



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95951 (13) C2
(51) МПК
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ АТЕНУЙОВАНИЙ ОРГАНІЗМ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

1

(21) a200813301
(22) 12.04.2007
(24) 26.09.2011
(86) PCT/US2007/009135, 12.04.2007
(31) 60/792,553
(32) 17.04.2006
(33) US
(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.
(72) КОЧРАН МАРК Д., US, ПЕТЕРСЕН ГАРІ, US,
ЛЕР СТІВЕН В., US, СИНЕНКІ РІЧАРД, US
(73) ШЕРІНГ-ПЛАУ ЛТД., CH
(56) SCHOEPE ET AL: "Immunization with an
alphatoxin variant 121A/91-R212H protects mice
against Clostridium perfringens alphatoxin"
ANAEROBE, LONDON, GB, vol. 12, no. 1, February
2006 (2006-02), С. 44-48.
NAGAHAMA M ET AL: "Site-directed mutagenesis of
histidine residues in clostridium perfringens alpha-
toxin" JOURNAL OF BACTERIOLOGY,
WASHINGTON, DC, US, vol. 177, no. 5, March 1995
(1995-03), С. 1179-1185.
STEVENS D L ET AL: "Immunization with the C-
domain of alpha-toxin prevents lethal infection,
localizes tissue injury, and promotes host response to
challenge with Clostridium perfringens" JOURNAL OF
INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol.
190, no. 4, 19 July 2004 (2004-07-19), С. 767-773.
LOGAN A J ET AL: "Epitope mapping of the alpha-
toxin of Clostridium perfringens." INFECTION AND
IMMUNITY DEC 1991, vol. 59, no. 12, December
1991 (1991-12), С. 4338-4342.
US A 5 817 317, 06.10.1998.
WO A 02/07741, 31.01.2002.
GB A 1 483 042, 17.08.1977.
(57) 1. Атенуйований організм *Clostridium*
perfringens, сконструйований шляхом введення
молекули нуклеїнової кислоти, що кодує практично
нетоксичний мутеїн альфа-токсину *Clostridium*
perfringens, у хромосому неатенуйованого організ-
му *Clostridium perfringens*, де мутеїновий альфа-
токсин містить амінокислотну послідовність SEQ
ID NO: 3 мінус щонайменше 9 послідовних аміно-

2

кислотних залишків; та де одним з делетованих
амінокислотних залишків є His₆₈.
2. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 1, що є практично нетоксичним.
3. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 1, де молекула нуклеїнової кислоти роз-
ташована у хромосомі у положенні, що є гомологі-
чним положенню молекули нуклеїнової кислоти,
що кодує альфа-токсин дикого типу, присутньої у
неатенуйованому *Clostridium perfringens*.
4. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 1, що є видом А *Clostridium perfringens*.
5. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 1, де неатенуйований *Clostridium*
perfringens, з якого його було сконструйовано, був
виділений з тварини-хазяїна, що є ссавцем чи пта-
хом.
6. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 5, де вказаного ссавця вибирають з групи,
що складається з корови, вівці та свині.
7. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 5, де вказаним птахом є курка, індик, гу-
сак, качка, лебідь, дикий голуб, голуб, шотландсь-
ка куріпка чи куріпка.
8. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 1, що містить щонайменше один ген, що
кодує поліпептид, відмінний від *Clostridium*
perfringens.
9. Атенуйований організм *Clostridium perfringens* за
пунктом 8, де вказаний відмінний від *Clostridium*
perfringens поліпептид є небактеріальним поліпеп-
тидом.
10. Атенуйований організм *Clostridium perfringens*
за пунктом 9, де небактеріальний поліпептид є
пташиним поліпептидом чи поліпептидом ссавця.
11. Атенуйований організм *Clostridium perfringens*
за пунктом 10, де небактеріальний поліпептид є
пташиним поліпептидом.
12. Атенуйований організм *Clostridium perfringens*
за пунктом 10, де небактеріальний поліпептид є
цитокіном.
13. Атенуйований організм *Clostridium perfringens*
за пунктом 12, де цитокін є курячим IL-18.

(13) C2
(11) 95951
(19) UA

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА РОДИННІ ЗАЯВКИ

Ця заявка є не-попередньою заявкою, де заявлено пріоритет згідно до статті 35 U.S.C. § 119(e) попередньої заявки США № 60/792,553, поданої 17 квітня 2006 р., вміст якої повністю включено до цієї заявки шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід стосується атенуованих організмів *Clostridium*, способів їх одержання та використання, та мутантних альфа-токсинів та нуклеїнових кислот, що їх кодує.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Анаеробні бактеріальні патогени являють собою серйозне економічне навантаження на сільськогосподарське виробництво. Бактерії сімейства *Clostridium* призводять до особливих втрат, оскільки ці бактерії викликають серйозні хвороби у птахів та інших домашніх тварин, цінних з економічної точки зору. Попередні спроби контролю цих організмів були засновані на санітарних заходах та введенні антибіотиків у їжу тварин.

Зокрема, *Clostridium perfringens* ("C. perfringens") є анаеробною бактерією, що зустрічається у ґрунті, загниваючих органічних речовинах, та є частиною флори кишок людей та тварин. Різні штами *C. perfringens* позначені як біотики А - Е, в залежності від діапазону токсинів, що виробляють [Justin et al., *Biochemistry* 41, 6253-6262 (2002); McDonel (1986) *Pharmacology of Bacterial TOXINS*; F Dorner та J Drews (Eds.) Pergamon Press, Oxford]. Штами біотипу А є особливо важливими як етіологічні агенти різних видів гангрени та кишкових захворювань. Особливо серйозною кишковою хворобою, що викликають *C. perfringens* є ентерит некротичний (також відомий у цій галузі як "некротичний ентерит"), гангрена кишечника, що призводить до некрозу, сепсису та гемолізу, як у людей, так і у домашніх тварин [див., Pearson et al., *J. Am. Vet. Med.* 188(11):1309-10 (1986); Al-Sheikhy and Truscott, *Avian Dis.* 21(2):256-63 (1977)]. Для птахів, наприклад, курей (*Gallus gallus*), некротичний ентерит є значною проблемою. *C. perfringens* типу А чи типу С може спричинити великі витрати, особливо при одержанні бройлерних курей [Ficken and Wages, *Necrotic Enteritis, u Diseases of Poultry*, 10th Ed. pps 261-264 (1997)]. Крім втрат, пов'язаних із спалахами некротичного ентериту, повідомлялося про погіршення продуктивності овець з хворобою, пов'язаною з *C. perfringens* [Lovi and Kaldhusdal, *Avian Pathology* 30:73-81 (2001)]. Як відмічено вище, антибактеріальні агенти, введені у корм тварин, є найбільш розповсюдженим способом контролю. Проте, антибактеріальні агенти, наприклад, антибіотики, є дорогими та на них впливають багато факторів, пов'язаних із підвищенням стійкості до бактерій.

Нещодавно було здійснено спроби забезпечення вакцини проти шкідливих видів *Clostridium*. Наприклад, Lovland et al. [*Avian Pathology* 33(1):83-92 (2004)] продемонстрували кандидатні вакцини, засновані на *C. perfringens* типу А та типу С токсинах з наповнювачем - гідроксидом алюмінію. Вакцинація батьківських курей, як повідомлялося, за-

безпечує специфічні антитіла для захисту потомства від ентеричних пошкоджень, викликаних субклінічними ін'єкціями *C. perfringens*. Відомі інші вакцини на основі токсинів, одержані з детоксифованих токсинів *C. perfringens* [див. наприклад, Патент США № 4,292,307, де описано токсини *C. perfringens* типів А, В та D, *Cl. oedematiens*, та *Cl. septicum*].

Також були запропоновані рекомбінантні токсинні препарати. Наприклад, Titball et al., [Патенти США №№ 5,851,827, 6,403,094, та 5,817,317] повідомляють про нуклеїнові кислоти, що кодує антигенні пептиди *C. perfringens*, а також пептиди як такі, та вакцини, одержані з пептидів. Наприклад, описано пептиди, що мають амінокислотні залишки 261 -300 природного альфа-токсину *C. perfringens*, але в яких відсутня фосфоліпаза С та домени сфінгомелінін гідролізинів природного токсину. Додатково повідомлялося, що ці пептиди викликають імунний захист від природного токсину. Додатково, у патенті США № 6,610,300 описано вакцину на основі антигенного фрагменту мутантного бета-токсину *C. perfringens*.

Проте, незалежно від того, чи одержана токсинна вакцина з природних організмів або рекомбінантним шляхом, вважається, що вона економічно витратна для одержання та введення токсинних протейнів тваринам, що потребують імунізації, за винятком спеціальних умов (наприклад, лікування людей, що можуть мати алергію чи чутливість до інших компонентів вакцини для усього організму). Додатково, вакцини на основі протейну/токсину типово потребують бустерної вакцинації для збереження повної ефективності.

Інше запропоноване рішення полягало у конструюванні антигенно активного вірусу, що продукуватиме мутантний альфа-токсин, замість токсину дикого типу. Наприклад, Bennett et al. [*Viral Immunol.* 12(2):97-105 (1999)] продемонстрували рекомбінантний вірусний вектор коров'ячої віспи, що експресує нетоксичний С-доман альфа-токсину *C. perfringens*. На жаль, хоча протягом останніх 20 років було запропоновано декілька рекомбінантних вакцин коров'ячої віспи, все ще існує давня проблема щодо безпеки вивільнення живих інфекційних вірусів коров'ячої віспи в оточуюче середовище, де вони можуть потрапити людям, що не мають резистентності до цього вірусу.

Відомо, що альфа-токсин (plc ген) *C. perfringens* має декілька біологічних активностей, включаючи гемолітичну активність, фосфоліпазу С, сфінгомеліназу, фосфодіестеразу та летальну активність. З рівня техніки відомо ряд повідомлень стосовно мутацій до цих альфа-токсинів, що знижують токсичність. Schoepe, et al. [*Infect. and Immun.* 69(11): 7194-7196 (2001)] описують штам *C. perfringens*, що зустрічається у природі, що продукує нетоксичний альфа-токсин. Проте, може бути важко модифікувати цей штам для виклику імунного захисту від інших варіантних, але токсичних видів *C. perfringens* дикого типу.

Williamson та Titball [*Vaccine* 11(12): 1253-1258 (1993)] показали, що регіон токсину від амінокислотних залишків 247 до 370 окремо є достатнім

для імунізації мишей від газової гангрені, що була експериментально викликана *C. perfringens*. Alape-Girón et al. [Eur. J. Biochem. 267:5191-5197 (2000)] повідомили, що заміщення у Asp269, Asp336, Tyr275, Tyr307, та Tyr331 зменшували токсичність альфа-токсину. Nagahama, et al. [Infect. and Immun. 65:3489-3492 (1997)] повідомили, що заміщення Asp-56, Asp-130, або Glu-152 призвело до зменшення токсичності альфа-токсину. Nagahama et al. [J. Bacteriology 177:1179-1185 (1995)] повідомив, що заміщення гістидину у положенні 68 на нейтральну амінокислоту, таку, як гліцин, у альфа-токсині *C. perfringens* призводило до повної втрати гемолітичної, фософліпазної *C*, сфінгомеліназної та летальної активності мутантного альфа-токсину. Ця одинарна амінокислотна зміна вважалася такою, що інактивує один з трьох цинк-зв'язуючих доменів протеїну. Цинк-зв'язуючий домен, інактивований шляхом заміщення His68, був пізніше позначений як Zn2 [Justin et al., Biochemistry 47:6253-6262 (2002)].

Незважаючи на викладене вище, у цій галузі все ще залишається потреба у безпечному, економічному та ефективному способі захисту інтенсивно культивованих домашніх тварин, включаючи птахів, таких, як кури, від інфікування видами *Clostridium*, включаючи *C. perfringens*.

Цитування будь-яких посилань у цій заявці не повинно трактуватися як визнання того, що таке посилання наявне як "рівень техніки" для цієї заявки.

СТИСЛИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Для вирішення описаних вище проблем, що існують у цій галузі, даний винахід забезпечує молекули нуклеїнової кислоти, що кодують істотно нетоксичний мутант альфа-токсину *Clostridium perfringens*. В одному такому втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутантний альфа-токсин, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, мінус, щонайменше, 18 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В іншому втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутантний альфа-токсин, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, мінус, щонайменше, 12 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В ще одному втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутеїн, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 9 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В ще одному втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутеїн, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 6 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В ще одному втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутеїн, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 3 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈.

