



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0718273-2 A2



(22) Data de Depósito: 26/10/2007
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/08
C12N 15/82
C12N 5/10

(54) Título: VACINA PARA AVES DOMÉSTICAS, PARA ENTERITE NECRÓTICA, COMPREENDENDO UM ANTÍGENO DE TOXINA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS MUTANTE, E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA VACINA **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 27/10/2006 US 60/854,741

(73) Titular(es): Dow Agrosiences Llc

(72) Inventor(es): Donald J. Merlo, Janna Armstrong, Kelley A. Smith, Krishna Madduri, Liu Yin Shen, Mark Allen Thompson, Steven Robert Webb, William Michael Ainley

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007082670 de 26/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/055069de 08/05/2008

Relatório descritivo da Patente de Invenção para "**VACINA PARA AVES DOMÉSTICAS, PARA ENTERITE NECRÓTICA, COMPREENDENDO UM ANTÍGENO DE TOXINA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS MUTANTE, E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA VACINA**".

5 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O *Clostridium perfringens* ("Cp"), um anaeróbio gram-positivo, está associado a diversas doenças, incluindo gangrena gasosa, síndrome de morte súbita infantil e enterite necrótica em galinhas (Titball e cols., 1999). A enterite necrótica (NE) é uma doença séria, fatal e prevalente na indústria de aves de criação (Justin e cols., 2002) que é caracterizada por enterotoxemia aguda, que resulta em necrose do intestino delgado e até 50% de mortalidade, primariamente em galinhas e perus com 2-12 semanas de idade.

O tratamento preventivo com antibióticos é o método predominante atualmente empregado para evitar as infecções por Cp na indústria de aves de criação. Em função da preocupação disseminada em relação ao desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, há uma necessidade antiga de um método alternativo.

O *Clostridium perfringens* codifica um gene para uma exotoxina definida como α -toxina. A α -toxina de Cp (cpa) é relatada como o principal determinante de virulência da enterite necrótica, induzindo as lesões necróticas debilitantes (Logan e cols., 1991). A cepa do tipo A de *C. perfringens* é a cepa ambiental mais prevalente e produz níveis elevados de α -toxina (Ginter e cols., 1996).

A α -toxina é uma fosfolipase C (PLC) zinco-dependente de 370 aminoácidos (AA) que possui propriedades tanto enzimáticas quanto tóxicas (Justin e cols., 2002). Embora a cpa seja uma fosfolipase C com preferência por fosfatidilcolina (PC-PLC), a toxicidade resulta de sua habilidade para hidrolisar substratos fosfolipídicos fosfatidilcolina e esfingomielina, ambos componentes cruciais de membranas de células eucarióticas (Justin e cols., 2002). Além das propriedades explícitas de hemólise, necrose, permeabilização vascular e agregação plaquetária, a toxina desperta diversos efeitos sutis no metabolismo de células eucarióticas, incluindo a ativação da cascata

do ácido araquidônico e a estimulação da atividade de proteína quinase C (Ginter e cols., 1996).

A α -toxina consiste em dois domínios, um domínio α -helicoidal do terminal N e um domínio em sanduíche β de oito fitas do terminal C. O terminal N (resíduos de AA 1-246) contém o sítio ativo de fosfolipase C e três sítios de ligação de íon zinco associados. O terminal C (resíduos de AA 256-370) é responsável pela ligação à membrana cálcio-dependente. Seu papel é facilitar a interação da α -toxina com fosfolipídeos da membrana. O domínio do terminal C é necessário para o reconhecimento de fosfolipídeo, bem como para a atividade hemolítica da α -toxina (Titball e cols., 1999).

Fragmentos da α -toxina de *Clostridium perfringens* foram produzidos e testados quanto a uma função independente. Em camundongos, foram induzidos anticorpos que reagem de forma cruzada com a α -toxina de comprimento total após imunização com o domínio do terminal N (Cpa1-249) ou do terminal C (Cpa247-370) da toxina. Fragmentos menores da α -toxina não induziram anticorpos que reagem de forma cruzada. *In vitro*, anti-Cpa1-249 neutralizou a atividade de fosfolipase C, mas não a atividade hemolítica da toxina. Anti-Cpa247-370 neutralizou tanto a atividade de fosfolipase C quanto a atividade hemolítica. Dos fragmentos do domínio do terminal N e do terminal C, somente a imunização com Cpa247-370 induziu proteção contra os efeitos letais da toxina *in vivo*. Adicionalmente, a imunização com Cpa247-370 forneceu proteção em um modelo de camundongo contra o organismo inteiro, *C. perfringens* do tipo A. Esse estudo confirmou o papel essencial da α -toxina e, especificamente, do domínio do terminal C da cpa na patogênese da gangrena gasosa (Williamson e Titball, 1993).

