

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 401**

51 Int. Cl.:

A61K 39/08 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013** **PCT/GB2013/050821**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13144636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013** **E 13721021 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 2830655**

54 Título: **Epítomos de toxina épsilon de Clostridium perfringens con toxicidad reducida**

30 Prioridad:

29.03.2012 GB 201205599

05.04.2012 GB 201206169

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

13.10.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF EXETER (100.0%)
The Innovation Centre Phase 2 Rennes Drive
Exeter EX4 4RN, GB

72 Inventor/es:

TITBALL, RICHARD W.;
BOKORI-BROWN, MONIKA y
NAYLOR, CLAIRE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 637 401 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

Epítomos de toxina épsilon de *Clostridium perfringens* con toxicidad reducida

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos útiles como una vacuna frente a enfermedades causadas por, o asociadas a, la toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, particularmente en animales susceptibles de desarrollar enterotoxemia.

Antecedentes

La bacteria anaerobia gramnegativa esporulada baciliforme *Clostridium perfringens* es capaz de producir al menos 17 toxinas, lo que hace que *C. perfringens* sea una de las especies más patógenas del género *Clostridium*. Dependiendo de su capacidad para producir las cuatro toxinas típicas, a saber, las toxinas α , β , ϵ y ι , las cepas de *C. perfringens* se clasifican en uno de cinco toxinotipos, conocidos como los tipos A-E (Petit et al. (1999) Trends Microbiol, vol. 7, 104-110).

Además de las toxinas típicas, la bacteria es capaz de producir una diversidad de las denominadas toxinas menores, tales como β_1 , β_2 , δ , θ , λ , μ , ν y enterotoxina (Rood (1998) Annu. Rev. Microbiol. vol. 52, 333-360). La toxina épsilon (Etx) es producida por los toxinotipos B y D. Estas cepas son responsables de una grave enfermedad denominada enterotoxemia, que afecta predominantemente a las ovejas y a los corderos, pero también provoca infecciones en otras especies de rumiantes, incluyendo cabras y terneros (Songer (1996) Clin. Microbiol. Rev. vol. 9, 216-234). La enterotoxemia en los animales infectados de forma natural se caracteriza habitualmente por lesiones sistémicas en las ovejas y enterocolitis en las cabras.

El factor más importante en el inicio de la enfermedad es la sobreingestión de alimentos ricos en carbohidratos, dando como resultado la presencia de grandes cantidades de los mismos en el intestino. Esto da lugar a una alteración en el equilibrio microbiano del intestino delgado, dando lugar a la proliferación de *C. perfringens* y a la consecuente superproducción de la Etx. La toxina provoca un aumento en la permeabilidad intestinal, facilitando su entrada hacia el torrente sanguíneo y permitiendo su diseminación hacia los principales órganos objetivo, los riñones y el cerebro (McDonel (1980) Pharmacol Ther 10 (3): 617-655). Aquí, la intoxicación da como resultado una acumulación de líquido debida al aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. La acumulación en el sistema nervioso central da como resultado un trastorno neurológico que conduce rápidamente a la muerte (Finnie (2003) Aust. Vet. J. vol. 81, 219-221).

La Etx es expresada con una secuencia de señalización que dirige la exportación de la prototoxina desde la bacteria (McDonel (1986) en Pharmacology of bacterial toxins eds. Dorner & Drew, Pergamon Press, 477-517). En el desarrollo de la enfermedad, la relativamente inactiva prototoxina se convierte en la toxina activa mediante una escisión proteolítica en la luz intestinal, bien por parte de las proteasas digestivas del hospedador, tales como la tripsina y la quimotripsina (Bhown & Habeeb (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 78, 889-896), o bien mediante la proteasa λ de *C. perfringens* (Minami et al. (1997) Microbiol. Immun. vol. 41, 527-535). La activación proteolítica de la Etx también puede conseguirse *in vitro* mediante una proteólisis controlada (Hunter et al. (1992) Infect. Immun. vol. 60, 102-110). Dependiendo de la proteasa, la escisión proteolítica da como resultado la eliminación de los aminoácidos 10-13 amino-terminales y 22-29 carboxi-terminales (Bhown & Habeeb (1977); Minami et al. (1997)). La activación máxima se produce cuando se escinden ambos N- y C- terminales (Worthington & Mulders (1977) Infect. Immun. vol. 18, 549-551).

Se ha determinado la estructura tridimensional de la Etx (Cole et al. (2004) Nature Structural & Molecular Biology vol. 11, 797-798) y revela una molécula formada principalmente por laminas β , que puede ser dividida en tres dominios funcionales. El dominio I en el N-terminal contiene la región sugerida de interacción con el receptor. El dominio II en el centro contiene una horquilla β anfipática, que se ha predicho que juega un papel en la inserción en la membrana. El dominio III en el C-terminal contiene el péptido C-terminal, que debe ser eliminado para que se produzca la activación.

La toxina épsilon es una toxina formadora de poros β de tipo aerolisina (β -PFT), con los bucles de la horquilla β anfipática insertándose en la membrana para formar estructuras en barril β . El plegamiento global de la Etx muestra similitud con la estructura de la aerolisina de la bacteria gramnegativa *Aeromonas hydrophila* (Parler et al. (1994) Nature vol. 367, 292-295), con la parasporina-2 (PS) de *Bacillus thuringiensis* (Akiba et al. (2009) J. Mol. Biol. vol. 386, 121-133) y con una lectina formadora de poros, la LSL, de *Laetiporus sulphureus* (Mancheno et al. (2005) J. Biol. Chem. vol. 280, 17251-17259). Las similitudes estructurales entre estas toxinas son más sorprendentes en sus dos dominios C-terminales. Sus dominios N-terminales muestran una mayor variación estructural, que es probable que justifique sus diferencias en las especificidades de la célula objetivo y en las potencias (Bokori-Brown et al. (2011) FEBS J. vol. 278, 4589-4601).

En la aerolisina, se cree que los dos dominios amino-terminales (los dominios I-II) juegan un papel en la unión a las superficies celulares con funciones de solapamiento (MacKenzie et al. (1999) J. Biol. Chem. vol. 274, 22604-22609) y se ha sugerido que el dominio I de la Etx, que es equivalente al dominio II de la aerolisina, realiza una función

similar (Cole *et al.* (2004)), pero esto está todavía por demostrar. El dominio II de la aerolisina contiene los bucles de unión de 6-fosfato de manosa. Sin embargo, los residuos del dominio II implicados en la unión del manosa-6-fosfato en la aerolisina no están conservados en el dominio I de la Etx, lo que sugiere que es probable que la variación estructural en los dominios de unión al receptor N-terminales de todas estas toxinas justifique las diferencias entre sus especificidades de célula objetivo.

La Etx es única entre las β -PFT debido a que es muy potente y tiene una elevada especificidad celular. Debido a su elevada potencia, la Etx es considerada una potencial arma biológica para el terrorismo internacional por parte de los U.S. Government Centres for Disease Control and Prevention (Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Recommendations and Reports (2000) vol. 49, 1-14). La dosis letal al 50 % (DL₅₀) de la Etx en ratones después de la inyección intravenosa es normalmente de 100 ng/kg (Gill (1982) Microbiol. Rev. vol. 46, 86-94), lo que hace que la Etx sea la toxina clostridiana más potente después de la neurotoxina botulínica. La Etx también muestra una elevada especificidad celular. Entre las muchas líneas celulares ensayadas, solo se han identificado cuatro como susceptibles a la toxina. Estas incluyen las líneas celulares de riñón de perro (MDCK (Knight *et al.* (1990) Biologicals vol. 18, 263-270)), de ratón (mpkCCDcl4 (Chassin *et al.* (2007) Am. J. Physiol. Renal Physiol. vol. 293, F927-937)) y humanas (G-402 (Shortt *et al.* (2000) Hum. Exp. Toxicol. vol. 19, 108-116) y las ACHN (Ivie *et al.* (2011) PLoS ONE vol. 6, e17787)). La mayoría de los estudios *in vitro* con la Etx se han llevado a cabo mediante el uso de la línea celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), ya que esta línea celular es la más susceptible a la toxina (Payne *et al.* (1994) FEMS Microbiol. Lett. vol. 116, 161-167). Se indica que la dosis de la Etx necesaria para destruir el 50 % de las células MDCK (CT₅₀) es tan baja como de 15 ng/ml.

La unión de la Etx a las células MDCK está asociada con la formación de un complejo estable de alto peso molecular (Petit *et al.* (1997) J. Bacteriol. vol. 179, 6480-6487). Las células intoxicadas experimentan cambios morfológicos que incluyen un hinchamiento y una vesiculación de la membrana antes de la muerte de la célula (Petit *et al.* (1997) J. Bacteriol. vol. 179, 6480-6487). La rápida muerte de la célula introducida por la toxina y la especificidad de la toxina épsilon únicamente por unas pocas líneas celulares sugiere la presencia de receptor(es) específico(s) en las células objetivo. El mecanismo de unión de la Etx a las células no se conoce, pero los estudios de modificación química de la Etx han indicado previamente que es necesario un residuo de tirosina para la unión de la toxina a las células objetivo (Sakurai & Nagahama (1987) Toxicon vol. 25, 279-284). La toxicidad parece ser una consecuencia de la formación de poros en la membrana de la célula objetivo (Petit *et al.* (2001) J. Biol. Chem. vol. 276, 15736-15740).

Dado que la progresión de la enterotoxemia desde su inicio hasta la muerte puede ser rápida en los animales agrícolas, y dado el potencial de la Etx de ser usada como un arma biológica, existe una necesidad de identificar moléculas con un potencial uso como vacuna frente a la enfermedad causada por, o asociada con, la presencia de la Etx y/o causada por una infección por *C. perfringens*.

El documento WO2012/004645 se refiere a una vacuna contra una infección por *C. perfringens* que comprende la toxina épsilon con una sustitución Y71G. Oyston *et al.* (Microbiology (1998) vol. 144 págs. 333-341) y Pelish & McClain (J. Biol. Chem. (2009) vol. 284 págs. 29446-29453) desvelan varias variantes de la secuencia de la toxina épsilon.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido de un epítipo de una toxina épsilon de al menos aproximadamente 260 aminoácidos de longitud que consiste en aminoácidos contiguos desde la SEQ ID NO: 3 y que comprende la secuencia de aminoácidos RMEKYXPNAM (SEQ ID NO: 33) en la que "X" es cualquier aminoácido distinto a Y, siendo el polipéptido capaz de unirse a un anticuerpo que se une a la SEQ ID NO: 5 (toxina épsilon natural activada de *C. perfringens*) y teniendo una toxicidad reducida en comparación con la toxicidad de la SEQ ID NO: 5.

Según se establece en la siguiente Tabla 3, la SEQ ID NO: 2 es la toxina épsilon completa natural de *C. perfringens* y la SEQ ID NO: 3 es la misma secuencia, pero que carece de los primeros 32 aminoácidos. Esta secuencia SEQ ID NO: 3 es la secuencia publicada para la estructura cristalina (véase la base de datos del Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) en la www.rcsb.org/pdb; PDB ID: 1UYJ) y la numeración de los residuos de tirosina indicada en el presente documento es sobre la base de esta secuencia. La SEQ ID NO: 1 muestra una identidad de secuencia del 100 % con la SEQ ID NO: 3 desde el residuo 33 de la SEQ ID NO: 1 en adelante. Por lo tanto, las SEQ ID NO: 1 y 3 tienen una identidad del 90 % a nivel de la alineación global, cuando se determina según se indica a continuación.

Como se ha mencionado anteriormente, la SEQ ID NO: 5 es la toxina épsilon activada natural de *C. perfringens* que queda después de la escisión con una proteasa, con los N- y C-terminales eliminados. Las SEQ ID NO: 2 y 5 tienen una identidad de secuencia del 80 % a nivel de la alineación global, cuando se determina según se indica a continuación.

La SEQ ID NO: 22 es una secuencia equivalente a la SEQ ID NO: 5 pero con una mutación H>A en la posición 151 de la SEQ ID NO: 5 (mencionada en los siguientes ejemplos como la mutación H149A, con la diferencia en la

numeración de los residuos explicada a continuación). Esta es una variante de la toxina activada que puede ser estudiada en el laboratorio a nivel de la ACGM 2 (Oyston et al. (1998) Microbiol. vol. 144 (Pt 2), 333-341) y por lo tanto puede ser más conveniente en la práctica para la determinación de la unión al anticuerpo.

En algunas realizaciones, cuando la secuencia de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 3 comprende la posición 162 de la SEQ ID NO: 3, el aminoácido en esta posición está mutado a otro distinto de la histamina que se encuentra en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, puede ser sustituido por alanina. Esta es la mutación H149A descrita en cualquier parte del presente documento, y su inclusión aseguraría por partida doble que el polipéptido según la invención podría ser usado a nivel de la ACGM 2.

El nivel de toxicidad puede ser determinado según se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de la LDH basado en células MDCK.2. Los polipéptidos de la invención proporcionan protección cuando son administrados a un sujeto tal como una oveja, al sujeto frente al desarrollo de una enfermedad (tal como enterotoxemia) causada por una infección por *Clostridium perfringens* y/o causada por la presencia de la toxina épsilon activa (o asociada con la presencia de la toxina). Dicha protección puede ser parcial, mediante lo cual la probabilidad de que un sujeto individual en una población desarrolle la enfermedad se reduce, o completa, mediante lo cual el sujeto no desarrollará la enfermedad (es decir, la probabilidad de desarrollar una enfermedad causada por *C. perfringens* y/o por Etx es del 0 %).