В одному втіленні, молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом кодує мутеїн, в якому не

більш, ніж 48 послідовних амінокислотних залишків делетовані з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3. В іншому втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутеїн, в якому не більш, ніж 36 послідовних амінокислотних залишків делетовані з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3. В ще одному втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутеїн, в якому не більш, ніж 24 послідовних амінокислотних залишків делетовані з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3. В ще одному втіленні, молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом кодує мутеїн, в якому не більш, ніж 18 послідовних амінокислотних залишків делетовані з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3.

В конкретному втіленні, даний винахід забезпечує молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує мутеїн, в якому дев'ять послідовних амінокислотних залишків делетовані з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3, один з яких являє собою His₆₈. В конкретному втіленні такого типу, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутеїн, в якому делетовано дев'ять послідовних амінокислотних залишків у діапазоні від Tyr₆₂ до Trp₇₀ SEQ ID NO: 3. В більш конкретному втіленні, молекула нуклеїнової кислоти кодує мутеїн, в якому ці делетовані дев'ять послідовних амінокислот заміщені одним лейциновим залишком.

В іншому втіленні, молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 2, де нуклеотиди 268-294 делетовано. У конкретному втіленні такого типу, нуклеотиди 268-294 нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 2 заміщені трьома нуклеотидами, що кодують одинарний лейциновий залишок.

Даний винахід також забезпечує істотно нетоксичні мутанти альфа-токсину *Clostridium perfringens*. В одному такому втіленні, мутантний альфа-токсин містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 18 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В іншому втіленні, мутеїн містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 12 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В ще одному втіленні, мутеїн містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 9 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В ще одному втіленні, мутеїн містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 6 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈. В ще одному втіленні, мутеїн містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 мінус, щонайменше, 3 послідовних амінокислотних залишків, де один з делетованих амінокислотних залишків являє собою His₆₈.

В одному втіленні, мутеїн за даним винаходом містить не більш, ніж 48 послідовних амінокислотних залишків, делетованих з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3. В іншому втіленні, мутеїн містить не більш, ніж 36 послідовних амінокислотних залишків, делетованих з амінокислотної послі-

довності SEQ ID NO: 3. В ще одному втіленні, мутеїн містить не більш, ніж 24 послідовних амінокислотних залишків, делетованих з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3. В ще одному втіленні мутеїн містить не більш, ніж 18 послідовних амінокислотних залишків, делетованих з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3.

У конкретному втіленні, даний винахід забезпечує істотно нетоксичний мутеїн, де дев'ять послідовних амінокислотних залишків делетовано з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3, один з яких являє собою His₆₈. У більш конкретному втіленні даного типу, делетовано дев'ять послідовних амінокислотних залишків у діапазоні від Trp₆₂ до Trp₇₀ SEQ ID NO: 3. У ще більш конкретному втіленні, ці дев'ять делетованих послідовних амінокислотних залишків заміщені одним лейциновим залишком в амінокислотній послідовності мутеїну.

Даний винахід додатково забезпечує атенуйовані організми *Clostridium perfringens*, що мають молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує істотно нетоксичний мутантний альфа-токсин *Clostridium perfringens*, інтегрований у хромосоми. Ця інтегрована молекула нуклеїнової кислоти, переважно, розташована у положенні на хромосомі, що є гомологічним положенню молекули нуклеїнової кислоти, що кодує альфа-токсин дикого типу у організмі *Clostridium perfringens* дикого типу. Таким чином, атенуйований організм *Clostridium perfringens* за даним винаходом може бути істотно нетоксичним через відсутність функціонального гену *plc* дикого типу. Як визначено у цій заявці, атенуйований *Clostridium perfringens* організм може бути *Clostridium perfringens* типу A.

У конкретному втіленні даного винаходу, атенуйований організм *Clostridium perfringens* являє собою *Clostridium perfringens* CPERF/Δα-токсин 365-054 (Депозитний номер ATCC PTA7364). В іншому конкретному втіленні даного винаходу, атенуйований *Clostridium perfringens* організм являє собою *Clostridium perfringens* CPERF/Δα-токсин 365-053 (Депозитний номер ATCC PTA7365).

Організм *Clostridium perfringens*, атенуйований способами за даним винаходом, може бути виділений з тварини-хазяїна, що є ссавцем чи птахом. Такі тварини можуть включати: корів, овець та свиней. Приклади придатних птахів включають курей, індиків, качок, голубів, гусей, диких голубів, лебедів, куріпок та шотландських куріпок.

Даний винахід також забезпечує вакцини. Такі вакцини можуть містити атенуйовані організми *Clostridium perfringens* за даним винаходом. Вакцини за даним винаходом можуть також включати фармакологічно придатні буфери, ексципієнти та/або ад'юванти.

Додатково, даний винахід забезпечує способи розвитку імунітету до *Clostridium perfringens* у тварини. Одне таке втілення включає введення імунологічно ефективної дози вакцини за даним винаходом тварині. Вакцини за даним винаходом можуть бути введені різними маршрутами, включаючи: пероральний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, інтрадермальний, підшкірний та інтраназальний. Вакцина за даним винаходом може бути додана у корм тварини та/або розпилена на

тварин для забезпечення перорального введення. Даний винахід додатково забезпечує корм для тварин, що містить вакцину за даним винаходом.

Даний винахід також забезпечує атенуйований організм *Clostridium perfringens* за даним винаходом, що додатково експресує, щонайменше, один ген, що кодує не-*Clostridium perfringens* поліпептид. В одному такому втіленні, один чи більше не-*Clostridium perfringens* поліпептидів є бактеріальними поліпептидами, такими, як антигенні протеїни *E. coli*, сальмонелла, lawsonia, або кампілобактер та інш., та/або їх комбінації. Альтернативно, або у комбінації із зазначеним вище, не-*Clostridium perfringens* поліпептид може бути небактеріальним поліпептидом. Приклади таких небактеріальних поліпептидів включають протеїни ссавців чи птахів, наприклад, цитокіни, такі, як IL-18 курей; такі віруси, як ротавірус чи коронавірус; та такі паразити, як еймерія, ізоспора, та криптоспоридії.

В іншому аспекті, даний винахід забезпечує антитіло, що селективно зв'язує епітоп, відсутній у істотно нетоксичному мутантному альфа-токсині *Clostridium perfringens*. Такі антитіла можуть розрізняти істотно нетоксичні мутанти від альфа-токсинів *Clostridium perfringens* дикого типу.

Також забезпечуються тестові набори, що включають антитіла за даним винаходом для використання при ідентифікації того, чи була вакцинована тварина-об'єкт, або альтернативно, була природно інфікована організмом *Clostridium perfringens*.

Відповідно, також забезпечуються способи ідентифікації та/або розпізнавання тварини, що була природно інфікована організмом *Clostridium perfringens* одного вакцинованого атенуйованим організмом *Clostridium perfringens*. В одному такому втіленні, спосіб включає контактування рідкої проби, взятої у тварини, з антитілом, що селективно зв'язує епітоп, знайдений у альфа-токсині *Clostridium perfringens* дикого типу, що був делетований з істотно нетоксичного мутанту альфа-токсину *Clostridium perfringens* за даним винаходом. Тому, антитіло може розрізняти тих тварин, що були вакциновані істотно нетоксичним мутантом альфа-токсину *Clostridium perfringens* за даним винаходом, (та/або атенуйованим організмом *Clostridium perfringens*, що експресує мутеїн) від інфікованих чи таких, що були інфіковані альфа-токсином *Clostridium perfringens* дикого типу. Наступною стадією є визначення того, чи реагує антитіло із пробкою рідини, наприклад, зв'язує антиген, що міститься у пробі. Тварину ідентифікують як таку, що є/була природно інфікована організмом *Clostridium perfringens*, коли антитіло реагує з пробкою рідини.

СТИСЛИЙ ОПИС ФІГУР

На Фіг. 1 проілюстровано геномне картування регіону, що кодує альфа-токсин *C. perfringens*. Показано положення двох великих (1182 основні пари та 1746 основні пари) фрагментів, відповідно, що використовували для конструювання CPERF001. Також показано положення утвореної делеції 27 основної пари. "Yplc" означає ген *ypIc* (CPE0035); "plc" означає ген, що кодує альфа-

токсин (фосфоліпазу C), а "CobW" означає нижній ген.

На Фіг. 2A проілюстровано послідовність частини гену *plc* від *C. perfringens* штаму CP6 [SEQ ID NO: 4; це частина SEQ ID NO: 22, (тобто, нуклеотиди 262-300) фрагменту *plc* гену від CP6] та відповідну пептидну послідовність (SEQ ID NO: 5), де підкреслено сайт рестрикції *Bam*H1 ендонуклеази, використаний для створення делеції.

На Фіг. 2B проілюстровано послідовність праймеру (SEQ ID NO: 6), використаного для створення делеції у батьківському *C. perfringens* штамі 1240, з утворенням делетного CPERF001. Підкреслено сайт рестрикції *Bam*H1, включений у праймер для сприяння конструюванню делеції. Також проілюстровано відповідний пептид (SEQ ID NO: 7).

На Фіг. 2C проілюстровано послідовність делеції, утвореної у CPERF001 (SEQ ID NO: 8; нуклеотиди 103-117) та у відповідному пептиді (SEQ ID NO: 9). Підкреслено збережений ендонуклеазний сайт рестрикції *Bam*H1.

Фіг. 3A знов проілюстровано послідовність частини гену *plc* від *C. perfringens* штаму CP6 [SEQ ID NO: 4, нуклеотиди 262-300] та відповідної пептидної послідовності (SEQ ID NO: 5), де підкреслено ендонуклеазний сайт рестрикції *Bam*H1, використаний для створення делеції.

На Фіг. 3B проілюстровано послідовність праймеру (SEQ ID NO:10), використаного для створення делеції у батьківському *C. perfringens* штамі 29, з утворенням делетного CPERF002. Також проілюстровано відповідний пептид (SEQ ID NO:11).

На Фіг. 3C проілюстровано послідовність делеції, утвореної у CPERF002 (SEQ ID NO: 12) та відповідного пептиду (SEQ ID NO: 13).

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Відповідно, даний винахід забезпечує модифіковані організми та культури *Clostridia*, що експресують один чи більше токсинів *Clostridia*, наприклад, альфа-токсини, як мутеїни, що не мають детектовної токсичності, та/або істотно низьку токсичність, по відношенню до природних токсинів та токсинів *Clostridia* дикого типу. Переважно, мутантні організми *C. perfringens* за даним винаходом легко вводять тваринам як живі вакцини, також забезпечуються мутантні альфа-токсини *C. perfringens*. Також у даному винаході забезпечуються, разом із молекулами нуклеїнових кислот, що кодують мутеїни, вектори експресії альфа-токсинів, та способи їх використання.

Для забезпечення зрозумілого опису винаходу, декілька термінів визначено наступним чином. Вакцина являє собою композицію, що включає імуноген, та інші фармацевтично прийнятні інгредієнти, включаючи, у деяких втіленнях, придатні ад'юванти. Як вживається у цій заявці, термін "імуноген" описує композицію, речовину чи вектор, що при введенні у тварину стимулює імунний відклик. Для цілей даного винаходу, імуноген вважають таким, що включає будь-який вектор, здатний до експресії чи введення мутанту альфа-токсину за даним винаходом у тварину, що має бути імунована. Вектор включає, наприклад, *C. perfringens* за

даним винаходом чи інші придатні мікроорганізми, що експресують мутантний альфа-токсин за даним винаходом при введенні вектора у тварину. Вектор також включає відомі з рівня техніки молекули нуклеїнової кислоти, наприклад, плазмід та інш., що експресують мутантний альфа-токсин за даним винаходом при безпосередньому введенні у тварину, наприклад, шляхом введення клітини тварини та експресії мутантного альфа-токсину тварині. Імуноген є також протеїном, таким, як альфа-токсин за даним винаходом, зацінений окремо або як частина придатної вакцинної композиції.

Як вживається у цій заявці, та якщо не вказано інше, терміни "імунізувати" та "вакцинувати" є синонімами та їх використовують взаємозамінно для опису введення імуногену у тварину для виклику імунної відповіді у тварини. Викликаний імунний відклик забезпечує захисний імунітет тварині, яку лікують, що обмежує чи зменшує клінічні ознаки хвороби, наприклад, газової гангрен, та/або смертності, у вакцинованих тварин, що пізніше вводять з вірулентною дозою видів *C. perfringens*, для яких вакцина за даним винаходом є захисною.