A Patente U.S. Nº 5.851.827 (Titball e Williamson) está relacionada aos peptídeos e às vacinas para a indução da produção de anticorpos dirigidos contra α -toxina de *Clostridium perfringens* em animais. Aqueles peptídeos compreendem a sequência de aminoácidos da alfa-toxina dos aminoácidos 247 a 370, mas não possuem os epitopos necessários para a atividade de hidrólise de fosfolipase C e/ou esfingomielina entre os aminoácidos 1 a 240. São ainda fornecidos antisoros e anticorpos despertados con-

tra os peptídeos e vacinas e, particularmente, anticorpos monoclonais e linhagens de células de hibridoma para sua produção.

A α -toxina produzida pela cepa NCTC 8237 de *Clostridium perfringens* demonstrou diferir das α -toxinas produzidas pela maioria das cepas de *C. perfringens* isoladas de seres humanos e bezerros nas seguintes posições de AA: Ala174 a Asp174; Thr177 a Ala177; Ser335 a Pro335. No entanto, essas diferenças não alteravam as propriedades tóxicas da proteína. Além disso, demonstrou-se que uma vacina do domínio do terminal C derivada dessa cepa protege contra a α -toxina de uma cepa entérica bovina de *C. perfringens* (Ginter e cols., 1996).

A mutagênese sítio-dirigida da α -toxina de *Clostridium perfringens* foi o tema de vários estudos para elucidar os aminoácidos essenciais para as propriedades tóxicas dessa proteína. Nagahama e cols. (1995) relataram uma única mutação pontual em AA H-68 ou H-148 substituído com G (H68G ou H148G) resultou na perda completa das atividades hemolíticas, de fosfolipase C, de esfingomielinase e letais da toxina. No entanto, a antigenicidade para o antisoro de α -toxina do tipo selvagem era mantida. O mesmo resultado surgiu em decorrência de uma substituição de H148L. Uma mutação de H126G, H136G ou H136A reduziu significativamente, mas não eliminou, as atividades tóxicas. A mutação em H-46, -207, -212 ou -241 não apresentou efeitos sobre as atividades biológicas, o que indica que esses resíduos não são essenciais à toxicidade. A toxina do tipo selvagem e as toxinas variantes em H-68, -126 e -136 continham dois átomos de zinco. A toxina variante em H-148 possuía somente um átomo de zinco, o que sugere que H-148 se liga firmemente a um átomo de zinco, o que é essencial para o sítio ativo da α -toxina, e que nenhum átomo de zinco associado à toxina do tipo selvagem está associado a H-68, -126 ou -136.

Guillouard e cols. (1996) basearam uma série de estudos de mutagênese sítio-dirigida sobre a estrutura cristal de uma PC-PLC de *Bacillus cereus*, na medida em que o domínio do terminal N da α -toxina de *Clostridium perfringens* é altamente homólogo à sua fosfolipase C completa. As substituições de AA de D56N, H126S, H68S, H148S, H136S, E152S, H11S

ou W1S resultaram em uma redução significativa ou eliminação completa das atividades biológicas.

Também com base na estrutura conhecida de *B. cereus*, Nagahama e cols. (1997) investigaram o papel de D-56, D-130 e E-152 nas atividades hemolíticas, de fosfolipase C (PLC) e de esfingomielinase (SMase) da α -toxina de *Clostridium perfringens*. A substituição de D-56 na α -toxina com E, N, G ou S resultou na perda completa das atividades hemolíticas, de PLC e de SMase. As toxinas variantes em D-130 mostraram uma redução de aproximadamente 100 vezes das atividades biológicas, comparadas com as da toxina do tipo selvagem. A substituição de G para E-152 causou a perda completa dessas atividades e manteve a antigenicidade para o antisoro de α -toxina do tipo selvagem. No entanto, E152Q ou E152D resultou em uma redução significativa, mas não na eliminação completa, da toxicidade.

