis de transferencia de Western de cepas de *C. perfringens* y para estudios de neutralización.

##### Purificación de NetB nativo

Se cultivó *C. perfringens* EHE-NE18 en caldo de TPG hasta DO600 nm de 0,6. Se obtuvo sobrenadante de cultivo (3 l) por centrifugación a 18.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se concentró 5 x usando ultrafiltración (Amicon 8400) a través de una membrana de 10 kDa (DIAFLO® YM10-76 mm, Amicon) seguido de precipitación

con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40% (p/v) a 4 °C durante una noche y se separó por centrifugación a 18.000 g durante 2 horas a 4 °C. El precipitante que contenía la toxina se concentró 20 veces (100 veces en total) y se dializó frente a Tris-HCl 10 mM pH 7,2 durante 48 horas a 4 °C. Las proteínas se sometieron a cromatografía en resina de intercambio aniónico de Sepharose Q FF (GE) con tampón Tris (pH 8,5) y se recogió el flujo continuo.

### 5 Ejemplo 2. Generación de cepa mutante de *C. perfringens* que carece de la toxina

Se llevaron a cabo manipulaciones de ADN de acuerdo con técnicas convencionales. Los oligonucleótidos usados en la construcción de plásmido suicida fueron AKP60 (SEC ID N°: 7), AKP61 (SEC ID N°: 8), AKP58 (SEC ID N°: 9) y AKP59 (SEC ID N°: 10). Todos los productos amplificados se clonaron en el vector de clonación sistema de vector pGEM®-T Easy (Promega) y se subclonaron posteriormente según fue necesario. El plásmido suicida, de delección parcial, marcado, pALK16, se construyó clonando fragmentos de la región del gen *netB* en uno de los lados del casete *catP* en pALKI y dio como resultado una delección de 541 pb del gen *netB*. En primer lugar, un fragmento *MfeI-SpeI* de 1490 pb amplificado usando AKP60 y AKP61 se clonó direccionalmente en los sitios de *EcoRI-SpeI* de pALKI, seguido de clonación de un fragmento de *BamHI-NheI* de 1937 pb usando AKP58 y AKP59 en los sitios *BamHI-NheI* del plásmido resultante. Finalmente *ermB* y *oriT* amplificados a partir de pJIR1457 se clonaron con extremos romos en el sitio *SmaI*. El plásmido suicida final pALK16 se introdujo en la cepa de *C. perfringens* EHE-NE18 como se ha descrito previamente (Scott y Rood, (1989)). Después de cultivo a 37 °C en TSC complementado con tiamfenicol, las colonias se interconectaron en TSC complementado con eritromicina para confirmar que se había producido un acontecimiento de doble cruce. Las colonias que crecieron con los antibióticos apropiados se seleccionaron para análisis adicional. Se preparó ADN cromosómico y se usó análisis de PCR y transferencia de Southern para confirmar que los mutantes derivaron de acontecimiento de doble cruce dentro de la región del gen *netB*. El plásmido de complementación, pALK20, se construyó clonando el gen *netB* de longitud completa en el vector lanzadera de *C. perfringens* pJIR1457 y se introdujo en ambos mutantes. La complementación se confirmó usando selección de eritromicina y ensayando en un ensayo de citotoxicidad. Se muestra un diagrama esquemático de la región cromosómica NE18- $\Delta netB$  en la Figura 2.

### 25 Ejemplo 3. Ensayo de actividad de NetB

Se realizó un ensayo de citotoxicidad en el sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* EHE-NE18. Se cultivaron células LMH hasta el 70% de confluencia en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina 0,2% y se cultivaron en medio EMEM a 37 °C. Se añadió sobrenadante de cultivo al medio con una dilución doble en toda la placa hasta 1:32 y se incubó durante hasta 16 horas a 37 °C. Las células LMH incubadas en presencia de medio de cultivo TPG puro (Figura 3a); sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* EHE-NE18, dilución 1:16 (Figura 3b); sobrenadante de cultivo de cepa de enteritis no necrótica de *C. perfringens* JIR325 13, dilución 1:2 (Figura 3c); o sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* NE18-M1 (mutante de *plc* que no expresa toxina alfa), dilución 1:16 (Figura 3d). Se observaron efectos citopáticos (CPE) en un microscopio óptico a aumento 100 x.

Las células normales (Figura 3a) parecen sanas, sin embargo, la adición de sobrenadante de cultivo de una cepa productora de NetB provoca que las células se redondeen y mueran (Figura 3b). El sobrenadante de una cepa que no expresa NetB no afectó a las células (Figura 3c). La delección del gen de toxina alfa no afecta a la capacidad del sobrenadante de cultivo para destruir células (Figura 3d).

### Ejemplo 4. Complementación de mutantes de toxina *netB* de *C. perfringens*

La cepa de *netB1* con NE18 suprimido (cepa *netB* negativa) se complementó con el plásmido de complementación de *netB* pALK20. La cepa complementada de *C. perfringens* se ensayó después con respecto a actividad de toxina. Para el ensayo de citotoxicidad, se cultivaron células LMH hasta un 70% de confluencia en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina al 0,2% y cultivadas en medio EMEM a 37 °C. Se añadió sobrenadante de cultivo al medio con una dilución doble en toda la placa hasta 1:32 y se incubó durante hasta 16 horas a 37 °C. Las células LMH se incubaron con: sobrenadante de cultivo de EHE-NE18, dilución 1:16 (Figura 4a); sobrenadante de cultivo de *netB1* con NE18 suprimido, dilución 1:2 (Figura 4b); sobrenadante de cultivo de pJIR1457 + *netB1* con NE18 suprimido (plásmido lanzadera), dilución 1:2 (Figura 4c); sobrenadante de cultivo de *netB1* con NE18 suprimido + pALK20 (plásmido de complementación de *netB*), dilución 1:16 (Figura 4d); medio de cultivo de TPG puro (Figura 4e); o NetB recombinante purificado en columna, dilución 1:8 (Figura 4d).