Термін "ад'ювант" визначають як одну чи більше речовин, що викликають стимуляцію імунної системи. У цьому контексті, ад'ювант використовують для підвищення імунного відклику на одну чи більше антигенів/ізолятів вакцини. Ад'ювант може бути введений тварині-мішені перед, у комбінації з, або після введення вакцини. Ад'юванти за даним винаходом можна одержати з будь-яких джерел, включаючи природні джерела, рекомбінантні джерела та/або хімічний синтез та інш. Приклади хімічних сполук, використаних як ад'юванти включають, але не обмежуються наведеним, сполуки алюмінію; олії, здатні та не здатні до метаболізму; блок-кополімери; ISCOM (імуностимулюючі комплекси); вітаміни та мінерали (включаючи, але не обмежуючись наведеним: вітамін Е, вітамін А, селен та вітамін В12); Quil A (сапоніни); перехресно-зшиті акрилові кислотні полімери (наприклад, полімери проп-2-енової кислоти) перехресно-зшиті на різних рівнях з поліалкенільним поліефром, що продають під торгівельною маркою CARBOPOL®; та/або однорідно розпилені мікронні краплі емульсії олії у воді, наприклад, що продають під торгівельною маркою Emulsigen®.

Додаткові приклади ад'ювантів, що іноді мають назву імуностимуляторів, включають бактеріальні та грибові компоненти клітинних стінок (наприклад, ліпополісахариди, ліпопротеїни, глікопротеїни, мурамілпептиди, бета-1,3/1,6-глюкани), різні комплексні вуглеводні, одержані з рослин (наприклад, глікани, ацетаннан), різні протеїни та пептиди, одержані з тварин (наприклад, гормони, цитокіни, костимулюючі фактори), та нові нуклеїнові кислоти, одержані з вірусів та інших джерел (наприклад, подвійно-ланцюгового РНК, CpG). Додатково, ефект ад'ювантів може забезпечити будь-яка кількість комбінацій вищевказаних речовин, і тому може утворити ад'ювант за даним винаходом.

Термін "антитіло", як вживається у цій заявці, призначено для охоплення поліклональних антитіл, моноклональних антитіл та/або їх фрагментів чи рекомбінантних похідних, включаючи сконстру-

йовані зв'язуючі протеїни, що включають варіабельні домени антитіл.

Як вживається у цій заявці, нумерація залишків та положення амінокислотних залишків протеїнів альфа-токсину за даним винаходом засновано на системі нумерації, описаній для *Clostridium perfringens* штаму 13. Штам 13 альфа-токсину *C. perfringens* повідомлений під номером доступу GenBank № NC 003366, та проілюстрований SEQ ID NO: 1. Весь протеїн має довжину у 398 амінокислот. Альфа-токсин, кодований мутантними векторами, показаними у цій заявці нижче, відповідає протеїну SEQ ID NO: 1, що має делецію амінокислотних залишків 90-98. Це 28 амінокислотна сигнальна послідовність, розщеплена протягом дозрівання протеїну. Тому ілюстративна делеція відповідає амінокислотним залишкам 62-70 зрілого протеїна, довжиною у 370 амінокислот (SEQ ID NO: 3).

Нумерація кодонів ДНК, що кодує протеїни альфа-токсину за даним винаходом, заснована на штамі 13 гену *plc* *Clostridium perfringens*, що повідомлений під номером доступу GenBank № NP 560952, та проілюстрований SEQ ID NO: 2. Кодуюча послідовність альфа-токсину розпочинається від нуклеотиду 48590 до 49786 у *C. perfringens* штамі 13. Делеція кодонів у двох конструктах, проілюстрованих у цій заявці, відповідає нулеотидам 48857 до (та включаючи 48883 NP 560952 ген. Ця делеція знайдена у гені альфа-токсину та відповідає нуклеотидам 268-294 у кодуючій послідовності SEQ ID NO: 2.

Додатково, використання термінів в однині для зручності в описі жодним чином не призначено для такого обмеження. Тому, наприклад, посилання на композицію, що містить *C. perfringens* клітину, включає посилання на одну чи більше таких клітин. Також має бути зрозумілим, що даний винахід не обмежений конкретними конфігураціями, стадіями процесу та матеріалами, описаними у цій заявці, оскільки такі конфігурації, стадії процесу та матеріали можуть дещо варіюватися. Також має бути зрозумілим, що термінологія, що вживається у цій заявці, використана лише для опису конкретних втілень та не призначена для обмеження, оскільки обсяг даного винаходу буде обмежений лише формулою, що додається, та її еквівалентами.

У конкретному втіленні даного винаходу, забезпечуються незворотні мутанти *C. perfringens*, що є "істотно нетоксичними," тобто, організмами, що обмежено експресують імуногенні альфа-токсини, та нетоксичні, що надає їм, таким чином, придатності для використання як захисних вакцин. Тому організми *C. perfringens* за даним винаходом мають достатньо знижену токсичність, відносно організмів *C. perfringens* дикого типу, що надає їм переносності як вакцини чи антигену при застосуванні за умов, ефективних для виклику антиальфа-токсинного чи анти-*C-perfringens* імуного відклику у всіх тварин, вакцинованих таким чином. Тому, організм *C. perfringens* за даним винаходом є "атенуйованим" відносно *C. perfringens* дикого типу.

Фраза "істотно нетоксичний" також призначена для застосування до вищезазначених імуногенних

і мутантів альфа-токсинів, що мають достатньо низьку або відсутню токсичність, що також робить їх придатними для використання як захисні вакцини.

Зниження токсичності вимірюють, наприклад, за допомогою одного з наступних тестів, відомих з рівня техніки: гемолітичної активності, фосфоліпазної С активності, сфінгомеліназної активності, фосфодіестеразної активності, та загальної летальної активності у тестовій групі тварин. Загалом, за такими стандартними тестами не було знайдено достатньої токсичності. Тим не менш, наявність мінімального рівня однієї чи більше таких активностей, наприклад, від, приблизно, 10^{-4} , до, приблизно, 10^{-2} , відносно токсичності еквівалентної кількості інфекційних одиниць альфа-токсину *C. perfringens* дикого типу, з якого було одержано мутант, як доведено, може бути прийнятною для застосування у ветеринарії.

В одному втіленні, винахід реалізують на практиці шляхом застосування штамів біотипу А *C. perfringens*, що є особливо важливими як етіологічні агенти різних типів гангрен та кишкових хвороб. Зокрема, альфа-токсин *C. perfringens* є мішенню делеції-атенуації, оскільки атенуація цього токсину є достатньою для того, щоб вважати *C. perfringens* у достатньому ступені не-летальним, порівняно із штамми дикого типу.

Загалом, *C. perfringens plc* ген за даним винаходом експресує мутантний альфа-токсин. Мутантний альфа-токсин має делецію, що включає His_{Zn2} петлі, разом із бічними залишками, для більшого зниження можливості будь-якої зворотної мутації у токсичну форму. Було знайдено, що делеція Zn₂ петлі His залишка, наприклад, His₆₈ SEQ ID NO: 3, разом із делецією додаткових залишків, що оточують залишок His петлі Zn₂, забезпечує альфа-токсин, що зберігає достатню імуногенність для виклику захисного імунітету у тварин, вакцинованих *C. perfringens* за даним винаходом, та також, ймовірність проходження зворотної мутації для кодування альфа-токсину дикого типу, є низькою. Додаткові залишки можуть бути делетовані у С-кінцевому напрямі та/або у N-кінцевому напрямі, по відношенню до His₆₈, та можуть знаходитися у діапазоні від, приблизно, 4 до, приблизно, 60 залишків у будь-якому такому напрямку. Альтернативно, His₁₄₈ та бічні залишки можуть бути делетовані аналогічно.

Одне з втілень даного винаходу також включає мутантний альфа-токсин, додатково до делеції His₆₈, делеції, щонайменше, 30 амінокислотних залишків з будь-якого боку (у С-кінцевому чи N-кінцевому напрямку) His₆₈ положення, відносно SEQ ID NO: 3. В іншому втіленні даного винаходу мутантний альфа-токсин включає, додатково до делеції of His₆₈, делецію, щонайменше, 20 амінокислотних залишків з будь-якого боку His₆₈, відносно SEQ ID NO: 3. В ще одному альтернативному втіленні даного винаходу мутантний альфа-токсин включає, додатково до делеції His₆₈, делецію, щонайменше, 5 амінокислотних залишків з будь-якого боку His₆₈, відносно SEQ ID NO: 3. В ще одному втіленні даного винаходу мутантний альфа-токсин включає делецію від, приблизно, залишку 62 до,

приблизно, залишку 70, відносно SEQ ID NO: 3. Необов'язково, делетовані амінокислотні залишки заміщені одним чи більше іншими залишками, такими, як одинарний лейциновий залишок.

У ще одному додатковому втіленні, мутантний альфа-токсин *C. perfringens*, продукований та виділений з *C. perfringens*, або альтернативного рекомбінантного організму, для застосування як реагент для дослідження та/або у діагностичному наборі чи аналізах, наприклад, як мішень для анти-альфа-токсинових антитіл. Ще одним використанням мутантних альфа-токсин *C. perfringens*ових протеїнів є спеціалізовані вакцини для тварин, наприклад, людей, що не можуть переносити вакцинацію атенуйованим *C. perfringens* організмом за даним винаходом.

Додатково, даний винахід забезпечує антитіло, що специфічно зв'язує альфа-токсин дикого типу відносно мутантних альфа-токсинів за даним винаходом.

У додатковому втіленні, забезпечується антитіло, що переважно зв'язує альфа-токсин *C. perfringens*овий протеїн дикого типу, проявляючи мінімальне чи відсутність зв'язування із мутантним альфа-токсином за даним винаходом, наприклад, уникаючи зв'язування мутантну альфа-токсину, що має делецію, що детально описана, *supra*. Забезпечується антитіло, що, через це, є корисним для розпізнавання делеції мутанту альфа-токсину від альфа-токсину дикого типу, та тому, також, корисним для розпізнавання тварин, вакцинованих вакциною за даним винаходом, одержаною від тварин, що були інфіковані *C. perfringens* дикого типу. Способи виклику та скринінгу таких селективних антитіл відомі з рівня техніки. Аналогічно, також одержують антитіла за даним винаходом, що розпізнають мутантний альфа-токсин за даним винаходом, але не протеїн дикого типу. Антитіла за даним винаходом можуть бути поліклональними, моноклональними ("mAb") чи фрагментами чи сконструйованими фрагментами чи похідними таких антитіл, що зберігають селективні зв'язуючі властивості.

Методи одержання та скринінгу моноклональних антитіл були детально описані [див., наприклад, Stites, et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, California (1988); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.), Academic Press, New York (1986); та Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975), усі з яких включені до цієї заявки шляхом посилання].

Наприклад, та без обмежень, імунний відклик викликають у придатних тварин, таких, як миші чи кури, шляхом вакцинації очищеним *C. perfringens* альфа-протеїном дикого типу, наприклад, у комбінації з придатним ад'ювантом. Наприклад, для уникнення токсичності альфа протеїну дикого типу, імуноген є пептидом, що відповідає делетованим залишкам, та, якщо потрібно, імуногенність пептиду підвищують шляхом комбінування із придатним ад'ювантом або шляхом сполучення із придатним протеїном-носієм. Сполучення із при-

датним протеїном-носієм відомо з рівня техніки, та може бути здійснено, наприклад, шляхом забезпечення пептиду з термінальним цистеїном, та його сполучення із гемоціанін фісурелла (KLH) чи альбуміну бичачої сироватки (BSA) з використанням хімії малеїмідного сполучення чи сульфосукциніміділ-4-[N-малеїмідометил]циклогексан-1-карбоксилатного) лінкера (від Pierce). Також може бути використаний карбодіімідний лінкер, що не потребує термінального цистеїну.

Для одержання моноклональних антитіл, лімфоцити селезінки можуть бути одержані з імунізованої тварини, гібридами одержують з цих лімфоцитів, та може бути одержаний один чи більше потенційно придатних гібридом, що експресують анти-альфа протеїн. Гібридами піддають скринінгу щодо мутованих та дикого типу альфа-протеїнів, а гібридом, що експресує антитіло, що зв'язує лише альфа-токсин дикого типу, ідентифікують, клонують та застосовують для продукування моноклональних антитіл, що зв'язують лише альфа протеїн дикого типу. Необов'язково, одержують кДНК ідентифікованої гібридної клітинної лінії, а рекомбінантні антитіла чи фрагменти антитіл можуть бути одержані в інших системах експресії, відомих з рівня техніки.