El término "polipéptido del epítipo de la toxina épsilon" según se usa en el presente documento significa un polipéptido que comprende uno o más (o todos) los epítopos de la toxina épsilon madura natural activada ("toxina activa"), según se representa mediante la SEQ ID NO: 5. El término "epítipo" se refiere a los aminoácidos (normalmente un grupo de alrededor de 5 o más aminoácidos) de una secuencia polipeptídica que son esenciales para la generación de una respuesta inmunitaria. Estos aminoácidos pueden ser consecutivos en la secuencia, pero más normalmente, no son consecutivos, agrupándose entre sí cuando se forma la estructura terciaria de la proteína natural. Dado que estos aminoácidos están en un entorno polipeptídico que les permite formar la correcta estructura terciaria del epítipo, pueden ser usados para proporcionar una composición de vacuna protectora. Por ejemplo, un polipéptido del epítipo de la toxina épsilon puede ser aquel que sea capaz de unirse a un anticuerpo que se une a la toxina épsilon madura activada natural que tiene la secuencia SEQ ID NO: 5 y/o a la variante de la secuencia de baja toxicidad SEQ ID NO: 22.

En el presente estudio los inventores investigaron el papel del dominio I de la Etx en la unión celular, para identificar los residuos clave implicados en ésta. Esto les permitió determinar los requisitos de toxicidad. Para ello generaron mutaciones dirigidas mediante la sustitución de residuos de tirosina por alanina. Los estudios de citotoxicidad y de unión de estos mutantes de tirosina única indicaron que un agrupamiento de tirosinas expuesto en la superficie del dominio I es crítico para la interacción de la Etx con el receptor de las células MDCK.2. La reducida citotoxicidad de los mutantes se correlacionaba con su reducida capacidad para unirse a las células MDCK.2. Para evaluar adicionalmente los papeles de los residuos de tirosina en la unión al receptor, los inventores generaron un mutante de tirosina doble de la Etx, el Y43A/Y209A. La sustitución de Y43 y de Y209 por alanina dio como resultado una citotoxicidad equivalente a la de la prototoxina natural inactiva, lo que indica que el Y43A/Y209A es inactivo. Esta aparente pérdida de actividad citotóxica se relaciona con la incapacidad del Y43A/Y209A de unirse a las células MDCK.2. El polipéptido según la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos YNYLKRMEKYXPNAMAYFDK (SEQ ID NO: 34), en la que "X" es cualquier aminoácido distinto a Y. El polipéptido según la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos GEIPSXLAFP (SEQ ID NO: 35) y/o la secuencia de aminoácidos SGSEWGEIPSXLAFPRDGYK (SEQ ID NO: 36), en la que "X" es cualquier aminoácido distinto a Y. "X" puede ser el aminoácido alanina. El polipéptido según la invención puede comprender todas las SEQ ID NO: 33-36.

El polipéptido según la invención puede formar parte de una proteína de fusión. Se desvela un polipéptido que tiene una identidad en la secuencia de al menos el 60 % con la SEQ ID NO: 6 (la secuencia de la toxina activada que comprende las mutaciones Y43A e Y209A) o la SEQ ID NO: 25 (la toxina activada recombinante que comprende las mutaciones Y43A, Y209A y H149A) y comprende una mutación en la posición 43 y en la posición 209 (en comparación con las posiciones equivalentes en la SEQ ID NO: 3), de forma que un residuo de tirosina en cada una de esas posiciones es sustituido por otro aminoácido tal como alanina. Esto es, el polipéptido es idéntico en al menos aproximadamente el 60 % a la SEQ ID NO: 6 (o a la SEQ ID NO: 25) y comprende cualquier aminoácido distinto a la tirosina en la posición equivalente a las posiciones 32 y 198 de la SEQ ID NO: 6 (o a las posiciones 32 y 198 de la SEQ ID NO: 25), cuando se alinea con la SEQ ID NO: 6 (o con la SEQ ID NO: 25) mediante el uso de una herramienta de alineación de secuencias global, como se describe a continuación. En otra realización, el polipéptido según la invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 60 % a la SEQ ID NO: 1 (la secuencia de la toxina natural completa) y que comprende una mutación en la posición 43 y en la posición 209 (en comparación con las posiciones equivalentes en la SEQ ID NO: 3), de forma que un residuo de tirosina de cada una de esas posiciones es sustituido por otro aminoácido tal como alanina. Esto es, el polipéptido es idéntico en al menos aproximadamente el 60 % a la SEQ ID NO: 1 y comprende cualquier aminoácido distinto a la tirosina en la posición equivalente a las posiciones 75 y 241 de la SEQ ID NO: 1, cuando se alinea con la SEQ ID NO: 1 mediante el uso de una herramienta de alineación de secuencias global, como se describe a continuación.

El polipéptido puede tener una toxicidad igual o similar a la de la SEQ ID NO: 22 y/o ser no tóxico.

El polipéptido puede tener una identidad en la secuencia de al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o de aproximadamente el 99 % con las SEQ ID NO: 1, 4, 6, 15, 19 o 25. El polipéptido del epítipo de la toxina épsilon puede consistir en, o comprender, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 1, 4, 6, 15, 19 o 25 (es decir, las secuencias que comprenden al menos las mutaciones Y43A e Y209A, comprendiendo algunas también la mutación H149A).

Como se describe adicionalmente a continuación, la identidad en la secuencia puede ser determinada mediante el uso de la Needleman-Wunsch Global Sequence Alignment Tool disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, EE.UU., por ejemplo, a través de la <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, mediante el uso de los ajustes de los parámetros por defecto. Cuando se compara el nivel de la identidad en la secuencia con (por ejemplo) la SEQ ID NO: 6, esto debería llevarse a cabo normalmente con respecto a la longitud completa de la SEQ ID NO: 6, para evitar el solapamiento de regiones cortas con una elevada identidad que diera como resultado una elevada evaluación global de identidad (es decir, se usa un procedimiento de alineación global). Por ejemplo, un fragmento corto de un polipéptido que tiene, por ejemplo, cinco aminoácidos, podría tener una secuencia idéntica al 100 % a la región de cinco aminoácidos de la totalidad de la SEQ ID NO: 6, pero esto no proporciona una identidad de aminoácidos del 100 % salvo que el fragmento forme parte de una secuencia más larga que también tenga aminoácidos idénticos en las otras posiciones equivalentes a las posiciones de la SEQ ID NO: 6.

Por lo tanto, la persona experta es fácilmente capaz de determinar las posiciones equivalentes entre dos secuencias mediante la alineación de las secuencias para conseguir un máximo de aminoácidos idénticos en tantas posiciones como sea posible, por ejemplo, mediante el uso de un programa de alineación de la secuencia global, tal como el que está disponible a través de la <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, analizado adicionalmente a continuación.

Por lo tanto, el polipéptido puede tener una longitud de al menos aproximadamente 270, 280, 290, 300, 310, 320 o aproximadamente 330 aminoácidos. En ciertas realizaciones específicas, el polipéptido puede tener una longitud de 263, 293, 315 o 328 aminoácidos (las longitudes de las SEQ ID NO: 6, 28, 15 y 1, respectivamente).

La presente divulgación también incluye polipéptidos que comprenden variantes de los polipéptidos del epítipo y procedimientos que utilizan estas variantes de los polipéptidos. Según se usa en el presente documento, una "variante" significa un polipéptido en el que la secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia base a partir de la cual deriva en que uno o más aminoácidos de la secuencia están sustituidos por otros aminoácidos. La variante es una variante funcional porque se conservan las características funcionales del polipéptido a partir del cual deriva la variante. Por ejemplo, la variante del polipéptido puede tener una capacidad similar para unirse a un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido no variante (tal como, a modo de ejemplo no limitante, las SEQ ID NO: 1, 4, 6, 15, 19, 25). En particular, cualquier sustitución, adición o delección de aminoácidos no debe alterar o alterar significativamente la estructura terciaria de uno o más de los epítopos contenidos en el polipéptido a partir del cual deriva la variante, de forma que la variante del polipéptido conserve la capacidad de unirse a un anticuerpo que se une a las SEQ ID NO: 5 o 22. La persona experta es fácilmente capaz de determinar las variantes funcionales apropiadas, y de determinar la estructura terciaria de un epítipo y cualquier alteración en el mismo, sin la aplicación de la capacidad inventiva.

Las sustituciones de aminoácidos pueden contemplarse como "conservativas" cuando un aminoácido es sustituido por un aminoácido diferente con unas propiedades ampliamente similares. Las sustituciones no conservativas son cuando los aminoácidos son sustituidos por aminoácidos de un tipo diferente.

Por "sustitución conservativa" se entiende la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, en la que las clases se definen como sigue:

Clase	Ejemplos de aminoácido
No polar:	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar sin carga:	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido:	Asp, Glu
Basic:	Lys, Arg, His.

Como es bien conocido por los expertos en la materia, la alteración de la estructura primaria de un polipéptido por una sustitución conservativa puede no alterar significativamente la actividad de ese polipéptido debido a que la cadena lateral del aminoácido que es insertado en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y contactos similares a los de la cadena del aminoácido que ha sido sustituido. Esto es así incluso cuando la sustitución está en una región que es crítica para la determinación de la conformación del polipéptido.

Como se ha mencionado anteriormente, las sustituciones no conservativas son posibles siempre que éstas no alteren la estructura terciaria de un epítipo del polipéptido, por ejemplo, que no interrumpan la inmunogenicidad (por ejemplo, la antigenicidad) del polipéptido.

- 5 Hablando ampliamente, serán posibles menos sustituciones no conservativas sin alterar la actividad biológica del polipéptido. Como se ha mencionado anteriormente, las variantes pueden ser idénticas en al menos aproximadamente el 60 % a la secuencia de base.

Como ya se ha mencionado brevemente, la identidad en la secuencia entre secuencias de aminoácidos puede ser determinada mediante la comparación de una alineación de las secuencias. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por el mismo aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La puntuación de una alineación en forma de un porcentaje de identidad es función del número de aminoácidos idénticos en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Cuando se comparan las secuencias, las alineaciones óptimas pueden requerir la introducción de huecos en una o más de las secuencias, para tener en consideración posibles inserciones y deleciones en las secuencias. Los procedimientos de comparación de secuencias pueden emplear penalizaciones por huecos, de forma que para el mismo número de moléculas idénticas en las secuencias que se están comparando, una alineación de la secuencia con tantos pocos huecos como sea posible, que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirá una puntuación mayor que una con muchos huecos. El cálculo del porcentaje de identidad máximo implica la producción de una alineación óptima, teniendo en consideración las penalizaciones por huecos. Como se ha mencionado anteriormente, el porcentaje de identidad en la secuencia puede ser determinado mediante el uso de la herramienta Needleman-Wunsch Global Sequence Alignment, disponible al público a través de la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, mediante el uso del ajuste de los parámetros por defecto. El algoritmo de Needleman-Wunsch fue publicado en J. Mol. Biol. (1970) vol. 48: 443-53.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un polinucleótido que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido según el primer aspecto de la invención. En el presente documento se proporcionan algunos ejemplos en forma de las SEQ ID NO: 55-60, que codifican las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4, 6, 15, 19 y 25, respectivamente, como se muestra en la Tabla 4. La invención también incluye variantes de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención. El término "variante" en relación con una secuencia de ácidos nucleicos significa cualquier sustitución, variación, modificación, deleción o adición de uno o más ácido(s) nucleico(s) de o en una secuencia de un polinucleótido, siempre que la secuencia polipeptídica resultante codificada por el polinucleótido muestre al menos las mismas propiedades que el polipéptido codificado por la secuencia básica. El término incluye por lo tanto variantes alélicas y también incluye un polinucleótido (una "secuencia de sonda") que hibrida sustancialmente con la secuencia del polinucleótido de la presente invención. Dicha hibridación puede producirse a o entre unas condiciones de alta y baja rigurosidad. En términos generales, las condiciones de baja rigurosidad pueden ser definidas como la hibridación en la que la etapa de lavado tiene lugar en una solución tampón de NaCl 0,330-0,825 M a una temperatura de aproximadamente 40-48 °C por debajo de la temperatura de fusión calculada o real (T_m) de la secuencia de sonda (por ejemplo, entre aproximadamente la temperatura ambiente del laboratorio y aproximadamente 55 °C), mientras que las condiciones de alta rigurosidad implican un lavado con una solución tampón de NaCl 0,0165-0,0330 M a una temperatura de aproximadamente 5-10 °C por debajo de la T_m calculada o real de la secuencia de sonda (por ejemplo, aproximadamente a 65 °C). La solución tampón puede ser, por ejemplo, un tampón de SSC (NaCl 0,15 M y citrato de trisodio 0,015 M), teniendo lugar el lavado de baja rigurosidad con 3 x de tampón SSC, y teniendo lugar el lavado de alta rigurosidad con 0,1 x de tampón SSC. Las etapas implicadas en la hibridación de las secuencias de ácidos nucleicos se han descrito, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001; "Molecular Cloning: a laboratory manual", 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).

45 Los polipéptidos y los ácidos nucleicos de la invención pueden ser preparados de forma sintética mediante el uso de sintetizadores convencionales. Alternativamente, pueden ser producidos mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante, y pueden ser incorporados en un vector de expresión adecuado, que a continuación se usa para la transformación de una célula hospedadora adecuada, tal como una célula procariota, tal como *E. coli*. Se cultivan las células hospedadoras transformadas y se aísla el polipéptido a partir de las mismas.