La delección del gen *netB* anuló la actividad de destrucción en el ensayo de cultivo celular. La complementación del mutante con el gen clonado en un plásmido restauró la actividad de destrucción. La proteína NetB recombinante destruye las células cultivadas.

### Ejemplo 5. Ensayo cuantitativo de destrucción celular por proteína de toxina

Para determinar la capacidad de NetB para destruir las células, se realizó un ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa en células LMH tratadas con NetB. Las células LMH se cultivaron hasta el 70% de confluencia en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina 0,2% y se cultivaron en medio EMEM a 37 °C. Se añadió NetB semipurificado de NE18-M1 al medio con dilución doble en toda la placa hasta 1:128 y se incubó durante 4 horas a 37 °C. El LDH liberado en el sobrenadante se midió como un indicador de la citolisis con un kit Cyto-Tox (Promega) y se proporcionó como un porcentaje de citotoxicidad. Cada dilución se realizó por triplicado y se calculó el ETM para

cada dilución (Figura 5).

#### Ejemplo 6. Cepas mutantes de *netB* en un modelo de enfermedad de pollo

Se expusieron grupos de 11 aves a la cepa de tipo silvestre de *C. perfringens* (NE18) o mutantes con *netB* suprimido de la cepa (NE18-NetB-M1 y NE18-NetB-M2) a 20 y 21 días de edad. A los 24 días de edad se realizó una necropsia de las aves para puntuar las lesiones necróticas en el intestino. Se recogieron segmentos del íleon o el yeyuno que medían aproximadamente 2-4 cm en formalina tamponada con fosfato sódico neutro al 10%. Se tomaron secciones transversales de muestras intestinales pequeñas a intervalos de 4 mm y se procesaron los segmentos a bloques incluidos en parafina para una histología rutinaria y se cortaron a 4-5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Se examinaron los portaobjetos de histología por microscopía óptica. Los intestinos se puntuaron de acuerdo con el número de lesiones necróticas: 0 - sin lesiones, 1 - intestinos de pared fina y quebradizos, 2 - necrosis focal o ulceración (1-5 focos), 3 - necrosis focal o ulceración (6-15 focos), 4 - necrosis focal o ulceración (16 o más focos), 5 - manchas de necrosis de 2-3 cm de longitud, 6 - necrosis difusa típica de casos sobre el terreno. La cepa de tipo silvestre mostró un nivel significativo de enfermedad mientras que ninguno de los mutantes aislados de forma independiente mostró ninguna señal de enfermedad. Se ha concluido que NetB es un factor de virulencia importante necesario para la patogénesis de enfermedad.

**Tabla 2. Las cepas mutantes de NetB han reducido la virulencia en un modelo de enfermedad de pollo.**

Nº de Ave	Cepa de exposición		
	NE18	NE18-NetB-M1	NE18-NetB-M2
1	3	0	0
2	2	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	4	0	0
7	2	0	0
8	3	0	0
9	0	0	0
10	3	0	0
11	0	0	0
Puntuación de lesión promedio	1,55	0	0
Nº de aves afectadas en el grupo	6	0	0
Peso ponderado - Nº X Promedio	9,3	0	0

#### Ejemplo 7. Estudio con respecto a toxina en cepas de *C. perfringens*

##### Estudio de PCR con respecto a toxina en cepas de *C. perfringens*

La presencia del gen *netB* en cepas EN y no EN de *C. perfringens* se investigó por PCR. Para cada una de las cepas de *C. perfringens* ensayada se suspendió una única colonia en 0,1 ml de agua destilada y se hirvió durante 10 minutos y después se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se recogieron y se usaron como ADN molde en PCR. Se realizó PCR en un total de 25  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción que contenía: tampón de PCR 1 x (sin  $\text{Mg}^{2+}$ ),  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, mezcla de dNTP 0,2 mM; 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq Go (Promega); 50 pM de los cebadores AKP78 y AKP79; y 5  $\mu\text{l}$  de solución de molde. Se usaron las siguientes condiciones en la PCR: desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; hibridación a 55 °C durante 30 segundos; y extensión a 72 °C durante 1 minuto; con la etapa de extensión final a 72 °C durante 12 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% como se muestra en la Figura 6: a. cepas de EN; b. cepas no EN. El fragmento de 384 pb de *netB* se ve en la mayoría de las cepas de *C. perfringens* aisladas de pollos enfermos de enteritis necrótica. El fragmento de PCR específico de *netB* no se ve en ninguna otra cepa. Esto indicó que la presencia del gen *netB* era un buen indicador de la virulencia de *C. perfringens* en pollos y dicho ensayo puede usarse para detectar cepas potencialmente virulentas.