Martin e Hergenrother (1998) estudaram o papel de D-55 na catálise de base geral pela PC-PLC de *B. cereus*, a posição de AA análoga a D-56 na α -toxina de *Clostridium perfringens*. Foram feitas substituições com L, N ou E, com L resultando na maior redução da atividade catalítica (9×10^{-5} % do tipo selvagem).

A sequência disponível da α -toxina de *Clostridium perfringens* (cpa) é altamente conservada em isolados bovinos e de mamíferos, como determinado pelos registros no GenBank. Muitas sequências de DNA disponíveis publicamente de isolados de galinha não se estendem no domínio do terminal C (Números de Acesso no GenBank AAL85329, AAL85330, AAL85331, AAL85332). Foi publicada uma sequência de alfa-toxina de comprimento total de cisne (Número de Acesso no GenBank AF204209), e a proteína codificada é altamente divergente da alfa-toxina isolada da Cepa 13, um isolado humano (Acesso no GenBank CLOPLC05) (Justin e cols., 2002). Recentemente, foram comparadas sequências da proteína de comprimento total de cpa de 25 isolados de galinha de *C. perfringens* (Sheedy e cols., 2004), e verificou-se que contêm apenas pequenas diferenças na sequência de aminoácidos (uma a seis diferenças da Cepa 13-padrão). Essas variantes de sequência foram agrupadas em cinco tipos (I-V).

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção pertence, em parte, ao desenvolvimento de uma vacina para aves de criação contra enterite necrótica (NE). Esta invenção utiliza fatores virulentos de exotoxina como vacinas, após introdução de mutações apropriadas para abolir sua toxicidade. A presente invenção fornece uma vacina para aves de criação contra NE. A vacina utiliza um novo antígeno protetor que é uma exotoxina de α -toxina de *Clostridium perfringens* (Cp) (Mcpa) mutada, de comprimento total não-tóxica. A utilidade dessa vacina foi demonstrada em galinhas por redução da gravidade da lesão da NE após ataque de Cp, por exemplo.

Também são aqui descritos novas abordagens para a produção dessa vacina em quantidades significativas. Uma abordagem exemplificada está relacionada aos sistemas bacterianos de expressão, de preferência ao sistema bacteriano de expressão que utiliza *Pseudomonas fluorescens* (Pf).

Também é revelada uma nova alfa-toxina do Tipo VI de isolados de galinha de Cp.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra um alinhamento de várias sequências de aminoácidos de α -toxina de *Clostridium perfringens*, isoladas de galinhas, cisnes, hospedeiros humanos e bovinos.

A figura 2 é um dendograma que ilustra o relacionamento entre sequências de isolados de Cp de galinha, com base na sequência de aminoácidos deduzida de α -toxina.

A figura 3 ilustra as etapas de clonagem envolvidas no constructo de um vetor para expressão de Mcpa com cauda de histidina no terminal C em *E. coli*.

A figura 4 ilustra as etapas de clonagem envolvidas no constructo de um vetor para expressão de Mcpa com cauda de histidina no terminal N em *E. coli*.

A figura 5 mostra sítios de restrição de um constructo produzida para a expressão de Mcpa com cauda de histidina em *Pseudomonas fluorescens*.

A figura 6 é um mapa de restrição de um constructo produzida para a expressão de Mcpa sem cauda de histidina em *Pseudomonas fluorescens*.

5 A figura 7 mostra a recuperação de Mcpa sem cauda de histidina de cultura de *P. fluorescens* com o uso de purificação por cromatografia por troca aniônica e SDS-PAGE de frações eluídas.

A figura 8 demonstra a perda da atividade hemolítica em Mcpa sem cauda de histidina purificada; também é mostrada a presença de hemólise em consequência da existência de detergente residual na amostra.

10 A figura 9 mostra a ausência de atividade de lecitinase em amostras purificadas de Mcpa.

A figura 10 é um gráfico em mosaico de pontuações de lesão por grupo de tratamento, resultantes de um estudo clínico para avaliar a utilidade de Mcpa formulada como uma vacina subcutânea para proteção contra NE.

15 BREVE DESCRIÇÃO DAS TABELAS

A **Tabela 1** mostra variações em alfa-toxinas de *Cp* isoladas de galinhas.