50 Por lo tanto, la invención también proporciona un vector que comprende dicho polinucleótido. Este incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o un vector vírico, en los que se ha insertado una molécula de ácido nucleico de la invención, en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende adicionalmente secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor unido operativamente a la secuencia. Los expertos en la materia conocen grandes cantidades de vectores y de promotores adecuados y están disponibles en el mercado. Los apropiados vectores de clonación y de expresión para su uso con hospedadores procariotas y eucariotas también se describen en Sambrook, et al.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula que comprende cualquiera del polipéptido, el polinucleótido o el vector según la invención. Por ejemplo, una célula adecuada puede ser una célula de *Salmonella*, tal como una célula de *Salmonella enterica*, en algunas realizaciones, de la serovariedad *typhimurium*. La *Salmonella* puede ser una cepa atenuada. Opcionalmente pueden emplearse las cepas x8914 y x9241. Por ejemplo,

se describe un sistema adecuado en Kulkarni et al. (2008, Vaccine vol. 26, 4194-4203). Preferiblemente, la célula hospedadora no es una célula madre, especialmente no es una célula madre humana.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un anticuerpo creado contra un polipéptido según el primer aspecto de la invención.

- 5 Un aspecto adicional de la invención proporciona una vacuna subunitaria que comprende un polipéptido según el primer aspecto de la invención. Por ejemplo, ésta puede estar en forma de una proteína de fusión y/o en forma de una vacuna recombinante vírica.

Un aspecto adicional proporciona una composición de vacuna que puede comprender una vacuna de un polipéptido, de un polinucleótido, de un vector, de un anticuerpo y/o subunitaria según los aspectos precedentes de la invención. La composición puede comprender adicionalmente los excipientes y/o los diluyentes apropiados para el medio a través del cual va a ser administrada la composición a un sujeto que necesite la vacunación contra el desarrollo de la enfermedad causada por *C. perfringens* y/o por la Etx. La selección de los componentes apropiados está en la habilidad rutinaria de la persona experta sin la aplicación de la actividad inventiva.

- 10 Por ejemplo, la composición de vacuna de la invención puede ser formulada convenientemente mediante el uso de un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, un disolvente acuoso, un disolvente no acuoso, un excipiente no tóxico, tal como una sal, un conservante, un tampón y similares. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Algunos disolventes acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Algunos conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición de vacuna se ajustan según la habilidad rutinaria.

- 15 Opcionalmente, la formulación de vacuna puede incluir un portador. Algunas moléculas portadoras usadas habitualmente son albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina, albúmina sérica de ratón, albúmina sérica de conejo y similares. Pueden usarse portadores sintéticos y están fácilmente disponibles. Los medios para la conjugación de péptidos con proteínas portadoras son bien conocidos en la materia e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y benzidina bis-biazotizada.

- 20 En ciertas situaciones también puede ser deseable la formulación de la composición de vacuna para que comprenda un adyuvante para mejorar la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables tales como, por ejemplo, una citocina, una toxina o una composición sintética. Algunos coadyuvantes usados habitualmente incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, adyuvantes de Freund y saponina Quil-A. Además de los adyuvantes, puede ser deseable la administración conjunta de modificadores de la respuesta biológica (BRM) con el péptido o la variante o el derivado, para regular por disminución la actividad de los linfocitos T supresores.

- 30 Algunos posibles vehículos para la administración de la formulación de vacuna incluyen liposomas. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos. Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares, y como resultado, los liposomas pueden ser administrados generalmente de una forma segura y biodegradable. Las técnicas para la preparación de liposomas y la formulación (por ejemplo, la encapsulación) de diversas moléculas, incluyendo péptidos y oligonucleótidos, con liposomas, son bien conocidas.

- 40 Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y pueden variar de tamaño con unos diámetros que varían desde 0,02 μm hasta más de 10 μm . Los liposomas también pueden adsorberse a prácticamente cualquier tipo de célula, y liberar después el agente encapsulado. Alternativamente, el liposoma se fusiona con la célula objetivo, mediante lo cual el contenido del liposoma se vacía en la célula objetivo. Alternativamente, un liposoma absorbido puede ser endocitado por células que son fagocíticas. La endocitosis está seguida por la degradación intralisosómica de los lípidos del liposoma y la liberación de los agentes encapsulados. En el presente contexto, el polipéptido según la invención puede estar localizado en la superficie del liposoma para facilitar la presentación del antígeno sin la alteración del liposoma ni una endocitosis. Independientemente del mecanismo o de la administración, sin embargo, el resultado es la disposición intracelular del polipéptido asociado.

- 45 Los vectores liposomales pueden ser aniónicos o catiónicos. Los vectores liposomales aniónicos incluyen liposomas sensibles al pH que se alteran o se fusionan con la membrana endosómica después de la endocitosis y la acidificación del endosoma. Los liposomas catiónicos se prefieren para la mediación en la transfección de células de mamífero *in vitro*, o para la administración en general de ácidos nucleicos, pero se usan para la administración de otros productos terapéuticos, tales como péptidos.

Otros liposomas adecuados que se usan en los procedimientos de la invención incluyen vesículas multilaminares (MLV), vesículas oligolaminares (OLV), vesículas unilaminares (UV), pequeñas vesículas unilaminares (SUV), vesículas unilaminares de tamaño medio (MIN), grandes vesículas unilaminares (LUV), vesículas unilaminares

gigantes (GUV), vesículas multivesiculares (MVV), vesículas individuales u oligolaminas elaboradas mediante un procedimiento de evaporación en fase inversa (REV), vesículas multilaminas elaboradas mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa (MLV-REV), vesículas plurilaminas estables (SPLV), MLV congeladas y descongeladas (FATMLV), vesículas preparadas mediante procedimientos de extrusión (VET), vesículas preparadas mediante una prensa francesa (FPV), vesículas preparadas mediante fusión (FUV), vesículas de deshidratación-rehidratación (DRV) y burbujosomas (BSV). Las técnicas para la preparación de estos liposomas son bien conocidas en la materia.

También se contemplan otras formas de administración de partículas, por ejemplo, microesferas y similares, para la administración de los epítomos o poliepítomos peptídicos.

- 10 Alternativamente pueden producirse vacunas basadas en ácidos nucleicos que comprendan un ácido nucleico, tal como, por ejemplo, ADN o ARN, que codifique el epítomo o poliepítomo peptídico inmunológicamente activo, y clonarse en un vector adecuado (por ejemplo, un vector de la variolovacuna, de la viruela del canario, de adenovirus o de un virus eucariota).

- 15 Alternativamente, el polipéptido puede ser administrado en forma de una vacuna celular a través de la administración de APC autólogas o alogénicas o de células dendríticas que han sido tratadas *in vitro* de forma que presenten el péptido en su superficie. Podrían usarse las cepas *Salmonella enterica* o de *Escherichia coli* portadoras de mutaciones que reduzcan su virulencia y les permitan colonizar un animal hospedador sin provocar la enfermedad, para la administración de los antígenos de la vacuna, especialmente para la administración a animales no humanos. Las bacterias usadas podrían incluir cepas que ya se están usando como vacuna en el ganado, en el
20 que la lesión atenuante no está completamente caracterizada. Además, podrían usarse cepas en las que se han introducido deliberadamente mutaciones en la bacteria para atenuar racionalmente la virulencia, para la administración del toxoide épsilon. Dichas mutaciones incluyen las de la ruta de shikimato, la ruta de la biosíntesis de la purina, mutaciones en los genes que codifican la ciclasa de adenilato (*cya*) y la proteína del receptor camp (*crp*) o mutaciones en los genes *phoP* y *phoQ*, implicados en el sistema regulador bicomponente. Se han estudiado
25 otras cepas mutadas racionalmente que incluyen aquellas con delecciones en los genes implicados en la biosíntesis del peptidoglicano, la recombinación del ADN y la reparación o la metilación del ADN. Las bacterias que son capaces de colonizar normalmente el intestino pero que no son patógenas, tales como cepas de *Lactobacillus sp.* o de *Lactococcus sp.* o de *Bacillus subtilis*, también podrían usarse para la administración de los antígenos de la vacuna. En el caso de *B. subtilis*, el antígeno de la vacuna podría ser expresado en la célula vegetativa o en la espora. El antígeno también podría ser administrado en forma de una vacuna de ADN desnudo en la que el gen que
30 codifica el toxoide épsilon es clonado en un vector de expresión de mamífero y expresado en un promotor eucariota.

- Dicha metodología, por ejemplo, mediante el uso de *Salmonella*, ofrece diversas ventajas. En primer lugar pueden administrarse por vía oral vacunas de *Salmonella* viva (la vía de infección natural), permitiendo una vía de administración de la vacuna no invasiva. En segundo lugar, pueden desencadenarse las respuestas inmunitarias tanto de la mucosa como sistémica, lo que puede ser importante para la protección frente a la infección. Además, las vacunas de *Salmonella* viva atenuada son capaces de simular las respuestas inmunitarias tanto humores como celulares que pueden ser importantes para la protección frente a la enfermedad. Finalmente, dado que *Salmonella* es manejable genéticamente, las vacunas de *Salmonella* recombinantes son relativamente fáciles de desarrollar y también son relativamente rentables de producir.

- 40 Una de las clases más ampliamente estudiadas de *Salmonella* atenuada usada como portador de antígenos foráneos son auxótrofos. Por ejemplo, se han construido mutantes definidas genéticamente del gen *aroA*, que codifica la sintasa de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato, tanto en *S. enterica* var. *Typhimurium* como en la var. *Typhi*. Estos mutantes están atenuados y son inmunógenos en ratones. Algunos ejemplos de otros mutantes auxótrofos incluyen *Salmonella* con delecciones en los genes implicados en la ruta biosintética de la purina. Otro grupo bien
45 estudiado de *Salmonella* atenuadas son mutantes que tienen delecciones definidas en los genes implicados en la regulación de la virulencia de la *Salmonella*. Por ejemplo, las mutaciones en los genes que codifican la ciclasa de adenilato (*cya*) y la proteína del receptor camp (*crp*) afectan a la expresión de los genes implicados.

- En una realización, la composición de vacuna puede estar incluida en un producto alimenticio (es decir, un material alimenticio adecuado para su consumo por parte de un ser humano o de un animal) que comprende un polipéptido y/o un polinucleótido y/o un vector y/o una célula y/o una vacuna subunitaria y/o una composición de vacuna según los aspectos precedentes de la invención. Ésta puede estar, en algunos ejemplos no limitantes, en forma de pellas, granulados o una pulpa, que pueden comprender adicionalmente, de nuevo únicamente como ejemplo, componentes de granos, de pasto y/o de proteína. La composición también puede estar incluida en líquidos para bebida y/o ser administrada a través de un pulverizador en la atmósfera que rodea al animal, que
55 consecuentemente, es inhalada por el animal.

- Si la composición de vacuna es para su administración a un sujeto humano, puede estar en una forma adecuada para su administración por vía oral (por ejemplo, en un complemento dietético) y/o parenteral, por ejemplo, mediante una inyección, una inhalación o mediante una administración transdérmica a través de un parche, una loción o un gel. Las formas particulares descritas anteriormente también son útiles generalmente para su administración a un
60 sujeto humano.

Un polipéptido, un polinucleótido, un vector, una vacuna subunitaria, un anticuerpo y/o una composición de vacuna según la invención pueden ser para su uso en un procedimiento de vacunación de un sujeto frente al desarrollo de una enfermedad causada por *Clostridium perfringens*, implicando la enfermedad, por ejemplo, la acumulación en el torrente sanguíneo del sujeto de la toxina épsilon que puede ser liberada por *C. perfringens*, particularmente la toxina épsilon activa que carece de los N- y C- terminales de la prototoxina completa. La invención también proporciona un método de vacunación de un sujeto frente al desarrollo de una enfermedad causada por *Clostridium perfringens* y/o causada por (o asociada con la presencia de) la toxina épsilon, especialmente la toxina activa, comprendiendo el método la administración a un sujeto de una cantidad protectora de un polipéptido, de un polipéptido, de un polinucleótido, de un vector, de una vacuna de subunidad, de un anticuerpo y/o de una composición de vacuna según la invención. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano. El animal no humano puede ser un animal rumiante, tal como una oveja, un cerdo o una cabra, o un animal bovino tal como una vaca doméstica. También están incluidos los animales jóvenes tales como corderos, lechones, niños y terneras.

Una "cantidad protectora" es una cantidad suficiente para la inducción de una respuesta inmunitaria en el sujeto, de forma que la probabilidad de que el sujeto desarrolle una enfermedad causada por *C. perfringens*, por ejemplo, causada por (o asociada con la presencia de) la toxina épsilon, especialmente la toxina activa, se reduzca o se elimine. Por ejemplo, los anticuerpos capaces de unirse a la SEQ ID NO: 5 y/o 22 pueden ser detectables después de la administración, en la que dichos anticuerpos no eran detectables antes de la administración, o únicamente detectables a unas concentraciones menores a las de después de la administración.

La invención también proporciona un kit que comprende un polipéptido, un polinucleótido, un vector, una vacuna subunitaria, un anticuerpo y/o una composición de vacuna según la invención, teniendo el kit usos, por ejemplo, en procedimientos de vacunación de un sujeto frente al desarrollo de una enfermedad causada por una infección por *Clostridium perfringens*, particularmente una enfermedad causada por la toxina épsilon. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones que permitan al usuario llevar a cabo un procedimiento de vacunación de un sujeto frente al desarrollo de una enfermedad causada por *Clostridium perfringens*, particularmente una enfermedad causada por la toxina épsilon.

Una enfermedad causada por *Clostridium perfringens* y/o por la toxina épsilon activa, como se menciona en el presente documento, puede ser, por ejemplo, una enterotoxemia que incluya los síntomas previos a la enfermedad, tales como lesiones sistémicas y enterocolitis. Otros síntomas pueden incluir edema de los órganos objetivo principales, riñones y cerebro, y daños en las células endoteliales vasculares. La fase terminal de la enterotoxemia está caracterizada por graves trastornos neurológicos que incluyen opistótonos, convulsiones y forcejeos agónicos.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprende" y "contiene" y las variaciones de las palabras, por ejemplo, "que comprende" y "comprende", significan "que incluyen pero no se limita a" y no excluyen otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o etapas.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular engloba el plural salvo que el contexto lo requiera de otro modo. En particular, cuando se use el artículo indefinido, se entiende que la memoria descriptiva contempla la pluralidad así como la singularidad, salvo que el contexto lo requiera de otro modo.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención pueden ser según se describe en relación con cualquiera de los demás aspectos.