Estudio de transferencia de Western con respecto a la presencia de toxina en cepas de *C. perfringens*

Se cultivaron cepas de *C. perfringens* en caldos de cultivo de TPG previamente hervidos hasta DO600 nm ~0,6. Se obtuvo sobrenadante de cultivo por centrifugación a 18.000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se separaron por SDS-PAGE (gel de Bis-Tris 4-12% NuPAGE® Novex, Invitrogen) en tampón de ejecución MES SDS (Tampón de Ejecución MES SDS NuPAGE®, Invitrogen). Se transfirieron proteínas a una membrana de PDVF (Millipore) y se exploraron con anticuerpo policlonal de conejo anti rNetB (Chemicon, Estados Unidos). Se desarrollaron transferencias con kit de Transferencia de Western ECL (Amersham Biosciences, NJ, Estados Unidos) y los resultados se registraron en película autorradiográfica como se muestra en la Figura 7. Los paréntesis indican cepas de *C. perfringens* EN y no EN. Los resultados de transferencia de Western confirmaron los resultados del estudio de PCR, el gen y la proteína están presentes en la mayoría de cepas derivadas de EN pero no en las cepas no EN. Este método de detección basado en anticuerpos es otro modo de detectar cepas potencialmente virulentas.

**Ejemplo 8. Eficacia protectora de la vacuna de subunidad NetB recombinante**

La eficacia de la proteína NetB recombinante (SEC ID N°: 2) cuando se suministró como una vacuna subunitaria se ensayó en un ensayo de vacunación.

15 Ensayo de vacunación 1193-4

Se vacunaron pollos Ross 308 broiler (Aviagen) con 50 µg de NetB recombinante como antígeno por dosis en 0,5 ml de adyuvante de hidróxido de aluminio. Las aves se vacunaron el día 7 y el día 14 y se expusieron los días 20 y 21 a 1,5 ml de dosis oral de la cepa de *Clostridium perfringens* EHE-NE18. Para aumentar la susceptibilidad de las aves a enteritis necrótica se les alimentó con una dieta alta en proteínas que contenía harina de pescado durante el periodo de exposición. Las aves se sacrificaron y se sometieron a necropsia el día 25 para puntuar las lesiones del intestino de enteritis necrótica.

Las lesiones se puntuaron de acuerdo con el siguiente esquema:

- 0 Sin lesiones
- 1 Intestinos de pared fina y quebradizos
- 2 Necrosis o ulceración focal (1-5 focos)
- 3 Necrosis o ulceración focal (6-15 focos)
- 4 Necrosis o ulceración focal (16 o más focos)
- 5 Manchas de necrosis de 2-3 cm de longitud
- 6 Necrosis difusa típica de casos sobre el terreno

Resultados

25 Se proporciona una puntuación de lesión promedio de los pollos vacunados con antígeno recombinante de NetB y pollos de control de adyuvante en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Puntuación de lesión promedio de pollos vacunados con antígeno recombinante NetB.

Grupo	Número de aves	Puntuación de lesión promedio	Número afectado (Normalizado al grupo de 10)	Número x promedio (Normalizado al grupo de 10)
Control de adyuvante (exposición a NE18)	27	1,74	5,93	12,37
Vacunado con NetB (exposición a NE18)	18	0,21	2,1	0,46

30 El análisis estadístico de las puntuaciones de lesión usando un ensayo de Mann-Whitney muestra que la diferencia entre el grupo vacunado con NetB y el grupo de control de Adyuvante es estadísticamente significativa a más de 95% de confianza.

**Ejemplo 9. Análisis de transferencia de Western de sueros de aves vacunadas**

35 Se analizaron los sueros de pollos vacunados por transferencia de Western para determinar si los pollos producían anticuerpos del suero para la proteína NetB. Se cargaron 4 µg de antígeno de NetB recombinante por pocillo en un gel de poliacrilamida y se sometió a SDS-PAGE. La proteína se transfirió a membrana de PVDF por Transferencia

de Western. Se diluyeron sueros de aves vacunadas 1:1000 en leche desnatada al 5% en TBS/Tween 20 0,5% y se incubó con la membrana a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana se lavó 3 veces con TBS/Tween 20 0,5% y posteriormente se incubó con anticuerpos de cabra anti HRP de pollo (KPL; Cat N° 14-24-06; Lote N° 050860) diluidos 1:10.000 en leche desnatada al 5% en TBS/Tween 20 0,5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación la membrana se lavó 3 veces con TBS/Tween 20 0,5%. Se detectaron anticuerpos secundarios marcados con HRP con reactivos de transferencia de Western GE Healthcare ECL (Cat N° RPN2106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mayoría de las aves vacunadas con NetB recombinante produjeron anticuerpos del suero para la proteína NetB (Figura 8) lo que indica que la vacuna usada fue capaz de inducir una respuesta inmunitaria significativa al antígeno de NetB.

10 **Ejemplo 10. Repetición de vacunación y procedimiento de exposición**

Ensayo de vacunación 1219-1

Los resultados producidos en el ensayo 1193-4 se ensayaron con respecto a reproductibilidad repitiendo la vacunación y el procedimiento de exposición con un lote preparado independientemente de proteína NetB recombinante. Los resultados del ensayo repetido se proporcionan en la Tabla 4.

15 **Tabla 4.** Grupo vacunado con NetB frente a control de adyuvante.

Grupo	Número de aves	Puntuación de lesión promedio	Número afectado	Número x Promedio (Normalizado al grupo de 10)
Control de adyuvante (exposición a NE18)	9	2,33	7	18,1
Vacunado con NetB (exposición a NE18)	11	0,64	3	1,74

El análisis estadístico de las puntuaciones de lesión usando un ensayo de Mann-Whitney mostró que la diferencia entre el grupo vacunado con NetB y el grupo de control Adyuvante fue estadísticamente significativa a más del 95% de confianza.