20 A **Tabela 2** mostra valores para preferência de códon em espécies de arroz e tabaco, bem como valores de preferência ponderados usados para o design de genes com expressão ótima tanto no arroz quanto no tabaco.

A **Tabela 3** mostra composições de códon de regiões codificadas para a proteína de Mcpa.

25 A **Tabela 4** resume resultados finais da atividade hemolítica de amostras de Mcpa purificada e controles.

A **Tabela 5** descreve o design do estudo clínico para avaliação de antígenos de Mcpa em galinhas jovens.

A **Tabela 6** mostra as pontuações de lesão por grupo de tratamento do experimento clínico.

30 A **Tabela 7** inclui resultados da análise estatística das pontuações de lesão.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

O **ID. DE SEQ. Nº: 1** é a sequência de nucleotídeos para a região codificadora de alfa-toxina nativa de isolados de galinha de *C. perfringens*.

5 O **ID. DE SEQ. Nº: 2** é a proteína de alfa-toxina nativa de isolados de galinha de *C. perfringens* codificada pelo ID. DE SEQ. Nº: 1.

O **ID. DE SEQ. Nº: 3** é a sequência de nucleotídeos para a região codificadora de planta otimizada para a alfa-toxina madura mutada de *C. perfringens*.

10 O **ID. DE SEQ. Nº: 4** é a sequência de aminoácidos da alfa-toxina madura mutada de *C. perfringens* codificada pelo ID. DE SEQ. Nº: 3.

O **ID. DE SEQ. Nº: 5** é a sequência de DNA de planta otimizada para peptídeo direcionado ao retículo endoplasmático modificado de zeína de 15 kDa.

15 O **ID. DE SEQ. Nº: 6** fornece a sequência de proteína para o peptídeo direcionado ao retículo endoplasmático modificado de zeína de 15 kDa.

O **ID. DE SEQ. Nº: 7** fornece a sequência de DNA de planta otimizada que codifica proteína de alfa-toxina madura mutada de *C. perfringens* (Mcpa) com peptídeo dirigido ao retículo endoplasmático de zeína de 15 kDa, e peptídeo de retenção de KDEL ER.

20 O **ID. DE SEQ. Nº: 8** fornece uma proteína de fusão da proteína de alfa-toxina madura mutada de *C. perfringens* (Mcpa) com peptídeo dirigido ao retículo endoplasmático de zeína de 15 kDa, e peptídeo de retenção de KDEL ER.

O **ID. DE SEQ. Nº: 9** fornece uma sequência de DNA que codifica Mcpa expressa em *Pseudomonas fluorescens* com uma cauda de histidina, um sítio de reconhecimento de trombina, uma cauda de S (*S-tag*) e um sítio de reconhecimento de enteroquinase.

30 O **ID. DE SEQ. Nº: 10** fornece uma sequência de proteína de Mcpa expressa em *Pseudomonas fluorescens* com uma cauda de histidina, um sítio de reconhecimento de trombina, uma cauda de S e um sítio de re-

conhecimento de enteroquinase.

O ID. DE SEQ. Nº: 11 fornece uma sequência de DNA que codifica Mcpa expressa em *Pseudomonas fluorescens*, sem uma cauda de histidina, sítio de reconhecimento de trombina, cauda de S e sítio de reconhecimento de enteroquinase.

O ID. DE SEQ. Nº: 12 fornece uma sequência de proteína de Mcpa expressa em *Pseudomonas fluorescens*, sem uma cauda de histidina, sítio de reconhecimento de trombina, cauda de S e sítio de reconhecimento de enteroquinase.

10 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Esta invenção pertence, em parte, ao desenvolvimento de uma vacina para aves de criação contra enterite necrótica (NE). Esta invenção envolve a utilização de fatores virulentos como, por exemplo, exotoxinas, como vacinas, após serem introduzidas mutações apropriadas para abolir sua toxicidade. A presente invenção fornece uma vacina para aves de criação contra NE. A vacina utiliza uma α -toxina de comprimento total de *Clostridium perfringens* (cpa) que é mutada. A utilidade dessa vacina foi demonstrada por redução da gravidade da lesão da NE em experimentos de ataque por NE.

Caso um antígeno de α -toxina pudesse ser eficaz para proteção contra NE em aves de criação, ele teria que ser liberado com sucesso para sensibilização e subsequente neutralização da α -toxina, antes do surgimento de lesões necróticas no intestino. Ele também teria que ser não tóxico.