Otras características de la presente invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos. Hablando de forma general, la invención se extiende a cualquier característica o combinación nueva de las características desveladas en esta memoria descriptiva (incluyendo las reivindicaciones y los dibujos anexos). Por lo tanto, debe entenderse que las características, números enteros, compuestos o fracciones químicas descritas en conjunción con un aspecto, realización o ejemplo en particular de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, salvo que sean incompatibles con los mismos.

Breve descripción de las figuras

Ahora se describirán las realizaciones de la invención, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las Figuras 1-8 en las que:

la Figura 1 es una representación esquemática de la protoxina épsilon recombinante (P-Etx), con un péptido líder PelB N-terminal en lugar de la secuencia peptídica de 13 aminoácidos N-terminal y con una etiqueta de His C-terminal para ayudar en la purificación (también se muestran las secuencias de aminoácidos alrededor de los sitios de procesamiento);

la Figura 2A muestra la visualización mediante una tinción de Coomassie de la expresión de la P-Etx: carril 1, extracto proteico bacteriano posterior a la inducción a partir de células que expresan únicamente el vector, fracción soluble; carril 2, extracto proteico bacteriano posterior a la inducción a partir de células que expresan únicamente el vector, fracción insoluble; carril 3, extracto proteico bacteriano posterior a la inducción a partir de células que expresan la P-Etx, fracción soluble, mostrándose la P-Etx como una intensa banda de ~ 35 kDa;

carril 4, extracto proteico bacteriano posterior a la inducción a partir de células que expresan la P-Etx, fracción insoluble; carril 5, la P-Etx después de una purificación por afinidad, indicando la punta de flecha la posición de la prototoxina épsilon;

5 la Figura 2B muestra el análisis mediante una inmunotransferencia Western de la expresión de la P-Etx mediante el uso de un anticuerpo anti-His6 (los carriles son como en la Figura 2A), mostrándose las posiciones de los marcadores de la masa molecular (M);

la Figura 2C muestra el análisis mediante una espectrometría de masas que muestra el peso molecular real de la prototoxina, que se corresponde con el peso molecular esperado de 32,79 kDa;

10 la Figura 3A muestra la visualización mediante una tinción de Coomassie de la expresión de los mutantes de la P-Etx recombinante que se expresaron en células Rosetta2 (DE3) de *E. coli*, con las fracciones insoluble (P) y soluble (S) de los extractos proteicos bacterianos posteriores a la inducción marcadas; los mutantes de Tyr recombinantes son expresados fundamentalmente en la fracción soluble (S), lo que está indicado por la presencia de una intensa banda de ~ 35 kDa (rodeada por un círculo);

la Figura 3B muestra el resultado de la purificación por afinidad de los mutantes de Tyr;

15 la Figura 3C muestra las muestras de la prototoxina épsilon recombinante purificadas y tratadas con tripsina separadas mediante una SDS-PAGE y visualizadas mediante una tinción de Coomassie;

la Figura 4 muestra que los mutantes de tirosina muestran una actividad citotóxica reducida frente a las células MDCK.2, representando los datos las medias y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado;

20 la Figura 5 muestra los efectos de las mutaciones de Tyr sobre la unión de la prototoxina épsilon a las células MDCK.2, mostrando los mutantes Y43A e Y209A una actividad de unión significativamente reducida con respecto a la prototoxina "natural" (de 21 veces y de 6 veces, respectivamente) según se determina mediante la cuantificación de la señal fluorescente procedente de cada pocillo mediante el uso de un análisis ANOVA monofactorial seguido de una prueba post de Dunnett; los datos representan las medias y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado;

25 la Figura 6A muestra la visualización mediante una tinción de Coomassie de la expresión de la P-Etx recombinante Y43A/Y209A, con las fracciones insoluble (P) y soluble (S) de los extractos proteicos bacterianos posteriores a la inducción marcadas, que muestra la Y43A/Y209A recombinante expresada fundamentalmente en la fracción soluble (S), lo que está indicado por la presencia de una intensa banda de ~ 35 kDa (rodeada por un círculo);

30 la Figura 6B muestra las prototoxinas épsilon natural y recombinante Y43A/Y209A purificadas tratadas con tripsina, separadas mediante una SDS-PAGE y visualizadas mediante una tinción de Coomassie;

35 la Figura 7A muestra las toxinas épsilon tratadas con tripsina natural y Y43A/Y209A junto con la prototoxina inactivada natural, que se añadieron el medio superyacente de las células MDCK en placas de 96 pocillos, evaluándose la citotoxicidad mediante el uso del ensayo de la LDH; los datos representan las medias y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado;

40 la Figura 7B muestra la detección de las células MDCK con las prototoxinas épsilon Y43A/Y209A purificadas recombinantes y natural unidas; todas las muestras se analizaron por cuadruplicado y los datos se analizaron mediante un ANOVA monofactorial – los valores significativamente diferentes del control (la toxina natural) se muestran como ***P < 0,001;

la Figura 8A muestra que la citotoxicidad de la Y43A/Y209A activada con tripsina en un trasfondo natural era idéntica a la de la Y43A/Y209A en un trasfondo de H149A;

la Figura 8B muestra que la señal fluorescente de las células tratadas con Y43A/Y209A en un trasfondo natural era equivalente a la de las células tratadas con Y43A/Y209A en un trasfondo de H149A y PBS;

45 **Ejemplos**

Materiales y procedimientos

Productos químicos

Todos los productos químicos se obtuvieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) salvo que se especifique de otro modo.

50 *Cultivo celular*

Se cultivaron de forma rutinaria células MDCK.2 (ATCC-LGC Standards, Teddington, Reino Unido) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) complementado con un 10 % de suero bovino fetal Gold (PAA, Pasching, Austria) a 37 °C en una atmósfera humidificada de un 95 % de aire / 5 % de CO₂. El medio de cultivo fue sustituido cada 2-3 días. Las células fueron desprendidas de forma rutinaria mediante una incubación en tripsina/EDTA y divididas según fuera apropiado (normalmente en diluciones de 1:6).

Clonación de la prototoxina épsilon recombinante (P-Etx)

El gen que codifica la prototoxina épsilon, *etxD*, de la cepa NCTC 8346 de *C. perfringens* de tipo D, fue amplificado mediante una PCR y clonado en el plásmido PC10 según describen Oyston *et al.* (1998). Posteriormente el gen *etxD* fue amplificado mediante una PCR a partir del plásmido pC10 mediante el uso de los oligonucleótidos:

5'GGAATTCCCCATGGGTAAAGCTTCTTATGATAATGT-3' (SEQ ID NO:30)
5'-ATTGCCGCTCGAGTTTTATTCTGGTGCC-3' (SEQ ID NO:31)

Estos incorporaban los sitios de restricción *Nco*I y *Xho*I, respectivamente (los sitios de escisión de las enzimas de restricción están subrayados). El ciclo de la PCR consistía en 1 min de desnaturalización inicial del ADN de molde a 94 °C seguido de 25 ciclos a 94 °C durante 30 s, a 50 °C durante 30 s y a 72 °C durante 30 s, seguido de 10 min de una extensión final a 72 °C. El fragmento amplificado mediante la PCR fue digerido con las endonucleasas de restricción *Nco*I y *Xho*I y clonado en el vector de expresión digerido de forma similar pET-26b(+) (Merck, Darmstadt, Alemania). Esto colocó el gen *etxD* bajo la regulación de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 y fusionado en el extremo N-terminal de la prototoxina (P-Etx) sin los 13 residuos N-terminales (KEISNTVSNEMSK; SEQ ID NO: 32) con el péptido líder PelB, y el extremo C-terminal de la prototoxina a una etiqueta de afinidad de polihistidina (6 x His) para ayudar en la purificación de la proteína. Además, la P-Etx recombinante contiene la mutación H149A (la numeración de los aminoácidos se corresponde con la prototoxina sin la secuencia peptídica N-terminal, la SEQ ID NO: 26), generando una variante de baja toxicidad de la Etx para permitir la manipulación de la toxina activada a un nivel de contención de 2 (Oyston *et al.* (1998)). El plásmido recombinante que expresa la P-Etx con la mutación H149A (SEQ ID NO: 16) se denomina pET26-b(+)/P-Etx_H149A.

Mutagénesis dirigida

Se introdujeron mutaciones en el gen que codifica la P-Etx mediante el uso del QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante. Se usaron pares de cebadores oligonucleotídicos sintéticos (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemania) para cambiar cada codón de tirosina por un codón de alanina. Los cebadores usados para la mutagénesis dirigida están recogidos en la siguiente Tabla 2. Para la creación de los mutantes de Tyr, el plásmido pET26-b(+)/P-Etx_H149A sirvió de molde, salvo que se indique de otro modo. La presencia de las mutaciones previstas fue verificada mediante la secuenciación del ADN (Source BioScience, Cambridge, Reino Unido).

Expresión y purificación de la prototoxina épsilon recombinante (P-Etx) y de sus derivados

La P-Etx recombinante y sus derivados fueron expresados en células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Merck, Darmstadt, Alemania) cultivadas en medio de autoinducción ZYM-5052 (Studier *et al.* (2005)) complementado con 50 µg/ml de kanamicina y 34 µg/ml de cloranfenicol. Las células (100 ml) se cultivaron a 37 °C durante 2-3 h y se cultivaron durante 24 h adicionales a 20 °C.

Para la purificación de la proteína, las células fueron recogidas mediante una centrifugación y se extrajeron 2 g de la pasta celular con 10 ml de un reactivo de extracción de proteínas Bugbuster (Merck, Darmstadt, Alemania) que contiene 10 µl de lisozima (1 KU/µl) (Merck, Darmstadt, Alemania) y 10 µl de nucleasa de benzonasa (25 u/µl) (Merck, Darmstadt, Alemania). La suspensión de células se incubó en una mezcladora rotatoria a baja velocidad durante 25 min a la temperatura ambiente y se centrifugó a 16.000 x g durante 20 min a 4 °C para separar las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (sedimento). El sobrenadante se aplicó a una columna His GraviTrap (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) siguiendo las directrices del fabricante. En resumen, las proteínas con la etiqueta de His se unieron a la columna de afinidad mediante el uso de un tampón formado por fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, a pH 7,4. La columna se lavó con un tampón formado por fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 60 mM, a pH 7,4. La P-Etx se eluyó en un tampón formado por fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, a pH 7,4. Todas las etapas de purificación se llevaron a cabo a 4 °C. El eluido que contenía la P-Etx se aplicó a una columna PD-10 Desalting (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) para el intercambio del tampón y una limpieza adicional de la muestra. La P-Etx se eluyó de la columna PD-10 en tampón de fosfato 10 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, NaCl 137 mM, a pH 7,4. Las concentraciones de la proteína se determinaron mediante el uso del ensayo del BCA (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Reino Unido) y la proteína se almacenó en alícuotas a 80 °C.

La pureza de la P-Etx y de sus derivados se confirmó mediante una SDS-PAGE. Las proteínas se resolvieron mediante geles Bis-Tres NuPAGE al 4-12 % (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) mediante el uso de un aparato Surelock Xcell (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) y tampones de análisis de MES SDS NuPAGE (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido). Todas las muestras se calentaron antes de su carga a 95 °C durante 5 min en tampón de muestra de LDS NuPAGE (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) que contiene ditiotreitól 0,1 M (DTT). Los geles se

analizaron normalmente a 200 V durante 45 min. Después de la separación electroforética, las proteínas se visualizaron mediante una tinción SimplyBlue (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante el uso de pilas de transferencia iBlot (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) y un aparato iBlot (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. Para la detección de la P-Etx se usó un anticuerpo monoclonal específico de la etiqueta de His conjugado con peroxidasa de rábano picante (Merck, Darmstadt, Alemania). Se usaron patrones de peso molecular teñidos previamente (Merck, Darmstadt, Alemania) como marcadores. El lisado de *E. coli* Rosetta 2 (DE3)/pET26-b(+) sirvió como control negativo.

Tratamiento con tripsina de la prototoxina épsilon (P-Etx)

Para los ensayos de citotoxicidad, la P-Etx purificada se activó con tripsina de páncreas bovino para generar la toxina activa (Etx). La tripsina se preparó en PBS y se añadió a la prototoxina en una proporción de 1:100 (p:p) y se incubó a la temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió un cóctel inhibidor de la proteasa exento de EDTA (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Reino Unido) al sobrenadante para inhibir la tripsina residual de las muestras. La conversión de la prototoxina en la toxina fue evaluada mediante una SDS-PAGE.

Análisis del espectro de DC de la prototoxina épsilon recombinante purificada y de sus variantes

Para confirmar que las mutaciones de Tyr no alteran la estructura secundaria a las proteínas, los mutantes purificados se analizaron mediante una espectroscopia de DC (King's College, Londres).