20 Ensayo de vacunación 1250-1

Usando el mismo protocolo de vacunación y exposición que los ensayos previos, se miden los pesos en vivo de las aves en el momento de la necropsia. Se proporciona el peso promedio de cada una de las aves de control negativo, de control positivo y vacunadas con NetB en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Peso en vivo de aves vacunadas con NetB frente al grupo de control positivo.

Grupo	Número de aves	Peso promedio (g)	Desviación Típica (g)
Control negativo (Sin exposición)	23	930	105,5
Control positivo (exposición a NE18)	22	798	107,5
Vacunado con NetB (exposición a NE18)	22	914	85,7

25 El análisis estadístico usando un ensayo de t para muestras no emparejadas de los pesos de las aves muestra que la diferencia de peso entre el grupo vacunado con NetB y el grupo de control positivo es estadísticamente significativa a más del 99% de confianza ( $P = 0,0004685$ ). Las aves vacunadas se protegieron de la restricción en el aumento de peso que afecta a las aves expuestas a control positivo, no protegidas.

30 **Ejemplo 11. Eficacia protectora de vacunas basadas en NetB alternativas**

En el ensayo de vacunación 1250-1, se ensayaron varias vacunas alternativas. Las vacunas alternativas fueron: bacterina más NetB; vector vivo de *E. coli* que expresa NetB; y *C. perfringens* viva (con supresión de *netB*). Las vacunas alternativas se describen posteriormente y se proporciona el peso en vivo de aves vacunadas frente a grupo de control positivo en la Tabla 6.

Bacterina más NetB

5 Se preparó un cultivo de una noche de la cepa de *C. perfringens* EHE-NE18 (400 ml de TPG). El cultivo se centrifugó y se conservó el sedimento celular y las fracciones de sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 20 ml de solución salina tamponada con fosfato, se sonicó para romper las células y después se trató con formaldehído al 0,3%. El sobrenadante se concentró por ultrafiltración hasta un volumen de 20 ml y después se trató con formaldehído al 0,3%. Se combinaron volúmenes iguales del sedimento celular tratado, el sobrenadante y soluciones adyuvantes y se añadió proteína NetB recombinante a una concentración final de 100 µg/ml. Se usaron 0,5 ml de esta vacuna formulada por vía subcutánea por ave por vacunación.

Vector vivo de *E. coli* que expresa NetB

10 Se transformó la cepa de *E. coli* CCEC31rn (como se describe en el documento WO 2007/025333) con un plásmido que expresaba *netB* de su promotor nativo. NetB se expresa de forma constitutiva a partir del plásmido. Se dosificó por vía oral a cada ave 0,5 ml de un cultivo de una noche (caldo de cultivo Luria) el día 2.

*C. perfringens* vivas (con supresión de *netB*)

15 Se cultivó un mutante con *netB* suprimido derivado de *C. perfringens* EHE-NE18 en caldo de cultivo de tioglicolato fluido y se inocularon por vía oral 0,5 ml a aves de 2 días de edad.

**Tabla 6.** Peso en vivo de aves vacunadas frente al grupo de control positivo.

Grupo	Número de aves	Peso promedio (g)	Desviación Típica (g)
Bacterina más NetB	21	895	97
Vector vivo de <i>E. coli</i> que expresa NetB.	23	877	127,5
<i>C. perfringens</i> viva (con supresión de <i>netB</i> )	23	924	101

20 El análisis estadístico usando un ensayo de t para muestras no relacionadas de los pesos de las aves muestra que la diferencia de peso entre el grupo vacunado con Bacterina más NetB y el grupo de control positivo es estadísticamente significativa a más del 99% de confianza (P= 0,003879), la diferencia de peso entre el vector vivo de *E. coli* que expresa el grupo vacunado con NetB y el grupo de control Positivo es estadísticamente significativa a más del 95% de confianza (P= 0,0217605) y la diferencia de peso entre la cepa de *C. perfringens* viva con grupo vacunado con el gen *netB* suprimido y el grupo de control positivo es estadísticamente significativa a más del 99% de confianza (P= 0,0003855). Estos resultados indican que las diferentes vacunas pueden proteger todas a las aves de la restricción en el aumento de peso que se ve en las aves expuestas no vacunadas.

25 Se apreciará por los expertos en la materia que pueden realizarse numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se muestra. Las presentes realizaciones deben considerarse, por lo tanto, en todos los sentidos ilustrativas y no restrictivas.

30 Cualquier análisis de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es solamente para el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe interpretarse como una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos formen parte de la base técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante a la presente invención como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

Referencias

- 35 Altschul, *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-3402.
- Awad, *et al.* (1995) *Mol Microbiol*, 15: 191-202.
- Bendtsen, *et al.* (2004) *J Mol Biol*, 340: 783-795.
- Bhugaloo-Vial, *et al.* (1996) *Appl Environ Microbiol*, 62: 4410-4416.
- Boman, (1995) *Annu Rev Immunol*, 13: 61-92.
- 40 Boman, (2003) *J Intern Med*, 254: 197-215.
- Cardoso, *et al.* (1996). *Virology*, 225: 293-9.
- Cho, *et al.* (2000) *Curr Microbiol*, 40: 257-263.