Як обговорено вище, одним з можливих недоліків вакцинації, взагалі, є те, що тварини після вакцинації можуть давати фальшивий позитивний результат при проведенні тестів на інфекцію з використанням антитіл, що виникають у штамі, що зустрічається у природі, таким чином, перешкоджаючи ідентифікації інфікованої тварини. Тому даний винахід забезпечує тестовий набір для розрізнення об'єктної тварини, що була природним організмом *C. perfringens*, від тварини, вакцинованої мутантним альфа-токсином за даним винаходом.

Один такий тестовий набір включає ряд селективних анти-дикого-типу альфа-токсинових антитіл, що проявляє мінімальне чи відсутнє зв'язування із мутантним альфа-токсином за даним винаходом. Набір також включає інші придатні реагенти, достатні для проведення, щонайменше, одного діагностичного тесту. У додатковому втіленні, антитіло мічене легко детективною групою, наприклад, будь-яким відомим з рівня техніки ферментним маркером, наприклад, пероксидазою; флуоресцентною міткою, наприклад, флуоресцеїном; носіями, включаючи магнітні носії; та інш.. Необов'язково, набір може додатково включати мічене антитіло, що селективно зв'язує селективне анти-дикого типу альфа-токсину антитіло. Імуноферментні добре відомі у цій галузі, та включають імуноферментний сендвічевий аналіз, конкурентні імуноферментні аналізи, твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), радіоактивні імуноферментні аналізи (RIA) та інші.

Також забезпечуються способи ідентифікації та розрізнення тварини, що була інфікована природним організмом *C. perfringens*, тобто, дикого типу, від тварини, вакцинованої вакциною, що містить атенуйований *C. perfringens* організм за даним винаходом, що здійснюють, наприклад, у наступні стадії:

(а) контактування проби рідини, взятої у тварини, з вищеописаним селективним анти-дикого типу альфа-токсиним антитілом, що проявляє мінімальне чи відсутнє зв'язування із мутантним альфа-токсином за даним винаходом; та

(b) визначення того, чи реагує антитіло з пробою рідини;

де, коли антитіло реагує з пробой рідини, тварину ідентифікують як таку, що була інфікована природним організмом *C. perfringens* організм.

[Продуктування атенуйованих штамів *C. Perfringens*

Процес перетворення ізоляту *C. perfringens* дикого типу на атенуйований, чи істотно нетоксичний, штам, придатний для введення як вакцина, може бути проведений таким чином. Ген альфа-токсину (plc) може бути заміщений у бактеріальній хромосомі на ген, що кодує лише мутант альфа-токсину, без збереження здатності *C. perfringens* організму продукувати альфа-токсин дикого типу. Дуже широко, процес продуктування вакцини організму включає, не обмежуючись наведеним, наступні загальні стадії, не обов'язково у вказаному порядку.

(1) ідентифікація виду тварини, що має бути захищена шляхом вакцинації, та одного чи більше клінічних ізолятів, одержаних для процедур скринінгу. Ця стадія є, типово, необов'язковою, у випадку альфа-токсину, оскільки ізоляти одного виду тварин, більш ймовірно, забезпечують захист іншому виду тварин.

(2) ампліфікація гену plc з ізоляту чи ізолятів *C. perfringens*, наприклад, за допомогою ПЦР чи іншої відомої у цій галузі технології ампліфікації нуклеїнових кислот, з придатними фланкуючими праймерами, та застосування ампліфікації придатними праймерами для створення бажаної мутації делеції/ Альтернативно, може бути вивчена відповідна бібліотека.

(3) створення суїцидного вектора, що містить ген делеції plc, в якому джерело реплікації *C. perfringens* видалено, та/або джерело реплікації, що може реплікувати *C. perfringens* просто відсутнє; та в іншому випадку, включає придатні селективні маркери, наприклад, антибіотичні маркери, прилеглі до мутантного гену plc. Такий вектор може бути потім введений у *C. perfringens* організми, наприклад, шляхом електропорації, чи іншими способами, відомими з рівня техніки.

(4) відбір *C. perfringens* організмів, в яких мутантний ген plc був успішно інтегрований у бактеріальний хромосом. Це здійснюють шляхом культивування *C. perfringens* організмів стадії (3) у присутності селективного агента, наприклад, антибіотика(ів), що відповідають селективним маркерам. Наприклад, єдині *C. perfringens* організми, що можуть зростати під селекцією антибіотиків, можуть бути організмами, що шляхом гомологічної рекомбінації можуть бути безпосередньо інтегровані у суїцидний вектор, з його геном(ми) резистентності до антибіотиків, у бактеріальну хромосому. Ці зростаючі *C. perfringens* організми тому матимуть два прилеглі гени plc, один дикого типу, тоді як інший може мати мутацію делеції.

(5) відбір *C. perfringens* організмів, в яких відбулася додаткова рекомбінація, з видаленням селективних маркерів, наприклад, антибіотичних маркерів, разом із геном plc дикого типу. Це здійснюють шляхом культивування організмів (4) у відсутність селективного агента, наприклад, антибіотика, та відбору не-гемолітичних клонів на агару крові.

Оскільки інсерцію мутантної нуклеїнової кислоти здійснюють шляхом гомологічної рекомбінації, молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує мутантний альфа-токсин, вводять у хромосомне положення, що гомологічне положенню молекули нуклеїнової кислоти, що кодує альфа-токсин дикого типу, присутній у неатенуйованому *Clostridium perfringens*.

Більш детально, польові ізоляти *C. perfringens* одержують від хворих тварин чи інших джерел. Спочатку, геномні ДНК, що одержують з польових ізолятів, що розглядають, водять у придатний дуальний шаттл-вектор мікроорганізму, наприклад, шаттл-плазмід, із селективними маркерами, наприклад, антибіотичними маркерами, для оцінки здатності до трансформації. Загалом, приданий шаттл-вектор включатиме одну, дві, три чи більше наступних ознак, сайт клонування, джерело реплікації *C. perfringens*, джерело реплікації *E. coli*, та ген резистентності до антибіотиків та/або селективний маркер. Вектори, відомі з рівня техніки, придатні для цього, чи легко адаптовні для цього, включають, наприклад, рекомбінантний шаттл-плазмід pHR106, описаний Roberts et al., [Appl Environ Microbiol 54: 268-270 (1988)]; pJIR 750 та pJIR 751 плазмід, описані Bannam, et al., [Plasmid 29:233-235 (1993)]; pPSV промоторний вектор селекції без промотору Matsushita, et al., 1994, Plasmid 31, 317-319; шаттл-плазмід pJIR1456 і pJIR1457, описані Lyras, et al., 1988, Plasmid 39, 160-164; та pAK201 шаттл-вектор, описаний Kim et al., 1989, Appl Environ Microbiol 55, 360-365, вміст яких повністю включений до цієї заявки шляхом посилання. Видалення джерела реплікації *C. perfringens* перетворює шаттл-вектор на суїцидний вектор.

Наприклад, одним з шаттл-плазмідів є pJIR418, описаний Sloan, et al., 1992, Plasmid 27, 207-219, включений до цієї заявки шляхом посилання.

Ізоляти, що призводять до утворення $\geq 10^4$ трансформантів на мікрограм плазмідного ДНК, чутливі до антибіотичного маркеру, наприклад, хлорамфенікол чи еритроміцин, є можливими кандидатами для делеції. Геномні ДНК кандидатних штамів потім використовують як темплату для довгого ПЦР гену plc (альфа-токсину) та фланкуючих послідовностей кандидатних штамів. Наприклад, як проілюстровано у цій заявці нижче, штам *C. perfringens* 13 хромосоми використовували для ідентифікації праймерів для ампліфікації гену, що кодує альфа-токсин. Ці праймери потім використовували для клонування гену альфа-токсину з іншого штам, що був пташиним ізолятом CP6.

Після субклонування продуктів ПЦР, ген альфа-токсину та фланкуючі регіони секвентують та рестрикційно картують. З фланкуючих сайтів рестрикції синтезують нові олігонуклеотидні праймери,

а продукти двох окремих ампліфікацій клонують у придатний суїцидний плазмід (джерело реплікації *C. perfringens* видалено), наприклад, показаний нижче у цій заявці як плазмід 1192-23.1 для створення бажаного штаму вакцини з делецією.

Забезпечений суїцидний вектор(и), специфічні до ізоляту(ів) вводять у відповідний тваринний штам *C. perfringens*, за допомогою будь-якого стандартного способу, відомого з рівня техніки. Наприклад, це здійснюють шляхом електропорації. Коли суїцидний вектор вводять у *C. perfringens* (без джерела реплікації *C. perfringens*, відсутня можливість реплікувати у цитоплазму, та не виживає, якщо не інтегрується у бактеріальний хромосом.) Успішні інтегранти являють собою лише такі організми, що зростатимуть у присутності антибіотика, що відповідає заново введеному антибіотичному маркерному гену.

Може бути застосований будь-який відомий з рівня техніки селективний маркерний ген, хоча у векторах, наведених у цій заявці нижче, використані маркери хорамфеніколу та/або еритроміцину.

Ці рекомбінантні явища призводять з гомології гену *plc* дикого типу до делеції генного *plc* плазмиду ДНК. Результуючі рекомбінантні бактерії мають інтегрантів. Інтегрант містить копію введеного вектору гомології, інтегрованого у локус гена *plc*. Тому утворений у результаті інтегрант включає дві копії гену *plc*, оригінальну нормальну копію та введenu делетовану версію. Введені гени резистентності до антибіотиків розташовані між двома копіями гену *plc*. Можуть відбуватися рідкі випадкові рекомбінації між двома копіями гену *plc*. Така рекомбінація може призвести до одного з двох результатів. В обох випадках, ДНК, що розташовано між двома копіями гену *plc* (включаючи гени резистентності), видалено. У першому випадку, зберігається нормальний чи дикого типу ген *plc*, що призводить до відновлення оригінального батьківського штаму без антибіотичних маркерів. У другому випадку, ген *plc* дикого типу заміщують делетованою копією, з утворенням бажаного делетантного конструкту альфа-токсину, без антибіотичних маркерів.

Видалення антибіотиків з культурального середовища дозволяє цим бактеріям, в яких відбулася рекомбінація, виживати та реплікувати. Рекомбінантні клони делеції потім ідентифікують за зростанням на кров'яному агарі, без гемолізу, що

нормально проявляє *C. Perfringens*, що експресує альфа-токсин дикого типу.

Тварини, що мають одержати вакцинацію

Тварини, для яких може бути продукована атенуйована вакцина *C. perfringens*, та з яких може бути ізольований корисний штам *C. perfringens* дикого типу, включають, загалом, будь-яких тварин, для яких інфекція *C. perfringens* є проблемою. Хребетні, що розглядаються, включають птахів, ссавців, та риб, та особливо тварин, важливих з економічної та/або сільськогосподарської точки зору. У наступному списку тварин наведено ті з них, що мають переваги від вакцинації *C. perfringens* та/або для яких можуть бути одержані корисні ізоляти *C. perfringens* дикого типу. Іноді можливо, щоб будь-яка така вакцина містила компонент (живий чи неживий), що був спочатку виділений з того ж самого роду чи виду тварини, що має бути вакцинована, але це не обов'язково.

Необмежуючий список таких тварин включає такі сімейства птахів, корів, овець та інш., а також водних тварин, наприклад, що можуть бути піддані аквакультивуванню та/або зібрані з диких тварин та зберігатися живими у резервуарах для зберігання до збути на ринку. Вони включають таких риб, як форель чи лосось, та інші види, що розводять чи збирають для одержання економічної вигоди. Безхребетні водні тварини включають лобстерів, крабів, молюсків, наприклад, кальмара, восьминога, молюска, устрицю, гребінця, та інш. Птахи мають бути розглянуті як такі, що включають, наприклад, курей, індиків, гусей, качок, та інш. Корови мають бути розглянуті як такі, що включають, наприклад, корів, биків, телят, та інш. Вівці мають бути розглянуті як такі, що включають, наприклад, ягнят, та інш.