Ensayo de citotoxicidad

La actividad citotóxica de las toxinas épsilon activadas con tripsina frente a las células MDCK.2 fue determinada mediante la medición de la liberación de la deshidrogenasa de lactato (LDH) desde las células necróticas mediante el uso del kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96 (Promega UK, Southampton, Reino Unido) según el protocolo del fabricante. En resumen, se preparó una serie de diluciones dobles de cada toxina activada (que varían 3 μ M hasta 1,46 nM) en PBS y se añadieron a las células MDCK.2 sembradas en placas de 96 pocillos (2 x 10⁴ células/pocillo). Después de una incubación a 37 °C durante 3 horas, se recogió el medio de cultivo celular (50 μ l) de las monocapas de la muestra y se transfirió a nuevas placas de ensayo enzimático de 96 pocillos y se añadieron 50 μ l de mezcla de sustrato reconstituido a cada pocillo. La placa se incubó durante 30 min a la temperatura ambiente, protegida de la luz. Se leyó la absorbancia a 490 nm mediante el uso de un lector de microplacas Modelo 680 (Bio-Rad). Se determinó la dosis de la toxina necesaria para destruir el 50 % de la monocapa de células (CT₅₀) mediante un análisis de regresión no lineal (GraphPad). Los valores de la absorbancia de cada muestra fueron normalizados sustrayendo el valor de la absorbancia obtenido para el medio de cultivo de las células no tratadas. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado con tres réplicas técnicas en cada uno.

Ensayo de unión

Se usaron ensayos de inmunotransferencia Western en la célula para la medición directa de la unión de la prototoxina purificada y de sus variantes a las células MDCK.2. La prototoxina inactiva se une a los mismos receptores de la superficie celular que la molécula completamente activa, y puede impedir su unión y una toxicidad adicional (Petit *et al.* (1997)). En resumen, se sembraron placas de microtitulación de 96 pocillos negras con 2 x 10⁴ células MDCK.2/pocillo en medio EMEM que contiene un 10 % de suero bovino fetal. Para permitir la adhesión de las células, las placas se incubaron durante una noche a 37 °C en una atmósfera humidificada de un 95 % de aire / 5 % de CO₂. Al día siguiente las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1 mM. Se añadió cada prototoxina purificada por afinidad a los pocillos por triplicado que contenían las células MDCK.2 a una concentración final de 5 μ M. Las células se incubaron con la prototoxina durante 30 min a 37 °C en una atmósfera humidificada de un 95 % de aire / 5 % de CO₂. Para el control de fondo, se incubaron pocillos por triplicado únicamente con PBS. La toxina no unida se eliminó mediante el lavado de las monocapas de células tres veces con PBS. Después las células se fijaron con formaldehído al 4 % a la temperatura ambiente durante 15 min. Después de lavar las monocapas de células con PBS tres veces, los pocillos se bloquearon durante 1,5 horas mediante el uso de tampón de bloqueo Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos). La proteína unida fue detectada con una dilución a 1:500 y anticuerpo monoclonal de ratón anti-etiqueta de His (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) y con una dilución a 1:500 de anticuerpo de IgG de cabra anti-ratón IRDye 800CW (H + I) (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos). Se obtuvieron las imágenes de las placas a 800 nm para la detección del anticuerpo secundario marcado con IRDye mediante el uso del sistema de obtención de imágenes por infrarrojos Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado con tres réplicas técnicas en cada uno.

Inmunización de los conejos

La variante de la prototoxina épsilon Y43A/Y209A en un trasfondo natural fue enviada a Immune Systems Ltd para la inmunización de conejos blancos de Nueva Zelanda. Para cada inyección se liofilizaron 1,7 mg de proteína y se usaron para la inmunización de tres conejos. Para la inmunización inicial se usó adyuvante completo de Freund. El resto de las inmunizaciones usaron adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones se llevaron a cabo cada 14 días y se realizó una extracción de sangre el día 107, 9 días después de la última inyección.

Resultados

Expresión de la prototoxina épsilon recombinante (P-Etx) y de sus variantes en E. coli

La P-Etx recombinante contiene la mutación H149A (la numeración de esta mutación se corresponde con la prototoxina sin el péptido N-terminal, la SEQ ID NO: 26), que hace que la toxina activada por tripsina sea 6 veces menos tóxica para las MDCK y 67 veces menor tóxica en ratones (Oyston *et al.* (1998)), permitiendo la manipulación de la toxina activada a un nivel de contención de 2. La H149 está localizada en el dominio III de la Etx, en estrecha proximidad con la punta de la horquilla β del dominio II, con la cadena lateral de His enterrada por el péptido C-terminal del dominio III. Por lo tanto, es improbable que la presencia de esta mutación interfiera con la unión al receptor de la Etx, lo que se sugiere que está mediada por el dominio I en el N-terminal. Es probable que la H149A reduzca la citotoxicidad de la Etx interfiriendo bien con la oligomerización o bien con el mecanismo de extensión de la horquilla. Además, el ensayo con células MDCK de la H149A mutante dirigida (EtxB) demostró que la H149 no juega un papel clave en la actividad de la Etx (Payne, *et al.* (1997) *Rev. Med. Microbiol.* vol. 8, S31).

Para identificar los residuos implicados en la unión al receptor de la Etx, se clonó el gen que codifica la prototoxina épsilon (P-Etx) en el vector de expresión pET-26b(+) según se describe en Materiales y procedimientos. La P-Etx recombinante contiene el péptido de señalización PelB en lugar del péptido de 13 aminoácidos N-terminal, y una etiqueta de polihistidina C-terminal (6 x His) secuencia abajo de la secuencia peptídica C-terminal, para ayudar a la posterior purificación de la prototoxina mediante una cromatografía de afinidad (Figura 1). El péptido de señalización PelB dirige la proteína P-Etx expresada al periplasma bacteriano, donde su secuencia es eliminada por una peptidasa de señalización.

Para un elevado nivel de expresión de la P-Etx, se transfirió el plásmido recombinante a la cepa lisógena DE3 de *E. coli* Rosetta 2 portadora de una copia cromosómica del gen de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 bajo el control del promotor lacUV5, y la expresión fue inducida mediante el uso del sistema de autoinducción según describe Studier (2005; *Prot. Exp. Purif.* vol. 41, 207-234). Como se muestra en la Figura 2A, la proteína P-Etx recombinante es expresada fundamentalmente en la fracción soluble. Se predijo que la P-Etx completa sin la secuencia del péptido de señalización PelB codificaría una proteína de 32,79 kDa. La proteína recombinante tenía un tamaño molecular aparente de 35 kDa (proteína marcada con His) según se detectó mediante una SDS-PAGE y un análisis por inmunotransferencia Western (Figuras 2A, B). La purificación por afinidad de la etiqueta de His dio como resultado un elevado rendimiento de aproximadamente 100 mg de proteína purificada por litro de cultivo. El peso molecular real de la prototoxina fue determinado mediante un análisis por espectrometría de masas, que se correspondía con el peso molecular esperado de 32,79 kDa (Figura 2 C).

Mutagénesis dirigida de la P-Etx para la identificación del papel de las tirosinas en la unión al receptor

Para probar el papel del dominio N-terminal I de la Etx en la unión a la célula, los inventores se dirigieron inicialmente a dos bucles de esta región mediante una mutagénesis por delección, denominados bucle 1 (Δ K32-I55) y bucle 2 (Δ S201-S220). Sin embargo, las delecciones de los bucles dieron lugar a una inestabilidad en la toxina, ya que la mayor parte de la proteína era expresada en la fracción insoluble, y la purificación de la proteína soluble dio como resultado unos rendimientos que eran poco prácticos para los ensayos adicionales de citotoxicidad y de unión. Para identificar el papel de los bucles 1 y 2 en la unión a la célula, los inventores se concentraron a continuación en la mutagénesis de los residuos individuales de estos bucles. Se seleccionaron seis tirosinas superficiales expuestas para la mutagénesis dirigida, cinco residuos en el bucle 1 (Y29, Y33, Y42, Y43 e Y49) y un residuo en el bucle 2 (Y209), siendo cada una sustituida individualmente por alanina. Cada mutante de Tyr fue expresada y purificada mediante el uso del procedimiento desarrollado para la P-Etx natural. De forma similar a la P-Etx natural, todos los mutantes de Tyr se expresaban fundamentalmente en la fracción soluble, y dieron unos rendimientos y una pureza similares a la P-Etx natural (Figuras 3A, 3B), lo que indica que estas mutaciones no afectan a la estructura de la toxina. Además, los perfiles de digestión de la tripsina de todos los mutantes de Tyr eran idénticos a los de la P-Etx natural, produciendo una toxina activa de menor peso molecular (Figura 3C). Un análisis espectral por DC adicional confirmó que todos los mutantes de Tyr están adoptando una conformación predominantemente en lámina β , similar a la P-Etx natural (datos no mostrados), lo que indica que los mutantes de tirosina única están plegados correctamente.

Actividad citotóxica de los mutantes de tirosina única

La P-Etx recombinante puede ser activada mediante una digestión con tripsina, que elimina un péptido C-terminal junto con la etiqueta de His (Figura 1). Para determinar el efecto de las mutaciones de tirosina única sobre la actividad citotóxica de la Etx, se activó cada prototoxina mutante mediante una digestión con tripsina. Se añadió una serie de diluciones dobles (que varían desde 3 μ M hasta 1,46 nM) de cada toxina activada, a células MDCK.2 sembradas en placas de 96 pocillos, según se describe en Materiales y procedimientos. Después de 3 h de incubación a 37 °C, se recogió en medio de cultivo celular y se midió la citotoxicidad mediante el ensayo de la LDH, que mide cuantitativamente la cantidad de LDH liberada desde el citosol de las células lisadas en el medio de cultivo celular. La dosis del cultivo tisular de cada toxina que destruye el 50 % de las células (CT₅₀) se determinó mediante un análisis de regresión no lineal y se comparó con la de la Etx "natural" (que comprende la mutación H149A). La actividad citotóxica de las mutantes de tirosina fue expresada como el cambio en el número de veces en la CT₅₀ con

respecto a la toxina "natural". Los mutantes Y43A e Y209A mostraron una actividad citotóxica significativamente reducida con respecto a la toxina "natural" (un aumento de 27 veces y de 10 veces en la CT₅₀, respectivamente, Figura 4). La mutación Y43A está localizada en el bucle 1. La citotoxicidad de las células MDCK.2 tratadas con la P-Etx inactivada era indistinguible de la de las células de control sin tratar (datos no mostrados). Se determinó que el promedio de la CT₅₀ para la toxina épsilon "natural" era de 22 nM en 100 µl (721 ng por ml).

Unión de las mutantes de tirosina única a las células MDCK.2

Los inventores ensayaron a continuación si la reducida citotoxicidad de los mutantes de Tyr única estaba relacionada con su reducida capacidad para unirse a las células MDCK.2. Para ello se llevaron a cabo estudios Western en células mediante el uso de la prototoxina según se describe en Materiales y procedimientos. En resumen, se sembraron placas de 96 pocillos con 2×10^4 células MDCK.2/pocillo, se incubaron con la prototoxina purificada a una concentración final de 5 µM durante 30 min a 37 °C. La proteína unida fue detectada con un anticuerpo primario específico para la etiqueta de His y un anticuerpo secundario marcado con IRDye 800CW. Las imágenes de las placas se obtuvieron mediante el uso de un captador de imágenes Odyssey. Todos los estudios de unión usaron la prototoxina, ya que puede unirse a las células sin provocar la lisis celular (véase la Figura 7A). Los mutantes Y43A e Y209A mostraron una actividad de unión significativamente reducida con respecto a la prototoxina 'natural' (-21 veces y -6 veces, respectivamente; Figura 5) según se determinó mediante la cuantificación de la señal fluorescente de cada pocillo mediante el uso de un análisis ANOVA monofactorial. La reducción más significativa en la señal fluorescente se observó en el mutante Y43A, lo que indica que el Y43 juega un papel crítico en la unión a la célula. La reducida capacidad de unión de las mutantes de Tyr se correlacionaba con su reducida capacidad para unirse a las células (Tabla 1).

Tabla 1

Mutante de tirosina	% de actividad citotóxica con respecto a la natural	% de actividad de unión con respecto a la natural
Y33A	45	75
Y29A	32	62
Y42A	19	33
Y49A	15	26
Y209A	10	19
Y43A	4	5

El % de actividad citotóxica de los mutantes de tirosina se basa en el número de veces de cambio en la CT₅₀ con respecto a la natural, según se determina en la Figura 4. El % de actividad de unión de los mutantes de tirosina se basa en la intensidad de la señal fluorescente con respecto a la natural, según se determina en la Figura 5.

El mutante doble de Tyr Y43A/Y209A es inactivo

Para evaluar adicionalmente el papel de los residuos de tirosina en la unión a la célula, se generó un mutante doble de Tyr combinando las mutaciones Y43A e Y209A, denominado Y43A/Y209A, que tenía el mayor efecto sobre la reducción de las actividades citotóxica y de unión de la toxina épsilon. El Y43A/Y209A fue expresado y purificado mediante el uso del procedimiento desarrollado para la P-Etx natural. De forma similar a la P-Etx natural, el Y43A/Y209A se expresaba fundamentalmente en la fracción soluble y dio unos rendimientos y una pureza similares a los de la P-Etx "natural" (Figura 6A). Además, su perfil de digestión con tripsina era idéntico al de la P-Etx "natural", lo que indica que la combinación de las mutaciones Y43A e Y209A no afecta a la estructura de la toxina (Figura 6B). Un análisis espectral por DC adicional confirmó que el mutante doble de tirosina está adoptando una conformación predominantemente en lámina β, similar a la de la P-Etx "natural" (datos no mostrados).