- Conry, *et al.* (1994). *Cancer Research*, 54: 1164-68.
- Cowen, *et al.* (1987) *Avian Dis*, 31: 904-906.
- Craven, *et al.* (1999) *Avian Dis*, 43: 484-490.
- Ennahar *et al.* (2000) *FEMS Microbiol Rev*, 24: 85-106.
- 5 Fynan, *et al.* (1993) *Proc Nati Acad Sci USA*, 90: 11478-82.
- Gabay, *et al.* (1989) *Proc Nati Acad Sci USA*, 86: 10183.
- Gruber *et al.* (1994) *J Immunol* 152:5368.
- Harayama, (1998) *Trends Biotechnol*, 16: 76-82.
- Hollinger *et al.* (1993) *Proc Nati Acad Sci USA* 90: 6444-6448.
- 10 Hood y Jilka (1999) *Current Opinions in Biotechnology*, 10: 382-6. 20
- Ingham, *et al.* (2003) *J Antimicrob Chemother*, 51:1365-1371.
- Jack, *et al.* (1995) *Microbiol Rev*, 59: 171-200.
- Kaldhusdal, (1999) *FEMS Immunol Med Microbiol*, 24: 337-343.
- Kapustra, *et al.* (1999) *FASEB Journal*, 13: 1796-99.
- 15 Kozbor *et al.* (1985) *J Immunol Methods*, 81: 31-42. 25
- Liu, *et al.* (2005) *Appl Environ Microbiol*, 71 -6769-6775.
- Milstein y Cuello, (1983) *Nature*, 305: 537-539.
- Modelska, *et al.* (1998). *Proc Nati Acad Sci USA*, 95: 2481-85.
- Montgomery, *et al.* (1993) *DNA and Cell Biology*, 12: 777-83.
- 20 Morrison (1994) *Nature* 368: 812-13. JO
- Munson y Pollard, (1980) *Anal Biochem*, 107: 220.
- Myers y Miller (1989) *CABIOS*, 4: 11-17.
- Nahashon, *et al.* (1994) *Poult Sci*, 73: 1552-1562.
- Needleman, y Wunsch, (1970) *J Mol Biol*, 48: 443-453.
- 25 Palacios, *et al.* (2005) *J Appl Microbiol*, 98: 229-237.
- Scott y Rood (1989) *Gene*, 82: 327-333.
- Songer, *et al.* (1997) *Trends Microbiol*, 5: 156-161.
- Soravia, *et al.* (1988) *FEBS Lett*, 228: 337-340.
- Trauneker *et al.* (1991) *EMBO J*, 10:3655-3659.
- 30 Tschirdewahn, *et al.* (1991) *Int J Food Microbiol*, 14: 175-178.
- Tutt *et al.* (1991) *J Immunol* 147: 60
- Vohra y Satyanarayana, (2003) *Crit Rev Biotechnol*, 23: 29-60.
- Wahl, *et al.* (1987) *Methods Enzymol*, 152: 399-407.
- Yang, *et al.* (1997) *Vaccine*, 15: 888-91.

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido sustancialmente purificado y/o recombinante, en el que el polipéptido comprende:

- i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEC ID N°: 2,
- ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a SEC ID N°: 2, y/o
- 5     iii) un fragmento antigénico de i) o ii);

en el que i), ii) y iii) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria contra la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEC ID N°: 2.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene actividad de toxina, o el polipéptido tiene actividad de toxina reducida en comparación con un polipéptido codificado por SEC ID N°: 2, o el polipéptido es un toxoide.

3. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEC ID N°: 2 y/o un fragmento antigénico del mismo, en el que el polipéptido o fragmento antigénico del mismo es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEC ID N°: 2.

4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento antigénico es de al menos 10 aminoácidos de longitud.

5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento antigénico es de al menos 20 aminoácidos de longitud.

6. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento antigénico es de al menos 60 aminoácidos de longitud.

7. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento antigénico es de al menos 100 aminoácidos de longitud.

8. Un polinucleótido aislado y/o recombinante que comprende:

- i) una secuencia de nucleótidos como se proporciona en SEC ID N°: 1,
- ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y/o
- iii) una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 1,

en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEC ID N°: 2.

9. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8.

10. Una célula hospedadora que comprende el polipéptido recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el polinucleótido recombinante de la reivindicación 8 y/o el vector de la reivindicación 9.

11. Un método para producir un polipéptido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 10, o un vector de la reivindicación 9 que codifica dicho polipéptido, en condiciones que permiten la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido, y aislar dicho polipéptido.

12. Un anticuerpo sustancialmente purificado que se une específicamente con un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

13. Una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el polinucleótido de la reivindicación 8, el vector de la reivindicación 9, la célula hospedadora de la reivindicación 10, y/o el anticuerpo de la reivindicación 12.

14. Una vacuna que comprende un antígeno, en la que el antígeno comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

15. Una vacuna de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que tras la administración a un sujeto el polipéptido se expresa y se produce una respuesta inmunitaria al polipéptido.