Для цілей даного винаходу, термін "риба" має тлумачитися як такий, що включає, без обмежень, групу риб Teleostei, тобто, телеостів. Як отряд Salmoniformes (що включає лососеві сімейства), так і отряд Perciformes (що включає Центрархові сімейства) включені до групи Teleostei.

Приклади можливих риб-реципієнтів включають лососеві сімейства, серранові сімейства, сімейства Sparidae, сімейства Цихліди, сімейства Центрархові, простіпому (Parapristipoma trilineatum), та плеостомус блакитноокий (Plecostomus spp).

Сімейство Лососеві

НАЗВА ТАКСОНУ	ЗАГАЛЬНА НАЗВА
<i>Coregonus clupeaformis</i>	Оселедцеподібний сиг
<i>Coregonus hoyi</i>	Оселедець
<i>Oncorhynchus keta</i>	Кета
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Горбуша
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Кижуч
	(сріблястий лосось)
<i>Oncorhynchus masou</i>	Сима (сима-мазу)
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Нерка
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	(чавича)
<i>Prosopium cylindraceum</i>	Валек
<i>Oncorhynchus clarki</i>	Лосось Кларка
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Райдужна форель
<i>Salmo salar</i>	Атлантичний лосось

Salmo trutta	Озерна форель
Salmo trutta X S. fontinalis	Морська форель
Salvelinus alpinus	Арктичний голец
Salvelinus confluentus	Великоголовий голец
Salvelinus fontinalis	Американська палія
Salvelinus leucomaenis	Кунджа
Salvelinus malma	Мальма (тихоокеанський голец)
Salvelinus namaycush	Озерний голец-крістівомер
Thymallus thymallus	Хариус

Деякі члени сімейства Серранові

НАЗВА ТАКСОНУ	ЗАГАЛЬНА НАЗВА
Centropomus undulatus	Береговий сібас
Centropomus philadelphicus	Кам'яний сібас
Centropomus striata	Чорний сібас
Diplodus biocellatus	Карликовий піщаний окунь
Diplodus labrax	Піщаний окунь
Epinephelus flavolimbatus	Жовтокаймлений кам'яний окунь
Epinephelus morio	Червоний групер
Serranus phoebe	Пліткар
Serranus tortugarum	Кам'яний карликовий окунь

Деякі члени сімейства Sparidae

НАЗВА ТАКСОНУ	ЗАГАЛЬНА НАЗВА
Archosargus probatocephalus	Кейпкодський карась
Archosargus rhomboidalis	Морський лящ
Calamus penna	Центральноамериканський карась
Lagodon rhomboides	Кагалона
Pagrus Major	Червоний тай
Sparus aurata	Морський карась
Stenotomus chrysops	Скап

Деякі члени сімейства Цихліди

НАЗВА ТАКСОНУ	ЗАГАЛЬНА НАЗВА
Aequidens latifrons	Вродливий пельматохроміс
Cichlasoma nigrofasciatum	Конго цихліда
Crenichthys sp.	Щука цихліда
Pterophyllum scalare	Риба янгол
Tilapia mossambica	Мозамбікська риба, що виношує молодь у роті
Oreochromis spp	Тилapia
Sarotherodon aurea	Золотиста тилapia

Деякі члени сімейства Центархові

НАЗВА ТАКСОНУ	ЗАГАЛЬНА НАЗВА
Ambloplites rupestris	Кам'яний окунь
Centrarchus macropterus	Вухастий окунь
Elassoma evergladei	Болотиста карликова сонячна риба
Bassoma okefenokee	Карликова сонячна риба окефенокі
Elassoma zonatum	Смугаста карликова сонячна риба
Enneacanthus gloriosus	Блакитна плямиста сонячна риба
Enneacanthus obesus	Смугаста сонячна риба
Lepomis auritus	Малинова сонячна риба
Lepomis cyanellus	Зелена сонячна риба
Lepomis cyanellus X L. gibbosus	Зелена х звичайна сонячна риба
Lepomis gibbosus	Звичайна сонячна риба
Lepomis gulosus	Сонячний окунь
Lepomis humilis	Жовтогарячо-плямиста сонячна риба
Lepomis macrochirus	Блакитнозяброва сонячна риба

<i>Lepomis megalotis</i>	Рожева сонячна риба
<i>Micropterus coosae</i>	Мілководний окунь
<i>Micropterus dolomieu</i>	Малоротий окунь
<i>Micropterus punctulatus</i>	Плямистий окунь
<i>Micropterus salmoides</i>	Великоротий чорний окунь
<i>Pomoxis annularis</i>	Білий краппі
<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	Чорний краппі

У додатковому втіленні, тварина є супроводжуючою твариною або людиною. Для цілей даного винаходу, термін "супроводжуючий" має бути розглянутий як такий, що включає усіх тварин - коней (кінські), котів (кошачі), собак (собачі), та гризунів, включаючи мишей, щурів, морських свинок, види кроликів, та птахів, таких, як голуби, папури, та інш..

Птахи, що одержують таку вакцинацію, можуть бути пов'язані з комерційним чи некомерційним птаховодством. Це включає, наприклад, Anatidae, таких, як лебеді, гусаки та качки, Columbidae, наприклад, дикі голуби та голуби, такі, як домашні голуби, Phasianidae, наприклад, куріпки, шотландські куріпки та індки, Thesienidae, наприклад, домашні кури, Psittacines, наприклад, довгохвості папури, ари, та папури, наприклад, розведені для ринку домашніх тварин та колекторного ринку. Курей наведено у цій заявці нижче.

Джерела ізолятів дикого типу

Загалом, атенуйовані *C. perfringens* організми за даним винаходом зможуть бути одержані з *C. perfringens* дикого типу, що спочатку були виділені з будь-якої інфікованої тварини, що розглядається, та обговорені supra, та/або з оточуючого середовища. Оточуюче середовище включає будь-який матеріал, що містить життєздатні організми *C. perfringens* та/або життєздатні спори *C. perfringens* включаючи, наприклад, забруднений корм, ґрунт, воду, матеріал для підстилки худоби, екскременти, та інш..

Justin et al., [Biochemistry 41, 6253-6262 (2002)] характеризували альфа-токсини різних штамів *C. perfringens*, послідовності та біохімічні властивості яких майже ідентичні. Проте, Justin et al., також описують штам, що був ізольований з пташиного джерела (лебідь), що має альфа-токсин, який сильний ступінь варіації послідовностей та змінено субстратну специфічність, порівняно із іншими штамми. З цієї причини, вважається, що більшість ізолятів, при перетворенні у атенуйовану форму, викликать захисний імунітет проти альфа-токсину багатьох природних штамів *C. perfringens*. Тим не менш, маючи можливість варіації альфа-токсинів в ізолятах, це часто є корисним для виділення та ослаблення *C. perfringens* організмів видів тварин, для яких вакцинація анти-*C. perfringens* є бажаною. Ізолят, проілюстрований у цій заявці нижче, був виділений з курей та протестований у цих видах.

Вакцини

Атенуйовані *C. perfringens* організми за даним винаходом, загалом, складають у фармацевтично придатні вакцинні композиції. Вакцинні композиції складають відповідно до маршруту введення, та вони сумісні з активним антигенним

агентом. Активним антигенним агентом є, наприклад, один чи більше штамів атенуйованих організмів *C. perfringens* типу А за даним винаходом. Необов'язково, вакцинна композиція може також містити один чи більше типів нетоксичного альфа-протеїну, у комбінації з атенуйованими організмами *C. perfringens* типу А.

Наприклад, істотно усі атенуйовані організми *C. perfringens* типу А, включені у вакцинну композицію, є живими та життєздатними, хоча для деяких конкретних ситуацій, наприклад, для імунізації деяких людей чи тварин з ослабленим імунітетом, вакцина буде містити виключно вбиті атенуйовані організми *C. perfringens* типу А.

Вакцинна композиція містить фізіологічно сумісні буфери та/або солі, у довільній комбінації з ад'ювантами та/або необов'язковими підсилювачами чи стимуляторами імунітету (введеними одночасно чи послідовно, наприклад, до чи після вакцинації).

Придатні імуностимулятори включають, але не обмежуються наведеним, цитокіни, фактори росту, хемокіни, супернатанти клітинних культур лімфоцитів, моноцитів, клітини лімфоїдних органів, клітинні препарати чи клітинні екстракти (наприклад, *Staphylococcus aureus* чи ліпополісахаридні препарати), мітогени, чи ад'юванти, включаючи низькомолекулярні ліки. Імуностимулятори можуть бути введені in ovo у будь-який час протягом інкубації. У конкретному аспекті, імуностимулятор вводять у середовище, що містить атенуйовані організми *C. perfringens* типу А.

Способи введення вакцин

Вищеописані вакцини за даним винаходом вводять, наприклад, шляхом ін'єкції чи інокуляції одним чи комбінацією маршрутів: пероральним, інтраназальним, парентеральним, підшкірним, зчарапуванням, та/або внутрішньом'язовим введенням у будь-якій придатній, відомій з рівня техніки композиції, наприклад, сумісному буфері та/або фізіологічно придатному сольовому розчині, у довільній комбінації з ад'ювантами та/або підсилювачами чи стимуляторами імунітету (одночасним або послідовним введенням, наприклад, до чи після вакцинації). Для способів перорального введення вакцин/вакцинування, легко застосовують будь-які фізіологічно придатні буфери чи суспендуючі агенти, відомі з рівня техніки. Додатково, композиція може бути включена, наприклад, домішана у питну воду чи розпилена на кормові таблетки, розпилена на кукурудзяні чи інші зерна, та інш..

Шлунково-кишковий тракт є розповсюдженим місцем інфікування *C. perfringens*, тому пероральне введення охоплене як один зі способів інокуляції. Присутність у шлунково-кишковому тракті живих атенуйованих організмів *C. perfringens* за

даним винаходом розглядають як таку, що викликає локальні захисні імунні реакції у слизовому шарі шлунково-кишкового тракту, та може також діяти конкурентно для попередження наступної колонізації *C. perfringens* дикого типу.

Для птахів, таких, як домашні птахи, включаючи курей, качок, гусей та інш., серед корисних маршрутів вакцинації наявні пероральний спосіб, чи ін'єкція *in ovo*. Маршрут *in ovo* проілюстрований у цій заявці нижче, та він призводить до активної імунізації та захисту від інфікування кур-несучок.

Експресія чужорідних генів *C. Perfringens*

За допомогою методів, розвинених у наведених вище Прикладах, будь-який ген, що не зустрічається у природі, тобто, чужорідний до *C. Perfringens* необов'язково може бути введений у хромосомальні ДНК *C. perfringens*. Для експресії чужорідних протеїнів, може бути здійснене генне злиття, що зберігає фланкуючі послідовності гену альфа-токсину, - промотору альфа-токсину та його сигнальну послідовність. В одному втіленні, більшість кодуєчих послідовностей гену *plc* заміщена чужорідним геном. Нуклеотиди, що залишилися, гену *plc* під введеним геном, не включені до каркасу, тому функціональний альфа-токсин не продукується. Альтернативно, чужорідний ген може бути введений у каркас нуклеотидної послідовності, що кодує мутант альфа-токсину, що утворює протеїн злиття альфа-токсин - чужорідний протеїн.

Олігонуклеотидні праймери для чужорідного гену можуть бути синтезовані, наприклад, з N-кінцевою FLAG міченою послідовністю та відповідними сайтами рестрикції. Продукти ПЦР можуть бути клоновані у суїцидний вектор; мітка FLAG та чужорідний ген вводять у каркас з альфа-токсиною сигнальною послідовністю. Чужорідний протеїн експресується під контролем альфа-токсिनного промотору та націлений на секрецію сигнальною послідовністю *plc*. Секретований чужорідний протеїн може бути детектований у супернатантному середовищі за методом Вестерн-блоттинг з використанням анти-FLAG антитіла.

У такий спосіб у геном *C. perfringens* може бути введений будь-який придатний чужорідний ген. Це включає, наприклад, ДНК кодуєчі антигени патогенів шлунково-кишкового тракту, включаючи, наприклад, антигенні протеїни таких бактерій, як *E. coli*, вид *Salmonella*, вид *Campylobacter*, вид *Lawsonia*, та інш.; антигенні протеїни таких паразитів, як вид *Eimeria*, вид *Isospora*, вид *Cryptosporidium* та інш.; та антигенні протеїни таких вірусів, як ротавіруси, коронавіруси та інш., для імунізації тварини, яку лікують таким рекомбінантним *C. perfringens*. Інші протеїни, що можуть бути експресовані таким рекомбінантним *C. Perfringens*, включають терапевтичні протеїни чи пептиди. Необов'язково, вони включають пептиди, що є ендогенними до шлунково-кишкового тракту, включаючи трифоль фактор, чи будь-який цитокін. Відомий з рівня техніки, наприклад курячий IL-18, та інш..