Para determinar el efecto del Y43A/Y209A sobre la actividad citotóxica de la toxina épsilon, se añadió una serie de diluciones dobles (que varían desde 3 µM hasta 1,46 nM) de la toxina activada con tripsina a células MDCK.2 sembradas en placas de 96 pocillos, según se describe en Materiales y procedimientos. Después de 3 h de incubación a 37 °C, se recogió el medio de cultivo celular y se midió la citotoxicidad mediante el uso del ensayo de la LDH. La actividad citotóxica del Y43A/Y209A activado con tripsina se comparó con la de la P-Etx "natural" inactivada. Como se muestra en la Figura 7A, la citotoxicidad del Y43A/Y209A activado con tripsina era equivalente a la de la P-Etx "natural" inactivada, lo que indica que este mutante es inactivo, y que la combinación de las mutaciones Y43A e Y209A tiene un efecto acumulativo en la reducción de la citotoxicidad de la Etx. Para probar si la pérdida de la actividad citotóxica del Y43A/Y209A estaba correlacionada con su incapacidad para unirse a las células MDCK.2, se llevaron a cabo estudios Western en células mediante el uso de la prototoxina inactiva, según se describe en Materiales y procedimientos. Como se muestra en la Figura 7B, la señal fluorescente de las células tratadas con el Y43A/Y209A es equivalente a la de las células tratadas únicamente con PBS, lo que indica que la aparente pérdida de actividad citotóxica del Y43A/Y209A es debida a su incapacidad para unirse a las células.

Y43A/Y209A como candidato de vacuna

El mutante inactivo Y43A/Y209A identificado en este estudio también porta la mutación H149A, por lo que la toxina puede ser manipulada a nivel ACGM 2. Para excluir la posibilidad de que el mutante doble de Tyr sea inactivo debido a un efecto acumulativo basado en la presencia de la mutación H149A, se reintrodujo la mutación H149 en el mutante doble de Tyr mediante una mutagénesis dirigida para crear el mutante doble en el trasfondo natural de H149. La actividad citotóxica y la actividad de unión del mutante Y43A/Y209A en el trasfondo natural (Y43A/Y209A_A149H) eran idénticas a la del trasfondo H149A (Figura 8). Se seleccionó este mutante para pruebas adicionales como candidato de vacuna.

Se cribó un antisuero creado en conejos por su capacidad para proteger las células MDCK.2 cultivadas frente a la citotoxicidad inducida por la toxina "natural". También se probó la capacidad del antisuero para bloquear la unión de la P-Etx natural a las células MDCK.2.

Análisis

Los presentes datos demuestran que el dominio I de la toxina épsilon juega un papel en la unión a la célula. La metodología inicial de los inventores era la determinación de si las regiones de bucle del dominio I están implicadas en la unión a la célula, pero fueron incapaces de generar una cantidad suficiente de proteína soluble y estable a partir de estos mutantes de delección de bucle para ensayos adicionales. Por el contrario, todos los mutantes de Tyr era solubles, y el análisis mediante DC indicó que estas proteínas estaban plegadas correctamente, descartando la posibilidad de que la reducida actividad citotóxica de estos mutantes fuera debida a un cambio en su estructura. Los resultados confirman que el dominio I de la Etx juega un papel en la unión a la célula, y también que no puede producirse citotoxicidad en ausencia de unión.

Por lo tanto, los resultados confirman que el dominio I de la Etx juega un papel en el reconocimiento de la superficie celular. Sin embargo, la identidad del (los) receptor(es) de la superficie celular de la Etx todavía está por determinar. Al igual que la aerolisina y la PS, la Etx parece dirigirse a los dominios DRM de las superficies celulares (Abrami & van Der Groot (1999) J. Cell Biol. vol. 147, 175-184). La Etx tanto monomérica como heptamérica se acumula en estos DRM. Aunque la prototoxina es incapaz de heptamerizar, es capaz de unirse al mismo receptor que el usado por la toxina activada, lo que indica que la heptamerización no es un prerequisite para la unión a las células objetivo. Se ha demostrado que los cambios en el contenido en gangliósido de los DRM afectan a la unión de la toxina (Shimamoto et al. (2005) Microbiol. Immunol. vol. 49, 245-253). Sin embargo, no hay ninguna prueba directa de la unión de la toxina al gangliósido.

Los inventores también identificaron un mutante doble de Tyr Y43A/Y209A con una aparente ausencia de actividad citotóxica y de unión, y han demostrado que la presencia de la mutación H149A no contribuye a su pérdida de actividad. El Y43A/Y209A en un trasfondo natural (Y43A/Y209A_A149H) podría formar la base de una vacuna recombinante contra la enterotoxemia mediada por la Etx en animales. La presencia de dos mutaciones en el Y43A/Y209A reduce en gran medida el riesgo de reversión de la actividad completa en comparación con una proteína recombinante con solo una única mutación, haciendo que el Y43A/Y209A sea un candidato de vacuna ideal. Además, las vacunas recombinantes ofrecen una baja variabilidad entre lote y lote en comparación con la vacuna existente disponible comercialmente contra la Etx, que está basada en el tratamiento de filtrados de cultivos de *C. perfringens* de tipo D con formaldehído.

En conclusión, los inventores han identificado un agrupamiento distintivo de residuos de tirosina expuestos en la superficie del dominio I de la toxina épsilon que es crítico para la interacción de la Etx con el receptor de las células MDCK.2, proporcionando una prueba adicional de que la unión de la Etx a las células está mediada a través del dominio I. Sin embargo, la identidad del receptor de la célula objetivo está por desvelar. También se generó una proteína variante Y43A/Y209A recombinante que podría usarse para el desarrollo de una vacuna más eficaz contra la enterotoxemia mediada por la Etx en animales.

Tabla 2 – cebadores usados para la mutagénesis dirigida

Cambio de aminoácido	SEQ ID NO	Secuencia del cebador ^a
Y29A_F	37	CTTCTTATGATAATGTAGATACATTAATTGAGAAAGGAAGAGCGAAT ACAAAATATAATTACTTAAAGAGAATGGAAAAATATTA
Y29A_R	38	TAATATTTTCCATTCTCTTTAAGTAATTATTTTGTATTGCTCTTCC TTTCTCAATTAATGTATCTACATTATCATAAGAAG
Y33A_F	39	GTAGATACATTAATTGAGAAAGGAAGATATAATACAAAAGCGAATTA CTTAAAGAGAATGGAAAAATATTATCCTAATGCT
Y33A_R	40	AGCATTAGGATAATATTTTCCATTCTCTTTAAGTAATTGCTTTTGTATT ATATCTTCCTTTCTCAATTAATGTATCTAC

(continuación)

Cambio de aminoácido	SEQ ID NO	Secuencia del cebador a
Y42A_F	41	AAAGGAAGATATAATACAAAATATAATTACTTAAAGAGAATGGAAAA AGCGTATCCTAATGCTATGGCATATTTTGATAA
Y42A_R	42	TTATCAAAATATGCCATAGCATTAGGATACGCTTTTCCATTCTCTTTAA GTAATTATATTTTGTATTATATCTTCCTTT
Y43A_F2	45	GAAAGGAAGATATAATACAAAATATAATTACTTAAAGAGAATGGAAAA ATATGCGCCTAATGCTATGGCATATTTTGATAAGG
Y43A_R2	46	CCTTATCAAAATATGCCATAGCATTAGGCGCATATTTTCCATTCTCTTT AAGTAATTATATTTTGTATTATATCTTCCTTTC
Y49A_F	47	GAATGGAAAAATATTATCCTAATGCTATGGCAGCGTTTGATAAGGTTAC TATAAATCCACAAGGAAA
Y49A_R	48	TTTCCTTGTGGATTTATAGTAACCTTATCAAACGCTGCCATAGCATTAGG ATAATATTTTCCATTTC
Y209A_F	49	GTGAATGGGGAGAGATACCTAGTGCGTTAGCTTTTCTAGGGATGGTTA
Y209A_R	50	TAACCATCCCTAGGAAAAGCTAACGCACTAGGTATCTCTCCCCATTACAC
A149H_F	51	CAAATACAAATACAAATACTAATTCAAAGAAATTACTCATAATGTCCC TTCACAAGATATACTAG
A149H_R	52	CTAGTATATCTTGTGAAGGGACATTATGAGTAATTTCTTTTGAATTAGT ATTGTATTTGTATTTG

^a Las bases subrayadas son los codones usados para la sustitución. La numeración de los aminoácidos para las mutaciones de Y se corresponden con la prototoxina con la secuencia peptídica N-terminal (se corresponde con PDB 1UYJ; SEQ ID NO: 3). La numeración de los aminoácidos para la mutación A149H se corresponde con la prototoxina sin la secuencia peptídica N-terminal.

Tabla 3 - identidad de las secuencias incluidas en la solicitud

SEQ ID NO	Identidad de la secuencia
1	toxina épsilon completa con las mutaciones Y43A e Y209A
2	toxina épsilon nativa natural completa
3	secuencia usada para la obtención de la estructura cristalina (PDB ID:1YUJ)
4	toxina épsilon completa con la mutación Y43A, Y209A y H149As
5	toxina épsilon recombinante natural activada con tripsina
6	toxina épsilon recombinante activada con tripsina con las mutaciones Y43A e Y209A
7	toxina épsilon completa con la mutación Y43A
8	toxina épsilon completa con la mutación Y209A
9	toxina épsilon completa con la mutación H149A
10	toxina épsilon completa con la mutación Y43A y H149As
11	toxina épsilon completa con la mutación Y209A y H149As
12	toxina épsilon recombinante completa
13	toxina épsilon recombinante completa con la mutación Y43A
14	toxina épsilon recombinante completa con la mutación Y209A
15	toxina épsilon recombinante completa la mutación Y43A e Y209A
16	toxina épsilon recombinante completa con la mutación H149A
17	toxina épsilon recombinante completa con las mutaciones H149A e Y43A
18	toxina épsilon recombinante completa con las mutaciones H149A e Y209A
19	toxina épsilon recombinante completa con las mutaciones H149A, Y43A e Y209A
20	toxina épsilon recombinante natural activada con tripsina con la mutación Y43A
21	toxina épsilon recombinante natural activada con tripsina con la mutación Y209A

(continuación)

SEQ ID NO	Identidad de la secuencia
22	toxina épsilon recombinante activada con tripsina con la mutación H149A
23	toxina épsilon recombinante activada con tripsina con las mutaciones H149A e Y43A
24	toxina épsilon recombinante activada con tripsina con las mutaciones H149A e Y209A
25	toxina épsilon recombinante activada con tripsina con las mutaciones H149A, Y43A e Y209A
26	toxina épsilon natural sin el péptido N-terminal
27	toxina épsilon natural sin el péptido N-terminal y con la mutación H149A
28	toxina épsilon recombinante sin el péptido líder PelB
29	toxina épsilon recombinante sin el péptido líder PelB con la mutación H149A

Tabla 4 - secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos

SEQ ID NO del ADN	SEQ ID NO de codificación del aminoácido
55	1
56	4
57	6
58	15
59	19
60	25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del epítipo de la toxina épsilon que comprende una secuencia de al menos 260 aminoácidos de longitud que consiste en los aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 3 y que comprende la secuencia de aminoácidos RMEKYXPNAM (SEQ ID NO: 33) en la que "X" es cualquier aminoácido distinto de Y, siendo el polipéptido capaz de unirse a un anticuerpo que se une a la SEQ ID NO: 5 y que tiene una toxicidad reducida en comparación con la toxicidad de la SEQ ID NO: 5.
2. El polipéptido según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una mutación en la posición Y29, Y33, Y42, Y49 y/o Y209, como se encuentra en la SEQ ID NO: 3,
3. El polipéptido según la reivindicación 1 o 2 en el que el aminoácido Y es sustituido por el aminoácido A.
4. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que no es tóxico.
5. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que consiste en, o que comprende, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 1, 4, 6, 15, 19 o 25.
6. Un polinucleótido que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Un polinucleótido según la reivindicación 6 que tiene una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre las SEQ ID NO: 55-60.
8. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 6 o 7.
9. Una célula que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y/o un polinucleótido según la reivindicación 6 o 7 y/o un vector según la reivindicación 8.
10. Una vacuna subunitaria que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
11. Un anticuerpo creado contra un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
12. Una composición de vacuna que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y/o un polinucleótido según la reivindicación 6 o 7 y/o un vector según la reivindicación 8 y/o una célula según la reivindicación 9 y/o una vacuna subunitaria según la reivindicación 10 y/o un anticuerpo según la reivindicación 11, opcionalmente en la que la composición de vacuna es un producto alimenticio para un ser humano o un animal.
13. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y/o un polinucleótido según la reivindicación 6 o 7 y/o un vector según la reivindicación 8 y/o una célula según la reivindicación 9 y/o una vacuna subunitaria según la reivindicación 10 y/o un anticuerpo según la reivindicación 11 y/o una composición de vacuna según la reivindicación 12 para su uso en un procedimiento de vacunación de un sujeto frente al desarrollo de una enfermedad causada por *Clostridium perfringens* y/o causada por la toxina épsilon activa, por ejemplo, en el que el sujeto es un animal rumiante, o es un ser humano.
14. Un kit que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y/o un polinucleótido según la reivindicación 6 o 7 y/o un vector según la reivindicación 8 y/o una célula según la reivindicación 9 y/o una vacuna subunitaria según la reivindicación 10 y/o un anticuerpo según la reivindicación 11 y/o una composición de vacuna según la reivindicación 12.