16. Un método para atenuar la virulencia de una bacteria que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 2, comprendiendo el método mutar una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido para reducir la expresión y/o actividad de toxina del polipéptido, por lo que la bacteria atenuada tiene actividad de toxina reducida en comparación con la bacteria no atenuada.
- 5 17. Un método para determinar si un sujeto se ha expuesto a un patógeno que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 2 y/o que expresa un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a SEC ID N°: 1, en el que el método comprende determinar la presencia o ausencia del polipéptido en una muestra obtenida del sujeto, determinar la presencia o ausencia de anticuerpos en la muestra que se unen específicamente con el polipéptido y/o
- 10 determinar la presencia o ausencia del polinucleótido en una muestra obtenida del sujeto, en el que la presencia del polipéptido, los anticuerpos y/o el polinucleótido es indicativa de exposición al patógeno.
18. Alimento y/o bebida que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12.
- 15 19. Un organismo transgénico no humano que comprende un polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
20. Uso del polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el polinucleótido de la reivindicación 8, el vector de la reivindicación 9, la célula hospedadora de la reivindicación 10, la composición de la reivindicación 13, la vacuna de la reivindicación 14 o reivindicación 15, la bacteria producida por el método de la reivindicación 16 y/o el alimento y/o la bebida de la reivindicación 18 en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

```

netB      YYKGGIILKRLKIISITLVLTSVISTSLFSTQTOVFASELNDINKIELKNLSG--EIIKE 58
toxina-beta -----MKKKFISLVIVSSLLNGCLLSPTLVYANDIGKTTTITRNKTSBGYTIITQ 50
          :*  *:::*.* : . . : * *::*..... * :: * . *:::

netB      NGKEAIKYTSSDTAS--HRGWKATLSGTFIEDPHSDKKTALLNLEGFIPSDKQIFGSKY- 115
toxina-beta NDKQIISYQSVDSSSKNEDGFTASIDARFIDDKYSSEMTLINLTGFMSSKKEDVIKKYN 110
          *::.*.* *:::* . .::*::*.. *::* .:: *::*::* *::*.*.* . .::*

netB      -----YGKMKWPETYRINVKSADVNNIKIANSIPKNTIDKKDVSNSIGYSIGGNISVE 169
toxina-beta LHDVTNSTAINFPVRYSISILNESINENVKIVDSIPKNTISQKTVSNTMGYKIGGSIEIE 170
          :::* * .:: . .::*::*::*::*::*::*::*::* *::*::*::*::*::*

netB      GKTAGAGINASYNVONTISYEQPDFRTIQRKDDANLASWDIKFVETKDG-YNIDSYHAIY 228
toxina-beta KNKPKASIESEYAESSTIEYVQPDFSTIQTDRHSTSKASWDTKFTETTRGNYNLKSNPNVY 230
          . . . * .:::* . .::*.* *::* *::* . . . . . *::* *::* . * *::* . .::*

netB      GNQLFMKSRLYNN-GDKNFTDDRDLSTLISGGFSPNMALALTAPKNAKESVIIVEYQRFD 287
toxina-beta GNEMFMYGRYTNVPATENIIPDYQMSKLI TGGLNPNMSVVLTA PNGTEESI I KVKMERER 290
          *::*::* . * . . : * : * : *::*::*::*::*::*::*::*::*::* * : *

netB      NDYILNWETTQWRG--TNKLSSTS---EYNEFMFKINWQDHKIEYYL 329
toxina-beta NCYLLNNGANWVGQVYSRLAFDTFNVDSHIFTKINWLTHKVTAI- 336
          * * *::* : * * .::* : : : * *::* *::*
    
```