Один такий конструкт *C. perfringens* експресує курячий IL-18 протеїн. Введення живих бак-

терій, що містять генне злиття, дозволить доставку терапевтичних доз IL-18 у кишку, що є відносно безпечним для тварини-хазяїна, завдяки відсутності продукування альфа-токсинів. Інші терапевтичні агенти також можуть бути експресовані за допомогою цієї системи.

У цій заявці процитовано численні посилання, вміст кожного з яких повністю включено до цієї заявки шляхом посилання. Наступні конкретні Приклади включені для ілюстрації, та не призначені для обмеження обсягу даного винаходу, якщо не вказано інше.

ПРИКЛАД 1

ВЕКТОР ГОМОЛОГІЇ *C. PERFRINGENS* АЛЬФА-ТОКСИНОВОГО ДЕЛЕТАНТУ

Був створений плазмідний вектор гомології 1162-55-20, корисний для конструювання делетантів альфа-токсину *C. perfringens*. Плазмід включає декілька важливих елементів; регіон реплікації *E. coli* плазмиду *pUC18*; *C. perfringens* хлорамфенікол (*catP*) та еритроміцин (*ermBP*), резистентні гени (обидва яких також експресуються у *E.coli*); та ген альфа-токсину *C. perfringens* (*plc*), інактивований специфічною делецією 9 амінокислот. Плазмід 1162-55-20 був створений у декілька стадій, наступним чином.

Спочатку ген *plc* клонували з останнього пташиного ізоляту *C. perfringens* (штам CP6). Послідовність *C. perfringens* штаму 13 (Genbank NC 003366; SEQ ID NO: 2) використовували для конструювання олігонуклеотидних праймерів для використання у клонуванні гену *plc*. Ці та усі наступні праймери одержували комерційно від Sigma Genosys, Woodlands, TX. Верхній праймер, розташований у гені у *plc* (CPE0035), 5' AGCTGCATAAGCAAAAGTTCCAACCTC 3' (SEQ ID NO: 14) відповідає нуклеотидам 47675-47700 штаму 13 (SEQ ID NO: 2). Нижній праймер, розташований у гені *cobW* (CPE0037), 5' GCAGAAACTCTTCTTAGACCTATTCTTTTAGGC 3' (SEQ ID NO: 15), є комплементарним нуклеотидам 50597-50629 штаму 13. Ці праймери використовували разом із геномною ДНК *C. perfringens* штаму CP6 у довгій полімеразній ланцюговій реакції (ПЦР). Продукт 2955 основних пар від верхнього гену *urplc* до нижнього гену *cob W* був передбачений з відомої послідовності штаму 13 (як показано на Фіг. 1). Промотор альфа-токсину, сигнальна послідовність та кодуєча послідовність гену *plc* (CPE0036) містилися у цьому фрагменті, тобто між верхнім геном *urplc* та нижнім геном *cob W*. ПЦР 2955 фрагмент основних пар потім клонували у вектор клонування *pCR-Blunt* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) що призвело до утворення плазмиду 1162-52.1. Нуклеотидна послідовність кодуєчого регіону *plc* 2955 фрагменту основних пар штаму CP6, визначали з цього фрагменту (SEQ ID NO: 22; а відповідним поліпептидом був SEQ ID NO: 23), та було показано, що вона є істотно гомологічною послідовністю гену *plc* *C. perfringens* штаму 13 (SEQ SD NO: 2).

Потім регіон реплікації *E. coli* та *C. perfringens* гени резистентності клонували з шаттл-плазмиду *pJIR418* (Sloan, et al., 1992, Plasmid 27, 207-219; Genbank M77169). Плазмід *pJIR418* дірексували

рестриктазами Bam HI та Spe I та кінці наповнювали полімеразою Кленоу. Лігація великого фрагменту призводила до утворення плазмиду 1162-45.1 та збереженню сайту рестрикції Bam HI. Цей плазмід зберігав регіон реплікації *E. coli* проте, на відміну від pJIR418, не містив джерело реплікації *C. perfringens*. Тому плазмід був здатний до автономної реплікації у *E. coli*, але не у *C. perfringens*.

На наступній стадії С-кінцева половина гену *plc* була субклонувана у проміжний плазмід 1162-45.1. Дигестія плазмиду 1162-52.1 з Bam HI та Eco RI вивільняла 1742 фрагмент основних пар, що містив С-кінцеву частину гену альфа-токсину унікального сайту Bam HI, розташованого у нижньому гені *plc* до гену *sob W* до сайту Eco RI, розташованого у множинному сайті клонування батьківського плазмиду. Фрагмент основних пар 1742 клонували між сайтами Bam HI та Eco RI, розташованими у множинному сайті клонування плазмиду 1162-45.1. В утвореному у результаті плазмиді 1162-53.7, С-кінцева половина гену *plc* має таку ж саму транскрипційну орієнтацію, що і гени *catP* та *etmBP* батьківського плазмиду.

На останній стадії, N-кінцеву половину гену *plc* клонували в унікальний сайт Bam HI плазмиду 1162-53.7. Це було здійснено шляхом створення фрагменту ПЦР, одержаного з гену альфа-токсину, субклонованого у плазмід 1162-52.1. Верхній праймер, 5' ggatccAGCTGCATAAGCAAAAGTTCCAAC TC 3' (SEQ ID NO: 16) був ідентичний попередньо відміченому праймеру *urplc* (SEQ ID NO: 4), за винятком того, що був включений фланкуючий сайт Bam HI (нижній). Нижній праймер, розташований у гені альфа-токсину, 5' ggatccaATGCATTCTTATCATATCTG?-GATAAGTAGAACC 3' (SEQ ID NO: 17) був комплементарний нуклеотидам 48824-48857 штаму 13 та включений у фланкуючий сайт рестрикції Bam HI та спейсерний нуклеотид для зберігання рамки читування (нижньої). Фрагмент Bam HI, утворений у результаті ПЦР, з цими праймерами та плазмідомною 1162-52-1 темплатною ДНК клонували в унікальний сайт Bam HI плазмиду 1162-53.7. Був виділений плазмід, що містив два регіони гену *plc* у такій самій транскрипційній орієнтації. Цей плазмід 1162-55.20 містив ген *plc* з бажаними дев'ятьма амінокислотними делеціями та додаванням лейцинового залишку між ala 61 та asp 71 токсину дикого типу (див. Фіг. 2). Секвенування ДНК плазмиду підтвердило рамку читування та чисту делецію 24 кодонів (що кодують вісім амінокислотних залишків)

ПРИКЛАД 2

КОНСТРУЮВАННЯ CLOSTRIDIUM
PERFRINGENS РЕКОМБІНАНТУ CPERF001

Делетовану версію гену *plc*, сконструйовану у Прикладі 1, вводили у *C. perfringens* з використанням наступної стратегії. Вектор гомології 1162-55.20 мав назву *C. perfringens* "суїцидний плазмід", оскільки його джерело реплікації *C. perfringens* було видалено.

Коли плазмід трансформували у *C. perfringens*, то його було неможливо реплікувати та він не виживав. Проте, якщо трансформовані бактерії поміщали у селекцію хормафеніколу та/або еритроміцину, то плазмідна ДНК могла бути примусово рекомбінована у бактеріальний геном через гомологію до гену *plc*. Рекомбінантні бактерії, одержані у результаті, мали назву інтегрантів. Інтегрант містив копію введеного вектору гомології, що був інтегрований у локус гену *plc*. Таким чином, одержаний у результаті інтегрант містив дві копії гену *plc*, оригінальну нормальну копію та введену делетовану версію. Введені резистентні гени були розташовані між двома копіями гену *plc*. Коли антибіотичну селекцію видаляли з інтегранту, то відбувалася рекомбінація між двома копіями гену *plc*. Ця рекомбінація могла призводити до одного з двох результатів. В обох випадках, ДНК між двома копіями гену *plc* (включаючи резистентні гени) була видалена. У першому випадку, був збережений нормальний ген *plc*, що призводило до відновлення оригінального батьківського штаму. У другому випадку, нормальний ген *plc* був замінений делетованою копією, що призводило до утворення бажаного конструкту делетанту альфа-токсину. Оскільки альфа-токсин делетантного штаму був інактивований, цей штам був негемолітичним. Тому бажаний делетантний інтегрант був ідентифікований для скринінгу негемолітичних клонів на кров'яних агарових планшетах.

Оскільки очікувалося, що рекомбінація, призводить до утворення бажаного інтегранту, відбувається нечасто, то критичним було застосування батьківських штамів *C. perfringens*, що мали трансформатну ефективність. Тому деякі останні пташині ізоляти *C. perfringens* були проаналізовані на предмет трансформаційної ефективності. Ізоляти трансформували шаттл-плазмідом pJIR418, як описано Allen and Blaschek (Applied and Environmental Microbiology 54:2322 (1988)) з деякими модифікаціями (що описані нижче). Штам 1240 проявляв найвищу трансформаційну ефективність (див. Таблицю 1), $9,2 \times 10^6$ трансформантів/мкг pJIR418 плазмідної ДНК. Цей штам був вибраний для конструювання делетантного CPERF001. Штам 29 був вибраний як батьківський штам для CPERF002.

Таблиця 1

Ефективність трансформації пташиних ізолятів *C. perfringens*

C. perf. А штам	трансформантів/мкг pJIR418
29	$3,6 \times 10^4$
23	$5,6 \times 10^2$
1220	$4,0 \times 10^6$
1240	$9,2 \times 10^6$
CP-2	відсутня
1230	$7,1 \times 10^3$
5227	відсутня
5230	відсутня

Джерелом вищезазначених штамів дикого типу був Dr. J. Glenn Songer, Dept. of Veterinary Sciences and Microbiology, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721.

Клітини *C. perfringens* штаму 1240 з нічної анаеробної культури у середовищі TSYC (30 г/л триптичного соєвого бульйону, 5 г/л дріжджового екстракту, 0,5 г/л цистеїну) розводили 1:25 та вирощували до $A_{600}=0,5436$. Після центрифугування 100 мл клітин при $18,000 \times g$ протягом 10 хвилин, електрокомпетентні клітини готували шляхом подвійного повторного суспендування клітин у рівному об'ємі попередньо відновленого сахарозного фосфату магнію ("SMP" готували як 270 mM сахарози, 1 mM $MgCl_2$, 7 mM $NaPO_4$, pH 7,3) буферу з наступним кінцевим повторним суспендуванням 0,5 мл SMP. Це призводило до одержання кінцевого об'єму у $\sim 2,0$ мл.

Аліквоти 100 мкл клітин піддавали електропорації з 4 мкг плазмиду 1162-55.20 у кюветах на 0,2 см. Bio-Rad Gene Pulser II використовували при 1,37 kV, опору у 100 Ом та ємності у 50 мікрофарад. Відразу після електропорації, клітини розводили 2,0 мл попередньо розведеного триптичного соєвого дріжджового цистеїнового середовища ("TSYC" готували як 30 г триптичного соєвого бульйону, 5 г дріжджового екстракту, 0,5 г цистеїну, 950 мл води) та інкубували протягом 3 годин при 37°C в анаеробній судині. Після періоду відновлення, розведення клітин поміщали на планшети TSYC + 25 мкг/мл хлорамфеніколових планшет. Ці планшети інкубували при 37°C у анаеробній судині.

Після зростання протягом ночі, спостерігали у середньому 50 хлорамфенікол-резистентних колоній на мікрограм 1162-55.20 ДНК. Одиначні колонії семи передбачених інтегрантів вирощували у неселективних середовищах TSYC для чотирьох послідовних результатів та поміщали на селективні кров'яні агарові планшети. Один з неселективних штамів, 1192-31.7, проявляв декілька негемолітичних колоній. Двадцять одну з цих негемолітичних колоній поміщали на неселективні контрольні планшети та реплікаційні планшети на TSYC + хлорамфеніколові планшети. Дві з цих 21 колоній були хлорамфенікол-чутливими.