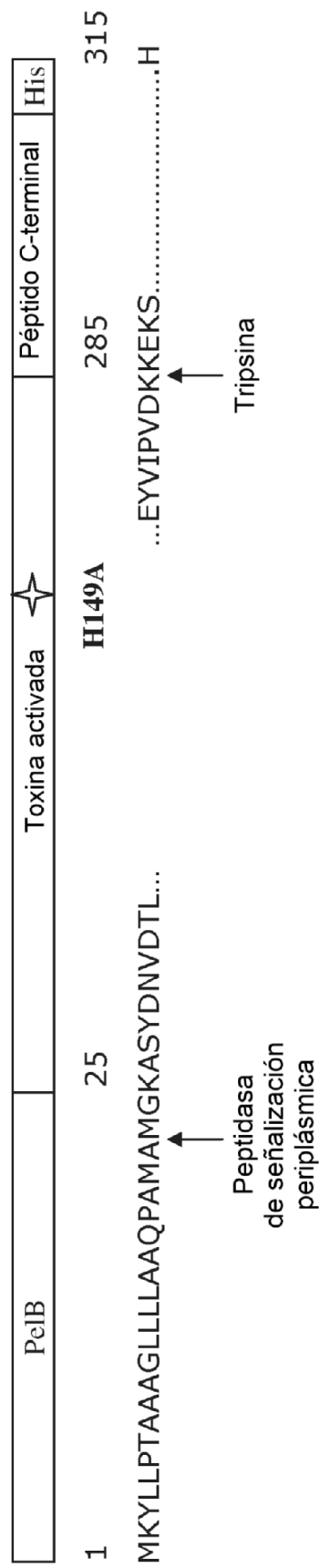
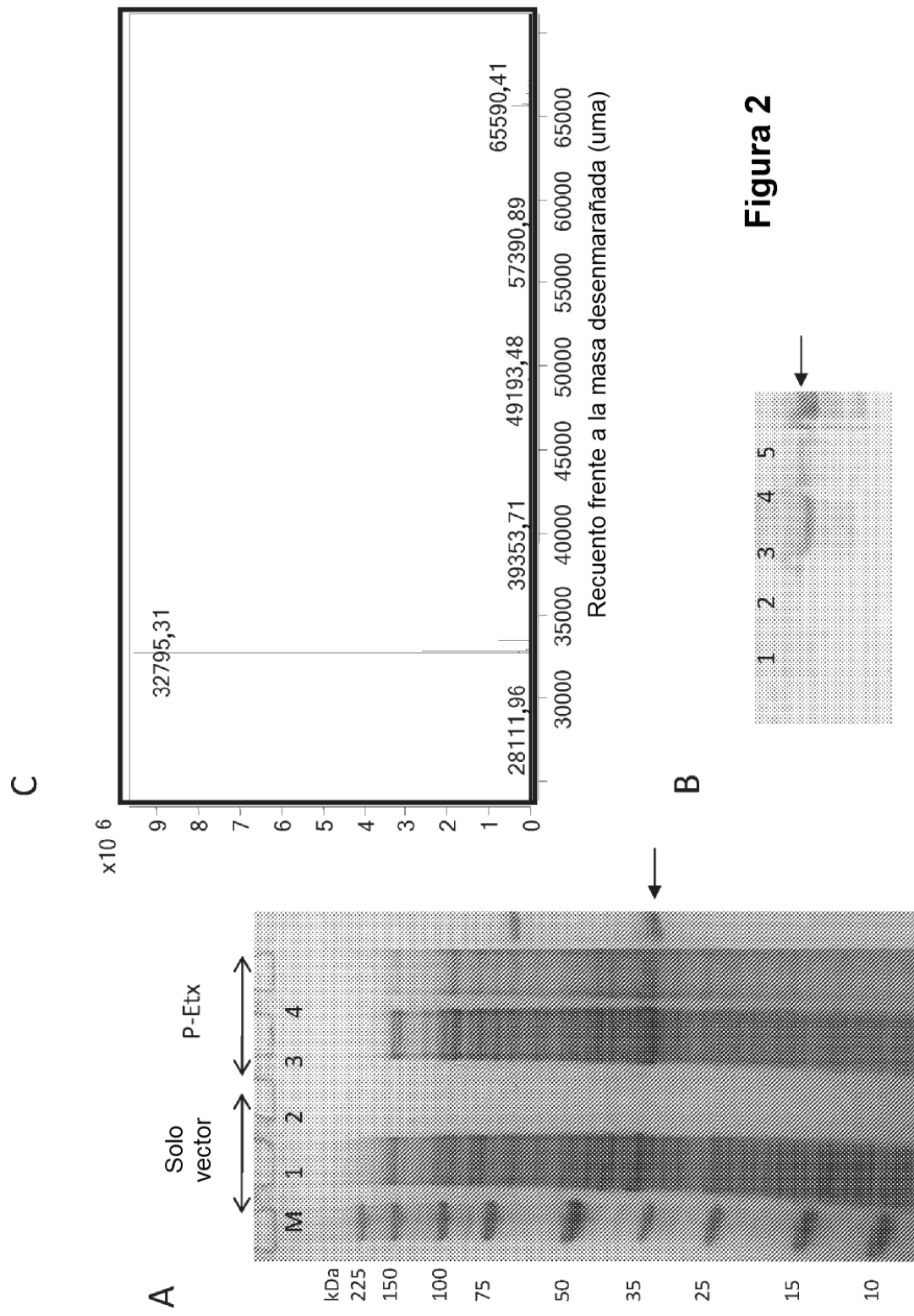