A proteína de comprimento total de α -toxina foi selecionada para avaliação de acordo com a presente invenção em uma tentativa de assegurar um enovelamento correto e uma apresentação de antígeno eficaz. No entanto, é necessária uma versão não-tóxica para uso como vacina. Isso pode ser obtido projetando-se várias mutações em cpa para eliminar as atividades tóxicas e minimizar a probabilidade de reversão em um sistema de expressão heterólogo. A vacina de α -toxina produzida de acordo com a presente invenção foi projetada com mutações em 3 sítios específicos (D56L, H148G e E152G) para abolir a toxicidade.

A sequência de cpa disponível publicamente é altamente conservada em isolados de bovinos e de mamíferos, como determinado a partir dos registros no GenBank. Foi publicada uma sequência de α -toxina de comprimento total de cisne, mas ela é altamente divergente (Justin *et al.*,
5 2002). Foi obtido DNA genômico de dois isolados de *Cp* derivada de intestino de galinha (Benchmark Biolabs, Inc., Lincoln, NE) e os genes de α -toxina foram totalmente sequenciados. Não foi detectada nenhuma diferença entre os dois isolados de galinha. A sequência de aminoácidos resultante foi alinhada com dados publicados e foi determinada como sendo altamente ho-
10 móloga e um isolado intestinal bovino CER89L43 (veja a **Figura 1**). A **Figura 1** mostra um alinhamento da sequência de alfa-toxina em questão de isolados de *Clostridium perfringens*, BBL1 e BBL2 (alfa-toxina de galinha BBL) com as sequências dos Tipos I-V de Sheedy *et al.* (2004) e com as sequências de cpa de cisne, humana, bovina e mutante em questão. Como
15 ilustrado na **Figura 2**, o gene de BBL parece ser um exemplo de um novo Tipo VI, mais relacionado intimamente ao Tipo III. A **Figura 2** é um dendograma que ilustra o relacionamento dos isolados de *Cp* de galinha. Essa nova classe de toxinas e genes é um aspecto da presente invenção.

Foram selecionadas três posições de aminoácidos de cpa para
20 mutação para a produção de uma versão não-tóxica de cpa, potencialmente restando-se ao mesmo tempo a imunogenicidade. A posição 56 (ácido aspártico) é um sítio catalítico de cpa. Foram selecionadas duas posições para uma possível interferência com a ligação de zinco: histidina em #148 e ácido glutâmico em #152. Portanto, foram feitas as seguintes substituições na se-
25 quência de cpa derivada de galinha para uso como o antígeno de NE de comprimento total mutado: D56L; H148Q; E152G (veja a **Figura 1**).

Também é aqui descrita uma nova abordagem para a produção dessa vacina em quantidades significativas. A abordagem exemplificada está relacionada aos sistemas bacterianos de expressão — de preferência, um
30 sistema bacteriano de expressão que utiliza o sistema de *Pseudomonas fluorescens* descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 4.861.595.

Os estudos feitos até hoje indicam que a proteína de α -toxina

mutada pode ser expressa em quantidades significativas em *P. fluorescens*. A proteína purificada superexpressa foi testada *in vitro* e verificou-se que não possui atividades hemolíticas ou de lecitinase. *In vivo*, ela demonstrou eficácia como vacina. Esses resultados exemplificam o uso de *P. fluores-*
5 *cens* como um sistema muito adequado para a expressão de proteínas candidatas à vacina. Esse sistema não apenas gera um nível de expressão elevado de vacinas para a saúde animal, mas a maioria das proteínas produzidas está na forma solúvel. Os rendimentos variam de 10 a 100 mg/l em "shake flask", dependendo do tipo de proteína; sob condições controladas do
10 fermentador, esses rendimentos podem ser aumentados várias vezes, o que torna a produção de vacina rentável e econômica.

Um dos objetivos desse trabalho foi gerar antígeno expresso para proteger aves domesticadas contra enterite necrótica (NE). Dessa forma, a presente invenção está relacionada às estratégias projetadas para
15 combater a doença NE. Uma estratégia (e uma modalidade) da presente invenção envolve a produção, em culturas bacterianas, de uma versão mutada de um fator de virulência crucial, α -toxina de *Cp*, para uso como vacina. Adicionalmente, uma proteína recombinante purificada pode ser usada para aplicações que incluem a produção de antisoros (coelho ou camundongo),
20 avaliação de monoclonais para desenvolvimento/otimização de ensaios imunabsorventes ligados à enzima (ELISA), e para a geração de um controle positivo no desenvolvimento/otimização de *Western blot*.