Figura 1

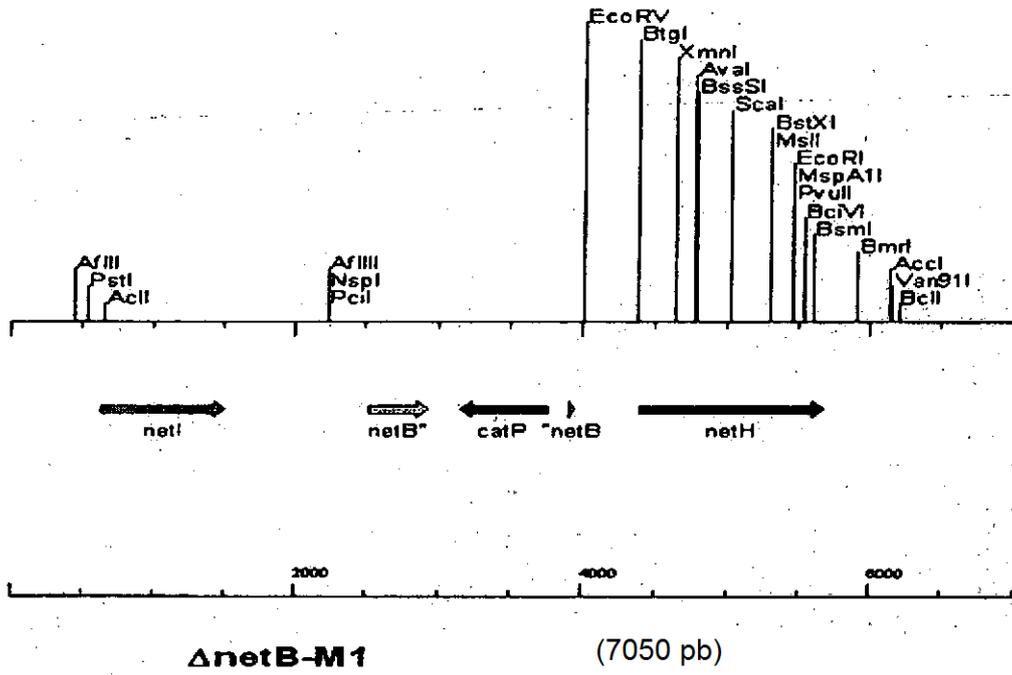
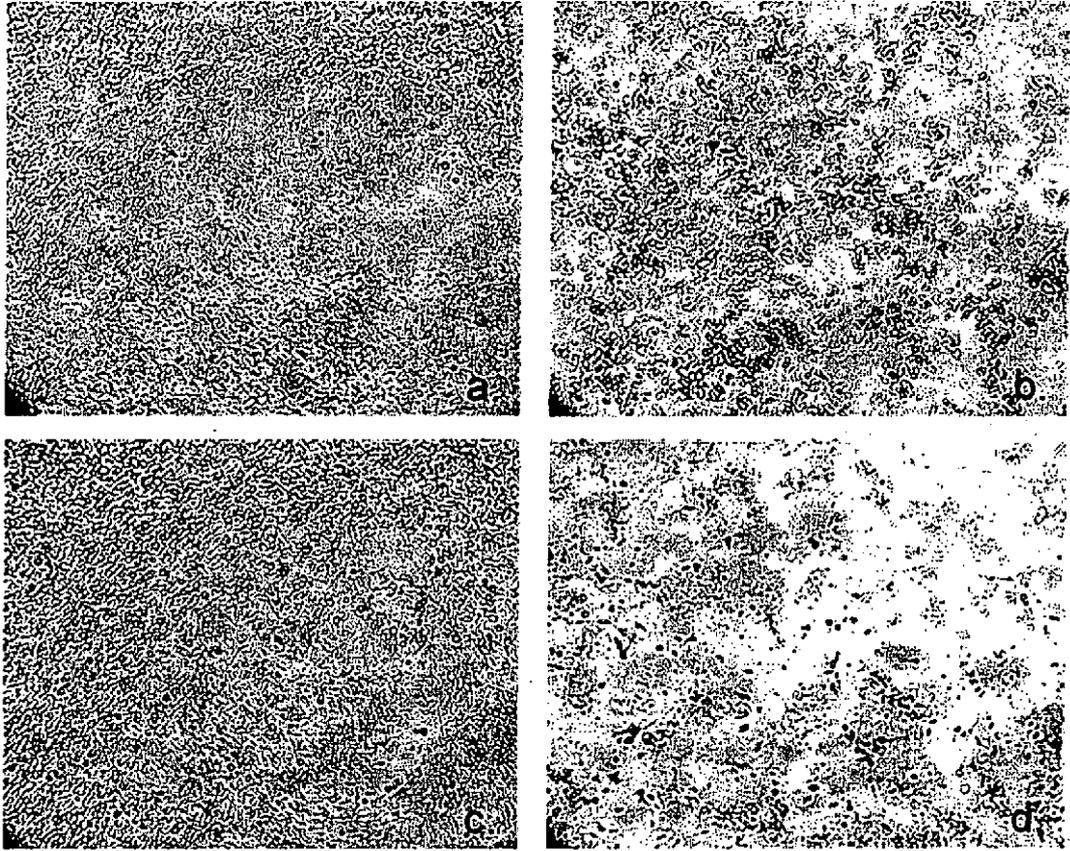
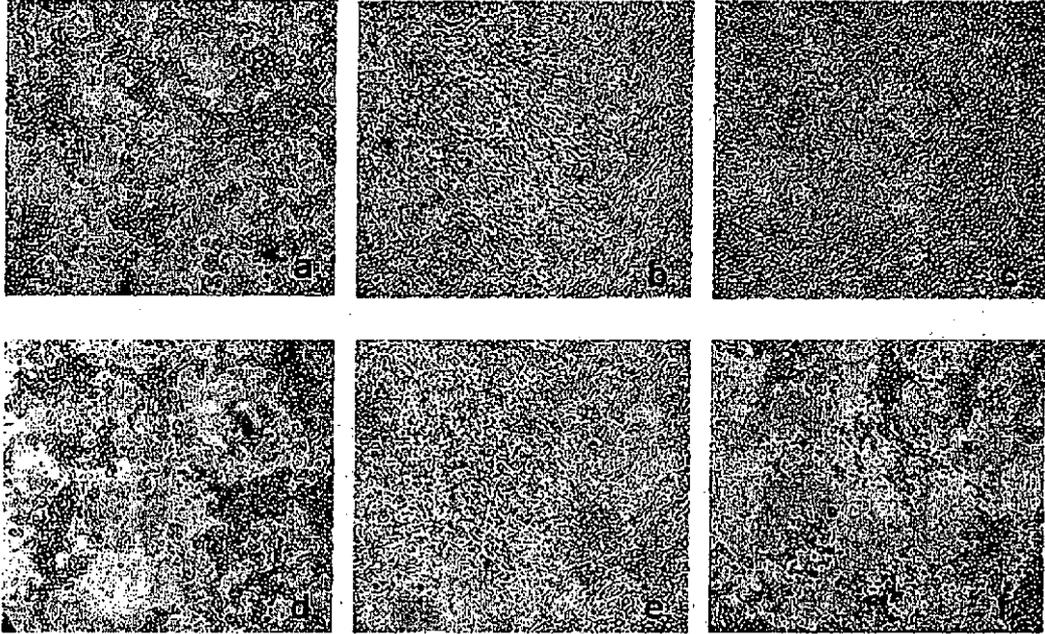