Figura 1



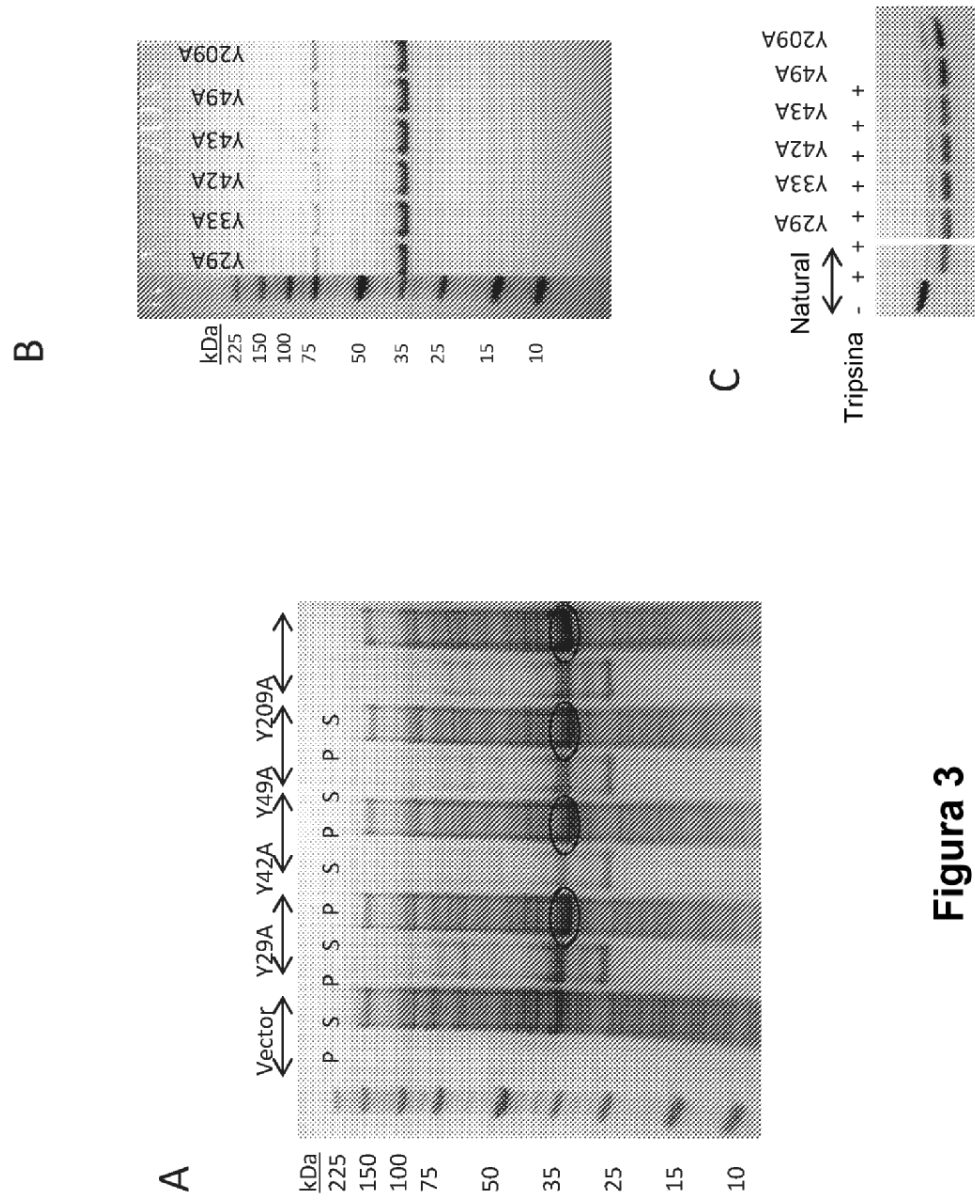


Figura 3

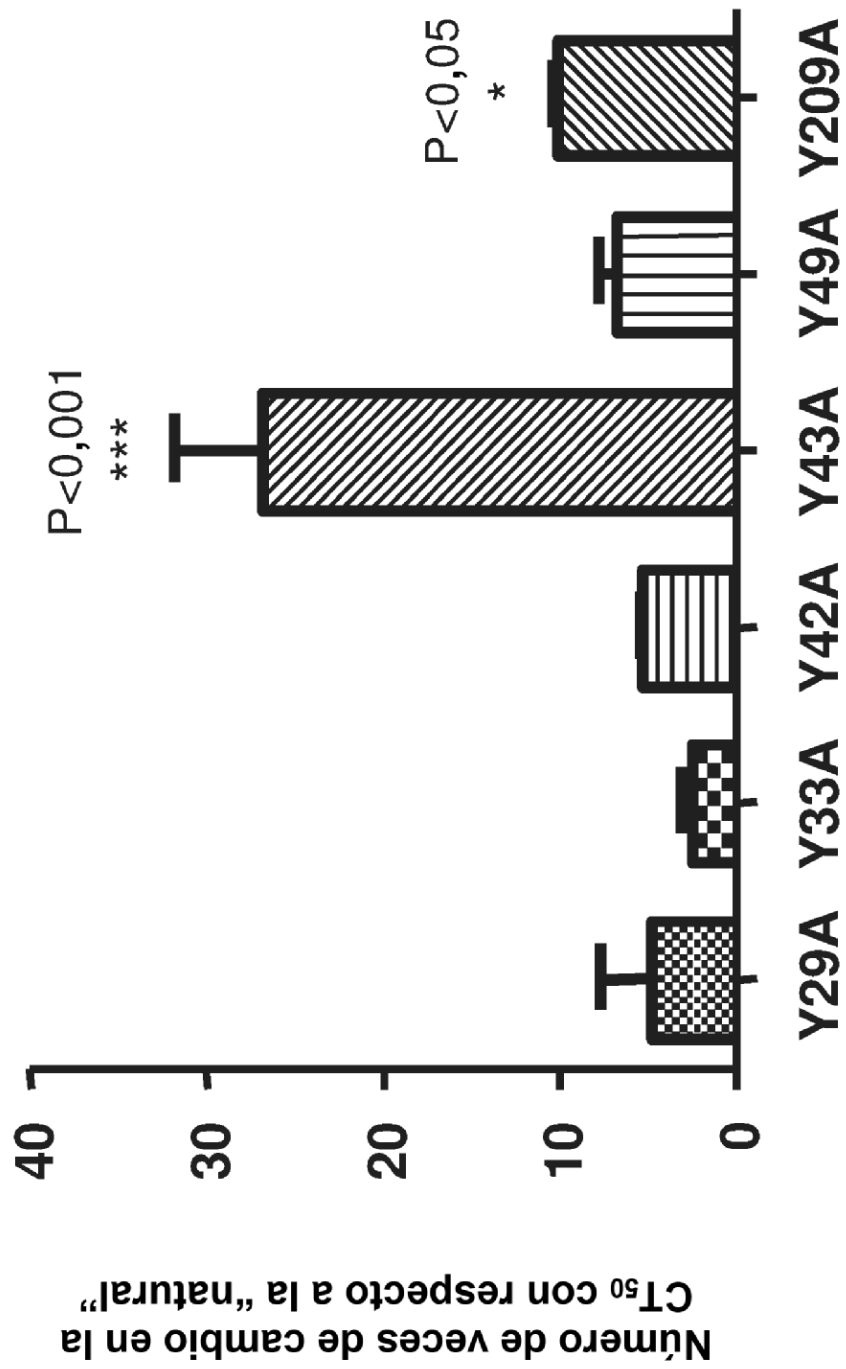


Figura 4

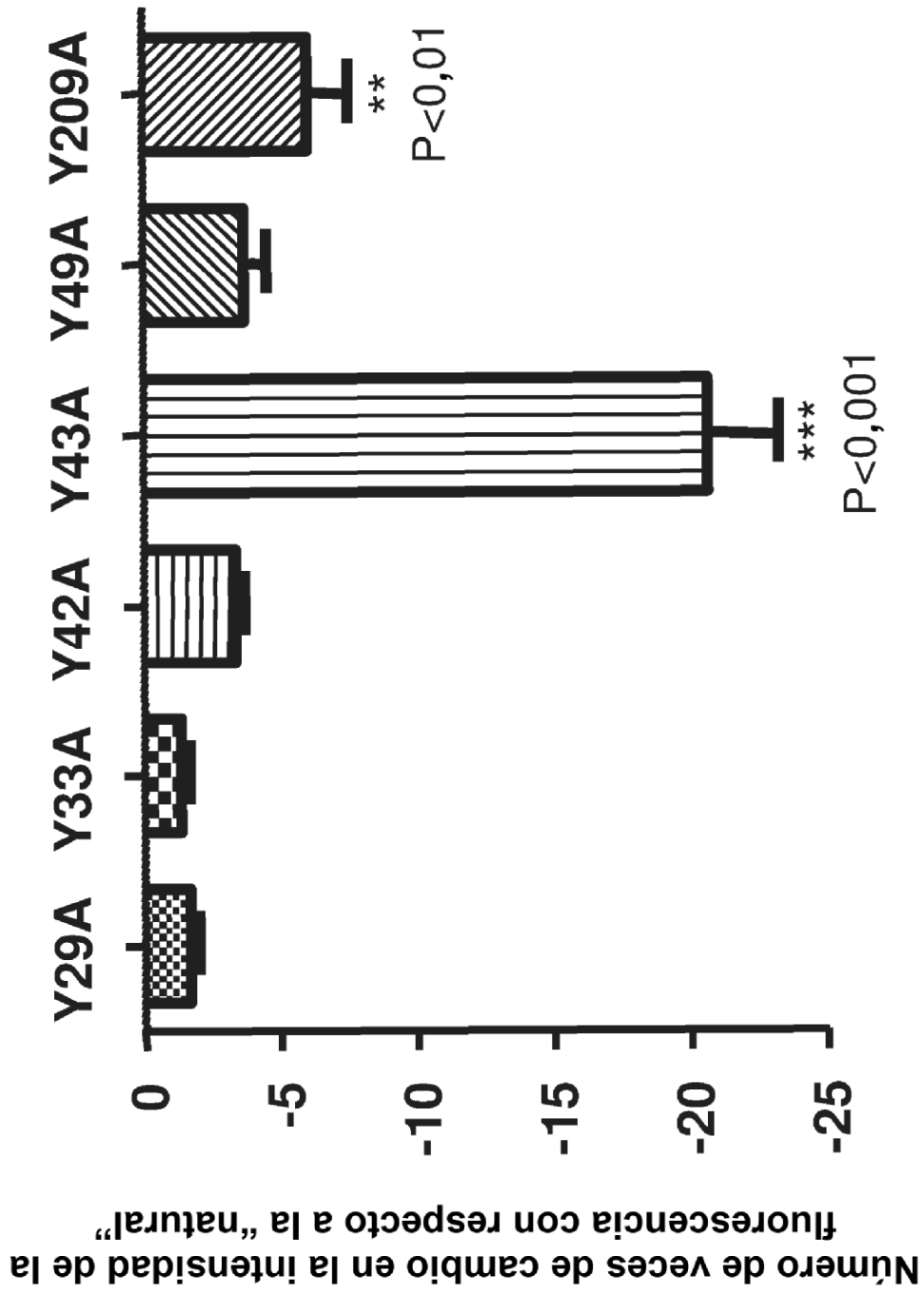


Figura 5

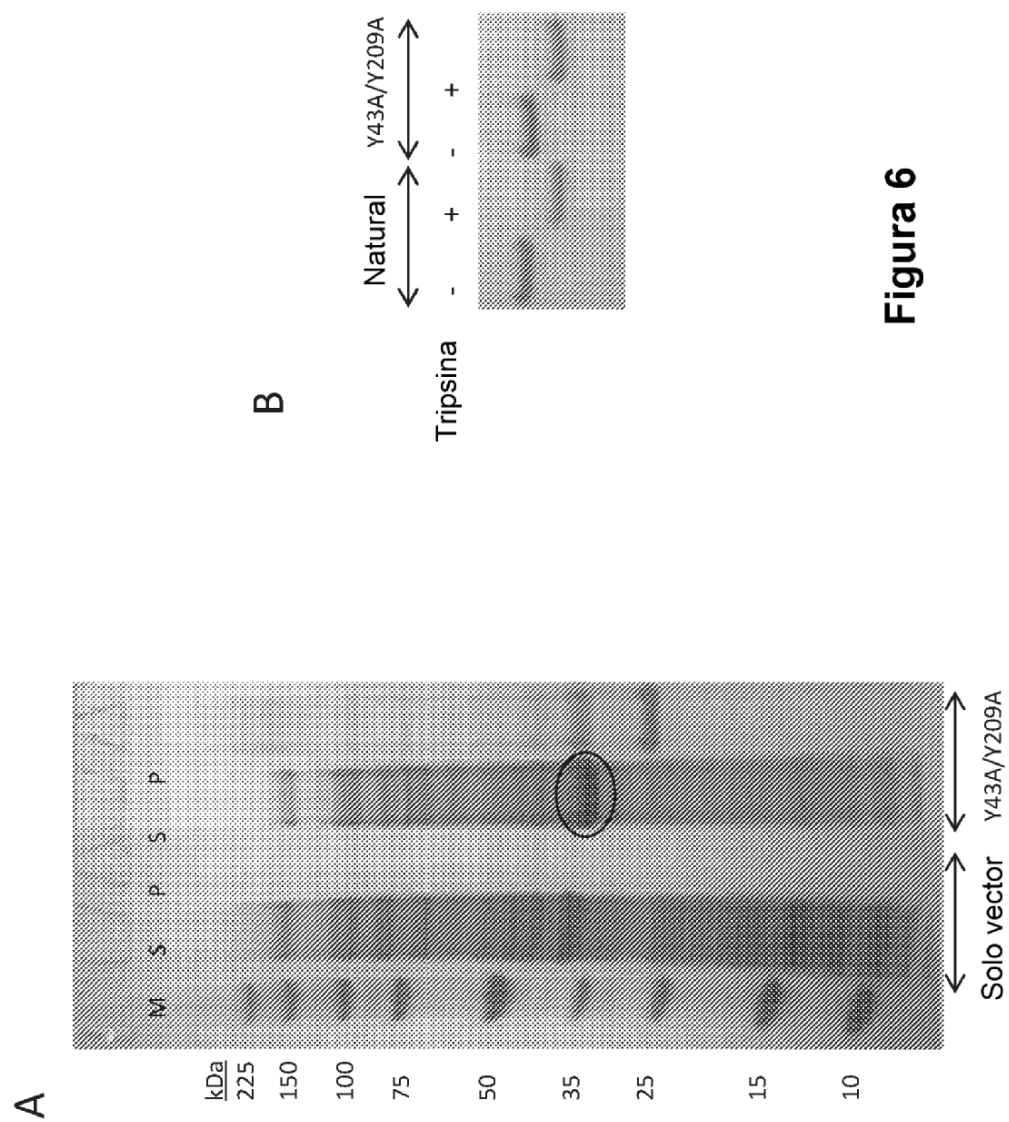


Figura 6

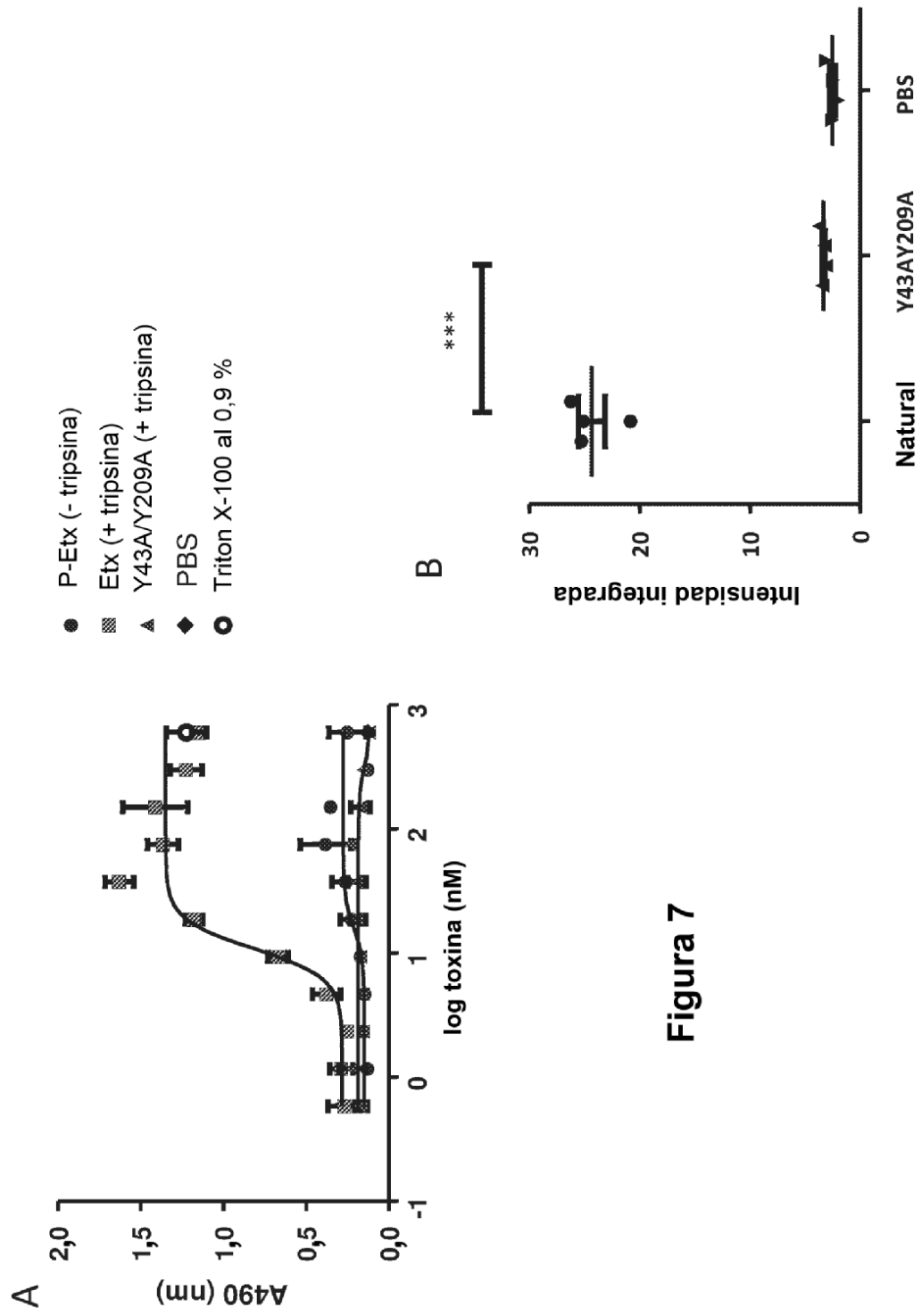


Figura 7

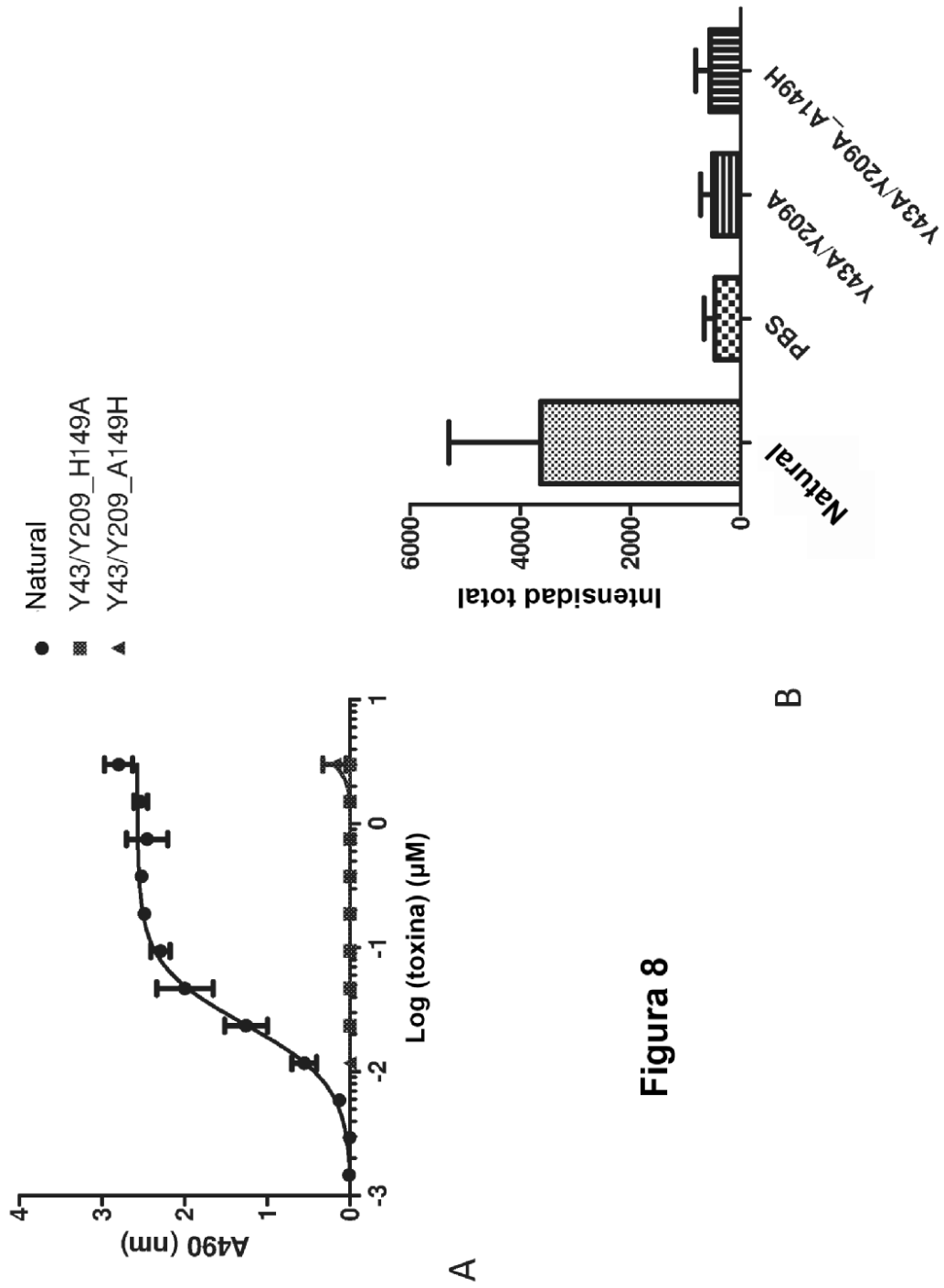


Figura 8