Uma alfa-toxina mutada de comprimento total (Mcpa) foi testada como um candidato a vacina. Para validá-la como candidato a vacina, foi
25 necessária uma quantidade suficiente de proteína pura para a realização de estudos clínicos para examinar se Mcpa fornece proteção contra NE. Para permitir a realização dos estudos clínicos e para desenvolver reagentes para avaliação da expressão de antígenos de NE em sistemas heterólogos, a proteína foi expressa e purificada de células bacterianas. Mcpa foi expressa até
30 um nível muito elevado em *E. coli* como uma fusão de glutathione S-transferase (GST); no entanto, os esforços para purificar Mcpa da cauda de GST com o uso de um sítio de clivagem de enteroquinase (EK) foram preju-

dicados em função da sensibilidade da Mcpa à EK.

Portanto, Mcpa foi produzida em *Pseudomonas fluorescens* (Pf) com uma cauda menor, purificada, testada quanto à ausência de toxicidade, e foi obtida uma quantidade suficiente para os experimentos clínicos e para a produção de anticorpos. A proteína produzida por Pf despertou uma res-
5 posta imunológica em galinhas e, quando administrada como uma vacina subcutânea, reduziu a gravidade de lesões de NE induzidas por Cf.

Adicionalmente, foi produzido um antígeno de Mcpa sem cauda para caracterizar mais plenamente a capacidade antigênica da proteína. Dessa forma, o gene foi modificado para excluir todas as caudas molecula-
10 res. A Mcpa sem cauda de histidina foi expressa em *P. fluorescens*, subsequentemente purificada, e testada quanto à ausência de toxicidade. A Mcpa sem cauda de histidina também despertou uma resposta imunológica em galinhas e reduziu a gravidade de lesões de NE, quando administrada como
15 uma vacina subcutânea.

Além disso, foi iniciado um projeto de pesquisa para explorar a possibilidade de produção de uma vacina contra NE (alfa-toxina) em cultura de células em suspensão de planta para uso comercial no controle de NE na indústria de aves de criação. Foi gerada um constructo binária de planta pa-
20 ra expressar uma forma não ativa da α -toxina (os sítios de fosfolipase de ligação de zinco foram mutados por meio de 3 substituições únicas de aminoácido) em um esforço para determinar se a proteína gerada por plantas poderia produzir uma resposta imunológica à toxina mutada. A sequência de nucleotídeos também foi reprojeta para utilizar códons para expressão
25 otimizada, de preferência, em células de plantas de arroz e/ou tabaco.

Foi obtida nesses sistemas de plantas, com sucesso, a expressão. Embora os testes clínicos de antígenos produzidos por plantas não tenham gerado inicialmente indicações de eficácia, formulações de liberação específica e semelhantes poderiam ser otimizados para solucionar essas
30 questões.

Uma planta, célula de planta "transgênica", e semelhantes, é definida como uma planta inteira, uma célula de planta, uma cultura de célu-

las de plantas, linhagem de células de plantas, cultura de tecido de planta, planta inferior, cultura de células de plantas monocotiledôneas, cultura de células de plantas dicotiledôneas, ou prole destas derivada de uma célula de planta transformada ou protoplasto que contém DNA estranho, introduzido por técnicas laboratoriais, que não está presente originalmente em uma célula de planta nativa não transgênica da mesma espécie. Os termos "planta transgênica" e "planta transformada" foram usados algumas vezes na técnica como termos sinônimos para definir uma planta cujo DNA contém uma molécula de DNA exógeno. Uma planta transgênica pode ser transformada de forma estável para conter DNA estranho que funciona e é incorporado no DNA genômico da planta, ou é uma planta transgênica que foi transformada por vetores de base viral e que expressou transitoriamente o DNA estranho.