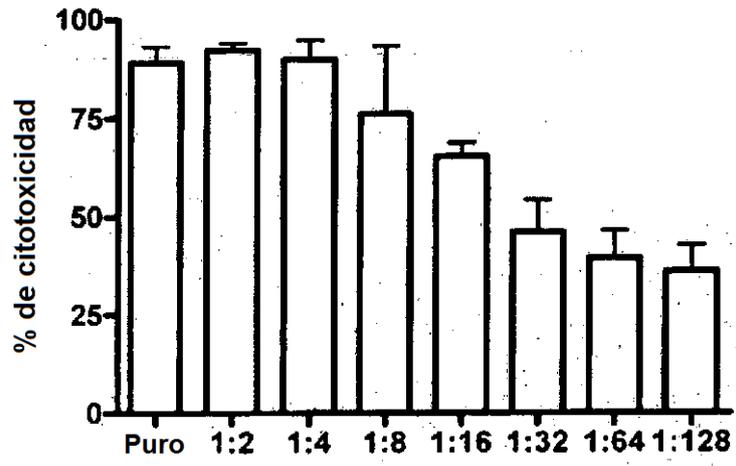
Figura 2



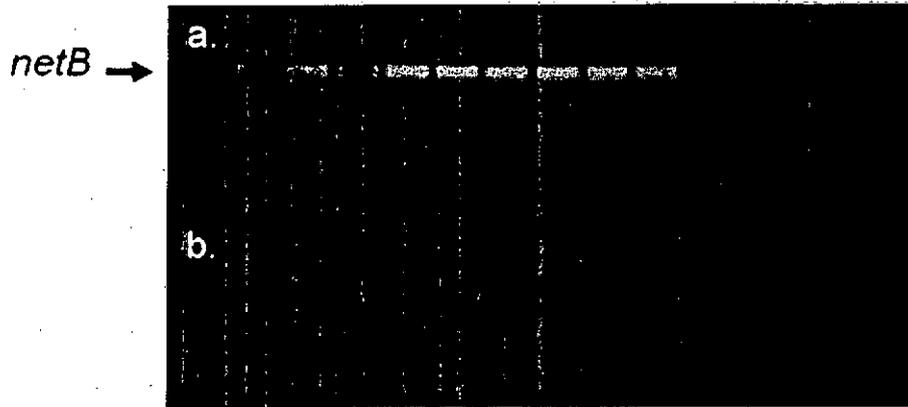
**Figura 3**



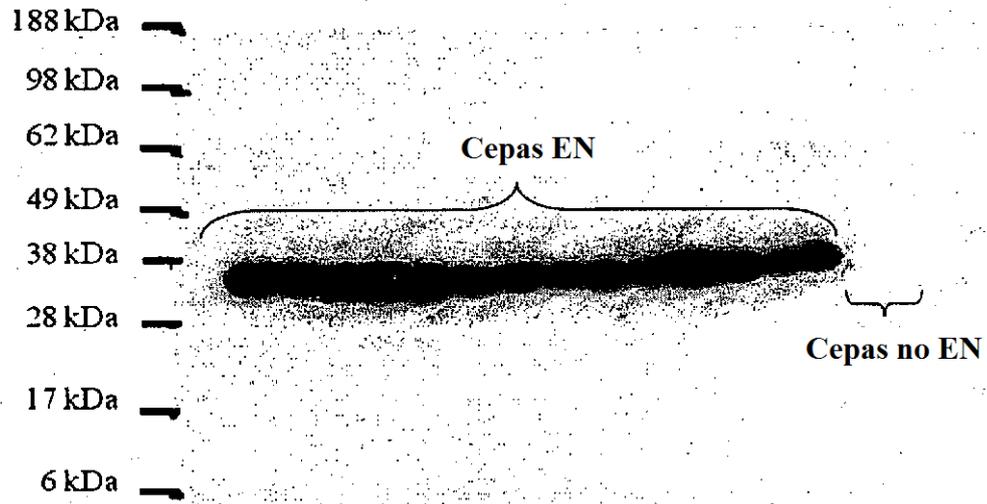
**Figura 4**



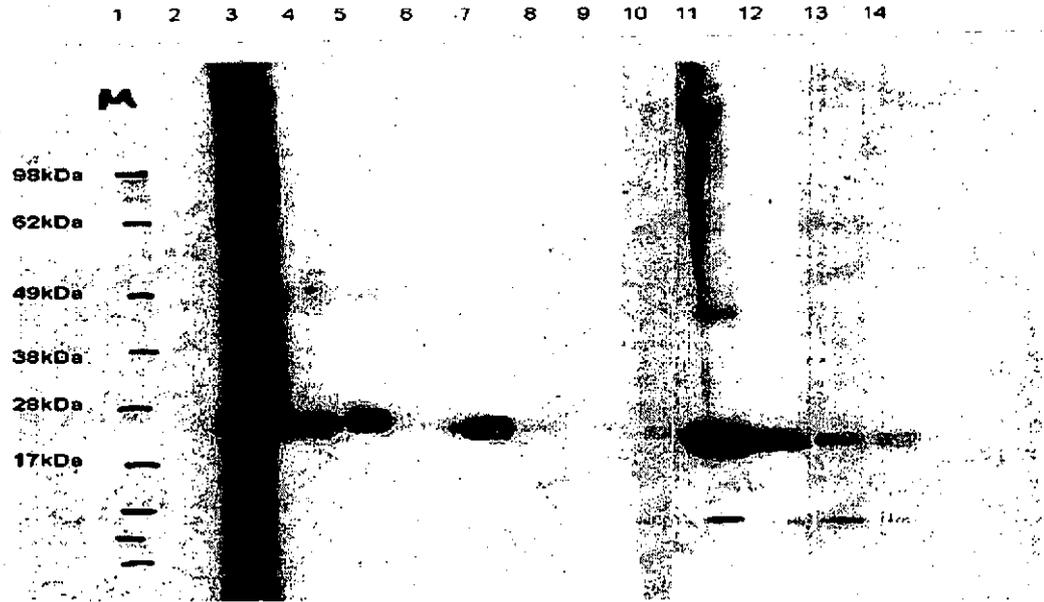
**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**