Один з хлорамфенікол-чутливих передбачених делетантів, 1192-32.14, вирощували до 1240 дикого типу та інтегранту 1192-31.7 та поміщали

на кров'яні агарові планшети. Штам 1240 дикого типу проявляв чіткі зони бета гемолізу, тоді як делетант 1192-32.14 був чистою культурою негемолітичних колоній та був перейменований CPERF001.

Інші кров'яні планшети використовували як контрольні та реплікаційні для неселективних та селективних середовищ 1240 дикого типу та були чутливі до хлорамфеніколу та еритроміцину. Інтегрант, 1192-31.7, як і очікувалося, був резистентний як до хлорамфеніколу, так і до еритроміцину.

Для виключення можливості того, що гени, резистентні до антибіотиків, присутні, але не експресуються у CPERF001, ПЦР праймери, були синтезовані гени специфічні для хлорамфеніколу та еритроміцину у реакціях ПЦР. Геномні ДНК одержували зі штамів дикого типу, інтегрантів та штамів CPERF001, та використовували як темплати для реакцій ПЦР з антибіотичними генними праймерами. Результати ПЦР аналізу проявляли позитивний відклик тільки на суїцидний плазмід та інтегрант, а не на батьківський 1240 чи делетантний CPERF001. Це підтвердило передбачувану втрату резистентних генних послідовностей.

Для підтвердження делеції у гені альфа-токсину, регіон 1086 bp, оточуючий делецію, ампліфікували за допомогою ПЦР з використанням придатних альфа-токсинів специфічних праймерів. Ампліфіковані фрагменти клонували та секвенували. Результати секвенування підтверджували делецію дев'яти амінокислот від tyr 62 до trp 70 гену альфа-токсину та інсерцію одинарного leu (див. Фіг. 2A-2C).

CPERF001 оцінювали на предмет експресії інактивованого альфа токсоедного протеїну. Через 6 годин анаеробного зростання, аліквоти 1 мл клітин збирали та центрифугували. П'ятнадцять мікрограм неконцентрованих супернатантних середовищ аналізували поліакриламідним гелем електрофорезом та піддавали аналізу Вестерн-блоттінг з кролячим поліклональним антитілом, направленим проти рекомбінантного альфа-токсоедного протеїну (Vaccine 11(12): 1253-1258 (1993)). Результати показали специфічну реактивність антитіл з протеїном очікуваного розміру до альфа токсоедного протеїну.

CPERF001 є генетично сконструйованим делетантним штамом *C. perfringens* типу А. Цей

штам секретує інактивовану токсoidну форму альфа-токсин *C. perfringens*. Оскільки цей штам більше не експресує активний альфа-токсин, а зберігає значну частину антигенності токсину, він буде корисним як вакцина для захисту від хвороби, викликаной *C. perfringens*.

ПРИКЛАД 3

КОНСТРУЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТУ CPERF002 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Для компенсації зниженої трансформаційної ефективності штаму 29 *C. perfringens* (див. Таблицю 1, *supra*) був сконструйований новий вектор гомології. Новий вектор включав послідовності *C. perfringens*, клоновані безпосередньо з геному штаму 29. Було передбачено, що це призведе до більш ефективної стадії рекомбінації. Новим вектором був 1192-38.3, створений наступним чином.

На першій стадії регіон реплікації *E. coli* та резистентні гени *C. perfringens* клонували з шаттл-плазмиду pJIR418 (Sloan et al., Plasmid 27, 207 (1992); Genbank M77169). Плазмід pJIR418 дигестували рестриктазою NdeI. Лігування великого фрагменту призвело до утворення плазмиду 1192-23.1. У цього плазмиду було відсутнє джерело реплікації *C. perfringens*, але на відміну від плазмиду 1162-45.1, що був сконструйований у Прикладі 1, він зберігав весь множинний сайт клонування pJIR418.

На наступній стадії С-кінцева половина гену *plc* була субклонована у проміжний плазмід 1192-23.1. Геномна ДНК штаму 29 була використана як темплата довголанцюгового ПЦР. Регіон гену *plc* (альфа-токсин) від сайту *Bam* HI до частини гену *CPE0038* був ампліфікований. Верхній праймер *plc*, 5' CTGGGATCCTGATACAGATAATAATTC?-TCAAAGGAT 3' (SEQ ID NO: 18) відповідає нуклеотидам 48880-48916 штаму 13 (Genbank NC 003366). Нижній праймер у гені *CPE0038*, 5' actctgcagTTGTCATATCAATTAATTA-CTATAATCCC 3' (SEQ ID NO: 19) є комплементарним нуклеотидам 51244-51275 штаму 13 та містить фланкуючі нуклеотиди, включаючи сайт рестрикції *Pst* I (нижній). Продукт основних пар 2402 був одержаний та дигестований рестриктазами *Bam* HI та *Pst* I. Цей фрагмент був лігований з великим фрагментом *Bam* HI та *Pst* I дигестований 1192-23.1 з утворенням плазмиду 1192-36.10.

На останній стадії N-кінцеву половину гену *plc* клонували за допомогою ПЦР. Верхній праймер, 5' actgagctcCTAGACACTTTGCTTCAATATTTGGGAA 3' (SEQ ID NO: 20) відповідає нуклеотидам 46513-46540 штаму 13 та включає фланкуючі нуклеотиди та сайт *Sac* I (нижній). Нижній праймер, 5' actggatccGCATTCTTATCATAATCTGG-TAAGTAGAACC 3' (SEQ ID NO: 21) є комплементарним нуклеотидам 48824-48855 штаму 13 та включає фланкуючі нуклеотиди та сайт *Bam* HI. Продукт основних пар 2363 був одержаний та дигестований рестриктазами *Sac* I та *Bam* HI. Дигестований фрагмент був лігований з великим фрагментом *Sac* I та *Bam* HI дигестований 1192-36.10 з утворенням плазмиду 1192-38.3. Послідо-

вне секвенування регіону, фланкуючого *plc* *Bam* HI сайту у 1192-38.3 підтверджено делецією дев'яти амінокислот від *tyr* 62 до *trp* 70.

Плазмід 1192-38.3 був використаний для електропорації клітин штаму 29 *C. perfringens*. Попередньо було показано, що штам 29 трансформує з ефективністю $3,6 \times 10^4$ трансформантів/мкг pJIR418 плазмиду ДНК. Клітини штаму 29 вирощували та піддавали електропорації, як у Прикладі 2, за винятком того, що використовували методику рідкої селекції через тригодинний період відновлення. Замість поміщення у планшети, 0,67 мл аліквот клітин розводили у 12 мл TSYC + 25 мкг/мл хлорамфеніколу та вирощували усю ніч при 37°C в анаеробній посудині. Ця модифікація була використана через низьку ефективність трансформації та вирощування на планшетах штаму 29 порівняно із 1240. Після вирощування протягом ночі, клітини розводили знову у селекційних середовищах. Клітини другого збору потім п'ять разів пропускали без селекції до вирощування на кров'яній агаровій планшетах. Жодні з колоній з кров'яних агарових планшет були негемолітичні. Дві кров'яні планшети були потім повторно поміщені на TSYC, TSYC + 25 мкг/мл хлорамфенікол та TSYC + 50 мкг еритроміцинові планшети. Усі колонії були чутливі до еритроміцину, але тільки одна з 130 колоній була чутлива до хлорамфеніколу. Ця колонія, 1192-45.4B, була перейменована на CPERF002. Аналіз ПЦР геномної ДНК CPERF002 специфічними праймерами альфа-токсинів, показав позитивну смугу альфа-токсинів. Ця смуга була меншою за відповідну смугу штаму 29 ДНК дикого типу. Праймери, специфічні для генів до резистентних хлорамфеніколу та еритроміцину не ампліфікували CPERF002 ДНК, але проявляли сильні позитивні смуги плазмиду 1192-38.3. Секвенування CPERF002 альфа-токсину підтвердило делецію дев'яти амінокислот (див. Фіг. 3).

CPERF002 оцінювали на предмет експресії інактивованого альфа токсoidного протеїну. Через 6 годин анаеробного зростання, аліквоти у 1 мл клітин збирали та центрифугували. П'ятнадцять мікролітрів неконцентрованого супернатантного середовища аналізували поліакриламідним гель-електрофорезом та піддавали аналізу Вестерн-блоттінг з кролячим поліклональним антитілом, направленим проти рекомбінантного альфа-токсoidного протеїну (Vaccine 11: 1253 (1993)). Результати показали специфічну реактивність антитіла з протеїном очікуваного розміру щодо альфа токсoidного протеїну.

CPERF002 є генетично сконструйованим делетантним штамом *C. perfringens* типу A. Цей штам секретує інактивовану токсoidну форму альфа-токсин *C. perfringens*. Оскільки цей штам більше не експресує активний альфа-токсин, але зберігає значну частину антигенності токсину, він буде корисним як вакцина для захисту від хвороби, викликаной *C. perfringens*.

ПРИКЛАД 4

ЛЕЛЕТАНТНІ ВАКЦИНИ *C. PERFRINGENS*

Делетантні штами вакцини CPERF001 та CPERF002, описані у Прикладах 2 та 3, оцінюва-

ли на здатність до надання захисту від інфікування *C. perfringens* дикого типу. Перша частина дослідження була розроблена для визначення, чи буде мати введення живих штамів вакцини не-

сприятливий ефект на виводимість ембріонованих яєць. Призначення експериментальних груп та результати безпеки наведено у Таблиці 2.

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ БЕЗПЕКИ

Група*	Вакцина (доза)**	Кількість знесених яєць (%)
1	CPERF001 ($0,8 \times 10^2$) ^x	18(90%)
2	CPERF001 ($0,8 \times 10^3$)	17(85%)
3	CPERF001 ($0,8 \times 10^4$)	11 (55%)
4	CPERF001 ($0,8 \times 10^5$)	16(80%)
5	CPERF002($1,9 \times 10^2$)	16(80%)
6	CPERF002($1,9 \times 10^3$)	17(85%)
7	CPERF002($1,9 \times 10^4$)	14 (70%)
8	CPERF002($1,9 \times 10^5$)	12(60%)
9	Штам 1240 ($1,5 \times 10^3$)	16(80%)
10	Штам 29 ($3,7 \times 10^3$)	13(65%)
11	Контроль середовища	19(95%)
12	Неінокульований контроль	18(90%)

* 20 яєць на групу

** 100 мкл дози, введеної in ovo на 18 день ембріонування (IM)

^xТитр доз виміряний як колонієутворюючі одиниці (cfu").

При дозі у 10^3 чи менше (групи 1,2, 5, та 6), виводимість у цих групах не була значно нижча за виводимість у групі, інокульованій тільки середовищем (група 12). При найнижчій дозі CPERF001 показала таку ж виводимість, що й контроль середовища, та кращу, ніж інокульована контрольна група.

Оскільки більш високі дози делетантів могли мати несприятливий вплив на виводимість яєць, то тільки дві групи найнижчого дозування були

включені у ефективну частину дослідження. Ці групи, разом із птахами контролю середовища (група 11), були інфіковані (дикого типу) *C. perfringens* штамом CP6, що був введений перорально при, приблизно, 10^8 cfu/мл/птаха, коли птахам було 20, 21 та 22 дні. Усі птахи були некротизовані на 25 день життя, а ураження тонкого кишечника оцінювали по балам з використанням шкали балів на предмет некротичного ентериту, результати оцінювання наведено нижче.

0 балів	некротичний ентерит 1 +	некротичний ентерит 2+	некротичний ентерит 3+	некротичний ентерит 4+
Відсутність великих уражень NE у тонкому кишечнику; кишечник має нормальну еластичність (повернення до власного рівня після відкриття).	Тонкі та слабкі стінки кишечника (кишечник залишається плоским при відкриванні та не повертається у нормальний стан); надлишок чи більш густий слиз, що покриває слизову мембрану чи фокальне чи мультифокальне почервоніння слизу чи закупорка серозальних судин.	Одна чи декілька мультифокальних зон почервоніння та припухання стінок кишечника; одна чи декілька мультифокальних зон виражок та некрозу слизової оболонки.	Обширні мультифокальні зони некрозу та виразки кишкової слизової оболонки ± значна кровотеча чи шар фібрину чи некротичні прояви на поверхні слизової оболонки (вигляд махрового рушника).	Мертва тварина з великими ураженнями NE, 2+ бали чи більше

Підрахунок незначних модифікацій відповідно до Charles Hofacre, D.V.M., M.A.M., Ph.D., University of Georgia, Poultry Diagnostic and Research Center, 953 College Station Road, Athens, GA 30602.