Para a prática da presente invenção, pode ser preferível transformar linhagens de células de plantas que possam ser cultivadas e escalonadas rapidamente. O uso de culturas de células de plantas evita a produção em campo aberto e reduz acentuadamente as probabilidades de escape de gene e contaminação de alimentos. Culturas de células de tabaco em suspensão como, por exemplo, NT-1 e BY-2 (Kato *e cols.* 1972, "Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today" 689-695; An, G., 1985 *Plant Physiol.* 79, 568-570; Nagata *e cols.* 1992, "International Review of Cytology" 132, 1-30.), são algumas das modalidades preferidas, pois essas linhagens são particularmente suscetíveis à manipulação em cultura, são prontamente transformadas, produzem eventos integrados de forma estável, e são passíveis de criopreservação.

Dessa forma, a linhagem de células de tabaco em suspensão, NT-1, é adequada à prática da presente invenção. As células NT-1 foram desenvolvidas originalmente a partir de *Nicotiana tabacum* L.cv. *bright yellow* 2. A linhagem de células NT-1 é amplamente usada e facilmente disponível; no entanto, praticamente qualquer linhagem de células em suspensão (de tabaco ou de outro tipo) pode ser usada para a prática da invenção. Além disso, a linhagem de células é variável e irá se alterar em resposta às condições de cultura. Células NT-1 adequadas ao uso estão disponíveis pela "A-

merican Type Culture Collection" sob número de acesso ATCC N^o 74840. Veja também a Patente U.S. N^o 6.140.075.

Culturas de células de plantas para a produção das vacinas em questão podem conter linhagens de células de plantas transformadas derivadas de uma planta inferior, uma planta dicotiledônea, ou uma planta monocotiledônea. Exemplos não-limitantes de plantas dicotiledôneas das quais as linhagens de células transformadas podem ser derivadas são tomate, batata, batata doce, mandioca, legumes, incluindo alface e soja, cenoura, morango, alface, carvalho, bordo, noz, rosa, hortelã, girassol, açafrão, algodão, tabaco, abóbora, margarida, canola ou cacto. Algumas linhagens preferidas incluem linhagens de células de tabaco como, por exemplo, NT-1 ou BY-2. Quando a linhagem de células de plantas transformadas for derivada de uma planta monocotiledônea, poderão ser utilizadas plantas como trigo, grama, gramados, cereal, milho, arroz, aveia, trigo, cevada, sorgo, orquídea, íris, lírio, cebola, banana, cana de açúcar, sorgo ou palmeira para estabelecer a linhagem de células de plantas. Adicionalmente, podem ser estabelecidas linhagens de células a partir de plantas inferiores como, por exemplo, samambaias, gimnospermas, coníferas, cavalinhas, "*club mosses*", "*liver warts*", "*hornworts*", musgos, algas vermelhas, algas marrons, gametófitos, esporófitos de pteridófitos ou algas vermelhas. Algumas culturas de células de plantas preferidas podem ser derivadas de plantas de milho, arroz ou tabaco.

O constructo de cassetes gênicos para a transformação de plantas ou de culturas de células de plantas transformadas pode ser facilmente obtida pela utilização de métodos bem conhecidos, tais como aqueles revelados em Sambrook e *co/s.* (1989); e Ausubel e *co/s.*, (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley e Sons, Nova York, NY.

Após a preparação de uma linhagem de células de plantas transformadas de forma estável, as culturas podem ser finalizadas por confirmação da inserção gênica (evento genético) com o uso de amplificação por PCR da inserção gênica inteira, seguida por digestão com enzima de restrição. Os meios para as placas de ágar e culturas de suspensão podem se

basear em meios comuns de cultura de plantas (Murashige e Skoog; MS).

Dessa forma, a presente invenção inclui culturas de células de plantas e métodos de cultivo e armazenamento de células de plantas para a produção de vacinas para NE. Outros aspectos da invenção fornecem um sistema de produção de vacina produzida por célula de planta.

O termo "aves de criação" é aqui definido como qualquer ave domesticada mantida para a produção de ovos ou carne, especialmente galinha, peru e avestruz.

Os termos "isolado" e "purificado" sugerem a "mão do homem", e podem se aplicar aos polinucleotídeos e às proteínas. Um polinucleotídeo clonado é um polinucleotídeo isolado, por exemplo.

Uma vacina é uma composição usada para vacinar um animal, que contém pelo menos um agente proteínáceo que induz a estimulação do sistema imunológico do hospedeiro e evita ou atenua a patologia indesejada subsequente associada às reações do hospedeiro às exposições subsequentes do patógeno.