П'ять (5) птахів з невакцинованої контрольної групи (не інфікованої) були розкриті наприкінці дослідження для підтвердження відсутності впливу *C. perfringens* протягом дослідження. Результати представлено у Таблиці 3.

Таблиця 3

ГРУПИ ЛІКУВАННЯ ДЛЯ ЗАХИСТУ*				РЕЗУЛЬТАТИ	
Група*	Вакцина	доза вакцини in-ovo (cfu)	Дні визначення <i>C. perfringens</i>	N	середнє
1	CPERF001	1×10^2	20,21 та 22	9	0,67
2	CPERF001	1×10^3	20,21 та 22	13	0,46
5	CPERF002	1×10^2	20,21 та 22	12	1,33
6	CPERF002	1×10^3	20,21 та 22	12	1,08
11	Контроль середовища	Відсутня	20,21 та 22	15	1,80
12	Відсутня	Відсутня	Не інфікували	5	0,00

* некропія на 25 день визначення

Бали для Груп 1 та 2 кожна була статистично значуще нижче порівняно із Групами 11 (Wilcoxon Exact Rank Sum Test $p \leq 0,0250$). Середні бали для Груп 5 та 6 були нижчі за бали Групи 11, але не були статистично різні (Wilcoxon Exact Rank Sum Test $p \geq 0,2177$). Оцінка ефективності вакцин була здійснена відповідно до процедур, описаних David Siev [Journal of Modern Applied Statistical Methods Vol. 4, No. 2, 500-508 (2005)]. Ефективність вакцин щодо зниження тяжкості хвороби була оцінена як 54% для Групи 1, 65% для Групи 2, 20% для Групи 5 та 27% для Групи 6 порівняно із Групою 11.

ПРИКЛАД 5

КОНСТРУЮВАННЯ СВИНОГО ДЕЛЕТАНТУ *C. PERFRINGENS*

Стратегії, використані у Прикладах 1 та 2, *supra*, використовували для конструювання делетантних мутантів альфа-токсину зі свинячих штамів *C. perfringens*. Спочатку польові ізоляти хворих свиней піддавали електропорації з плазмідом pJIR418 для оцінки їх здатності до трансформації. Вихід ізолятів становив $\geq 10^4$ трансформантів на мікрограм плазмідної ДНК, та вони були чутливі до хлорамфеніколу чи еритроміцину, та були кандидатами для делеції.

Геномну ДНК від кандидатних штамів використовували як темплату для довголанцюгової гену *plc* (альфа-токсин) та фланкуючих послідовностей. Після субклонування продуктів ПЦР, ген альфа-токсину та фланкуючі регіони секвенували та рестрикційно картували. Нові олігонуклеотидні

праймери синтезували з фланкуючими сайтами рестрикції, а продукти двох окремих ампліфікацій клонували у суїцидний плазмід 1192-23.1 для створення делеції 27 основних пар, як у Прикладі 1.

Свинячий суїцидний вектор піддавали електропорації у відповідний свинячий штам *C. perfringens* та мутанти делеції ізолювали способами, описаними у Прикладі 2, *supra*. У мутантах делеції була підтверджена відсутність бета-гемолізу на кров'яних агарових планшетах та ДНК секвенуванням гену альфа-токсину.

Цей конструкт є генетично сконструйованим делетантним штамом *C. perfringens* типу A. Цей штам секретує інактивовану токсодну форму альфа-токсин *C. perfringens*. Оскільки цей штам більше не експресує активний альфа-токсин, а залишає значну частину антигенності токсину, він є корисним як вакцина для захисту свиней від хвороб, викликаних *C. perfringens*.

БІОЛОГІЧНЕ ДЕПОНУВАННЯ

Культури наступних біологічних матеріалів були депоновані у наступному міжнародному депозитарії:

Американська Колекція Типових Культур (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A., за умов, що відповідають вимогам Будапештської Угоди щодо міжнародного визнання депонування мікроорганізмів для патентування.

Організм	Номер доступу.	Дата депонування
<i>Clostridium perfringens</i>	PTA7364	7 лютого, 2006 р.
CPERF/ Δ αтоксин 365-054		
<i>Clostridium perfringens</i>	PTA7365	7 лютого, 2006 р.
CPERF/ Δ αтоксин 365-053		

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110 > КОЧРАН Марк

ЛЕР Стівен

СИНЕНКІ Річард

ПЕТЕРСЕН Гарі

<120 > РЕКОМБІНАНТНІ АТЕНУЙОВАНІ ОРГАНІЗМИ КЛОСТРІДІУМ ТА ВАКЦИНА

<130> AH06175

<150> 60/792,553

<151> 2006-4-17

<160> 23

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 398

<212> PRT

<120 > Clostridium perfringens штам 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 1197

<210> ДНК

<220> Clostridium perfringens штам 13

<400> 2

```

atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctaogc tagcaactag cctatgggct    60
ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaagattg atggaacagg aactcatgct    120
atgattgtaa ctcaaggggt ttcaatctta gaaaatgata tgtrcaaaaa tgaaccagaa    180
agtataagaa aaaacttaga gattttaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct    240
acttatccag attatgataa gaatgcatat gatctatata aagatcattt ctgggatcct    300
gatacagata ataattttct aaaggataat agttggtatt tagcttattc tataacctgac    360
acagggggaat cacaataaag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaaaggga    420
aactataaac aagctacatt ctatcttggg gaggctatgc actatttttg agatatagat    480
actccatata atcttgctaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagtttgaa    540
acttttgcag aggaagaaaa agaacagtat aaaataaaca cagcagggtg caaaactaat    600
gaggattttt atgtcgatat cttaaaaaac aaggatttta atgcatggtc aaaagaatat    660
gcaagagggt ttgctaaaac aggaanaatca atatactata gtcattgctag catgagtcac    720
agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaaca    780
gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga    840

aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca    900
gatgactaca tgtatttttg aatcaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg    960
gacaaccagg gaaatgattt tatgactgga agtaaagaca cttatacttt caaattaaaa   1020
gatgaaaatc taaaaattga tgatatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca   1080
gcattccagg atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaatgg aaaagttgta   1140
gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaatttcaa cttataatat aaaataa    1197

```

<210> 3
 <211> 370
 <212> PRT

<213> Clostridium perfringens stram 13

<400> 3

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

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

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

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

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

Asp Asn Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser
85 90 95

Gln Ile Arg Lys Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly
100 105 110

Asn Tyr Lys Gln Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe
115 120 125

Gly Asp Ile Asp Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp
130 135 140

Ser Ala Gly His Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu
145 150 155 160

Gln Tyr Lys Ile Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr
165 170 175

Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr
180 185 190

Ala Arg Gly Phe Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala
195 200 205

Ser Met Ser His Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr
210 215 220

Leu Ala Asn Ser Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu
225 230 235 240

His Asp Val Ser Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val Gly Lys Asn Val Lys
245 250 255

Glu Leu Val Ala Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu Lys Asp Ala Gly Thr
260 265 270

Asp Asp Tyr Met Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys Asp Gly Lys Thr Gln
275 280 285

Glu Trp Glu Met Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys
290 295 300

Asp Thr Tyr Thr Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn Leu Lys Ile Asp Asp
305 310 315 320

Ile Gln Asn Met Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Pro Asp
325 330 335

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

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

Ile Lys
 370

<210> 4
 <211> 39

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 4
 aacgcctatg atctatatca agatcatttc tgggatacct

39

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Олігопептид

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 14

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 6
 aatgcattgg atcc

14

<210> 7
 <211> 4

<212> PRT

<213> Олігопептид

<400> 7

Asn Ala Leu Asp
 1

<210> 8
 <211> 15

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 8
 aatgcattgg atcct

15

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Олігопептид

<400> 9

Asn Ala Leu Asp Pro
1 5

<210> 10

<211> 14

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 10

aatgcggatc cagt

14

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Олігопептид

<400> 11

Asn Ala Asp Pro
1

<210> 12

<211> 12

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 12

aatgcggatc ct

12

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Олігопептид

<400> 13

Asn Ala Asp Pro
1

<210> 14

<211> 26

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 14

agctgcataa gcaaaagttc caactc

26

<210> 15

<211> 33

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 15
gcagaaactc ttcttagacc tattctttta ggc 33

<210> 16
<211> 32

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 16
ggatccagct gcataagcaa aagttccaac tc 32

<210> 17
<211> 41

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 17
ggatccaatg cattcttacc ataactctga taagtagaac c 41

<210> 18
<211> 37

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 18
ctgggactct gatacagata ataatttctc aaaggat 37

<210> 19
<211> 40

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 19
acctcgagct tgcataatca attaaattaa ctataatccc 40

<210> 20
<211> 37

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 20
actgagctcc tagacacttt gcttcaatat ttgggaa 37

<210> 21
<211> 41

<212> ДНК

<213> Олігонуклеотид

<400> 21
actggatccg cattcttacc ataactctga taagtagaac c 41

<210> 22
<211> 1197

<212> ДНК

<213> Clostridium perfringens wram CP6

<400> 22

```

atgaaaagaa agatttgtaa ggcgcttatt tgtgctgcgc tagcaactag cctatgggct    60
ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaaaattg atggaacagg aactcatgct    120
atgattgtaa ctcaaggggt ttcaatctta gaaatgacg tgcctaaaaa tgaaccagaa    180
agtgtagaa aaaacttaga gattttaaaa gagaacatgc atgagcttca attaggttct    240

acttatccag attatgataa gaacgcctat gatctatata aagatcattt ctgggatcct    300
gatacagata ataatttctc aaaggataat agttgggtatt tagcttattc tatacctgac    360
acaggggaat cacaataaag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga    420
aactataaac aagctacatt ctatcttga gaggctatgc actattttgg agatatagat    480
actccatata atcctgtcaa tgttactgcc gttgatagcg caggacatgt taagtttgag    540
acttttgcag aggaaagaaa agaacagtat aaaataaaca cagcagggtg caaaactaat    600
gaggattttt atgctgatat cttaaaaaac aaagatttta atgcatgggc aaaagaatat    660
gcaaagaggtt ttgctaaaac aggaaaatca atatactata gtcctgctag catgagtcac    720
agttgggatg attgggatta tgcagcaaag gtaactttag ctaactctca aaaaggaaca    780
gcaggatata ttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttgga    840
aagaaatgaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca    900
gatgactaca tgtatttttg aatcaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg    960
gacaacccag gaaatgattt tatgactgga agtaaagaca cttatacttt caaattaaaa   1020
gatgaaaatc caaaaattga tgatatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca   1080
gcattcccag atgcttataa gccagaaaac ataaagataa tagcaaatgg aaaagtgtga   1140
gtagacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa     1197

```

<210> 23

<211> 398

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens wram CP6

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

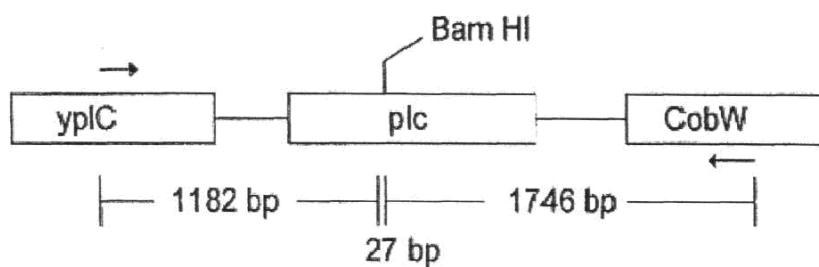
Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr
325 330 335

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

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

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

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



Φir.1

Фіг.2А

SEQ ID NO: 4 -AAC GCC TAT GAT CTA TAT CAA GAT CAT TTC TGG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 5 -Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro-

Фіг.2В

SEQ ID NO: 6 -AAT GCA ttg gat cc
 SEQ ID NO: 7 -Asn Ala Leu Asp

Фіг.2С

SEQ ID NO: 8 -AAT GCA TTG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 9 -Asn Ala Leu Asp Pro-

Фіг.3А

SEQ ID NO: 4 -AAC GCC TAT GAT CTA TAT CAA GAT CAT TTC TGG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 5 -Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro-

Фіг.3В

SEQ ID NO: 10 -AAT GCG gat cca gt
 SEQ ID NO: 11 -Asn Ala Asp Pro

Фіг.3С

SEQ ID NO: 12 -AAT GCG GAT CCT-
 SEQ ID NO: 13 -Asn Ala Asp Pro-