Um organismo patogênico é uma bactéria, um vírus, um fungo ou protozoário que causa uma doença ou uma condição fisiológica induzida/controlada em um animal ou hospedeiro o qual infectou.

Um adjuvante é uma substância que acentua, aumenta, modera ou intensifica a resposta imunológica a um imunógeno ou antígeno. Adjuvantes tipicamente intensificam tanto a resposta imunológica humoral quanto a resposta imunológica celular, mas uma resposta aumentada de um tipo na ausência do outro também define um adjuvante. Além disso, adjuvantes e seus usos são bem conhecidos pelos imunologistas, e são tipicamente empregados para intensificar a resposta imunológica quando as doses de imunógeno são limitadas, quando o imunógeno é fracamente imunogênico ou quando a via de administração é subótima. Dessa forma, o termo "quantidade de adjuvante" é aquela quantidade de adjuvante capaz de intensificar a resposta imunológica a certo imunógeno ou antígeno. A massa que equivale a uma "quantidade de adjuvante" irá variar, e depende de diversos fatores que incluem, sem limitação, as características do imunógeno, a quantidade

de imunógeno administrada, a espécie do hospedeiro, a via de administração e o protocolo para administração do imunógeno. A "quantidade de adjuvante" pode ser facilmente quantificada por experimentação de rotina, considerando certo conjunto de circunstâncias específico. Isso faz parte dos conhecimentos daqueles versados na técnica e tipicamente utiliza determinações rotineiras de dose-resposta às quantidades variáveis administradas de imunógeno e de adjuvante. As respostas são medidas por determinação das titulações séricas de anticorpo ou de respostas mediadas por células despertadas contra o imunógeno com a utilização de ensaios imunoabsorventes ligados à enzima, radioimunoensaios, ensaios de hemaglutinação e semelhantes.

Uma "dosagem eficaz" é uma quantidade necessária para induzir uma resposta imunológica em um animal suficiente para que o animal efetivamente resista a um ataque montado por um agente patogênico. As dosagens administradas a esse animal serão determinadas por um médico, veterinário ou cientista treinado à luz das circunstâncias relevantes, que incluem a partícula imunoprotetora específica ou combinação de partículas, a condição e o tamanho do animal, e a via de administração escolhida. Algumas dosagens eficazes serão apresentadas nos Exemplos abaixo.

Os polinucleotídeos da presente invenção podem ser modificados para que tenham uso de códons que seja otimizado para expressão em vários sistemas heterólogos. Essas técnicas são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. 6.013.523 e 6.015.891. O gene de Mcpa aqui revelado foi códon-otimizado para expressão em cultura de células de plantas de tabaco ou arroz. Surpreendentemente, a mesma sequência de nucleotídeos resultou em um rendimento elevado em *E. coli* e *P. fluorescens*. *P. fluorescens* é o sistema de expressão preferido para recuperação de antígeno de Mcpa solúvel.

A presente invenção também inclui sequências de DNA que possuem homologia de sequência substancial com as sequências descritas que codificam antígenos imunoprotetores. Como usado no presente pedido, o termo "homologia de sequência substancial" é usado para indicar que uma

sequência de nucleotídeos (no caso de DNA ou RNA) ou uma sequência de aminoácidos (no caso de uma proteína ou polipeptídeo) exibe equivalência funcional ou estrutural substancial com outra sequência de nucleotídeos ou aminoácidos. Quaisquer diferenças funcionais ou estruturais entre sequências que possuem homologia, identidade ou similaridade de sequência substancial serão mínimas; ou seja, elas não afetarão a habilidade da sequência para funcionar como indicado no presente pedido. Sequências que possuem homologia de sequência substancial com as sequências aqui reveladas são normalmente variantes da sequência revelada, por exemplo, mutações, mas também podem ser sequências sintéticas.

Modalidades da presente invenção podem incluir variantes que possuem 90, 91, 92, 93 e 94% de identidade e, mais preferivelmente, aquelas que possuem 95, 96, 97, 98 e 99% de identidade com uma sequência exemplificada, e que funcionam como equivalentes substanciais. Essas alterações, incluindo alterações conservadoras e/ou, em alguns casos, não conservadoras, ocorrem em partes dessas sequências que não são críticas para a funcionalidade. Técnicas exemplares para a modificação de sequências de oligonucleotídeos incluem a utilização de mutagênese sítio-dirigida mediada por polinucleotídeos, e são descritas, por exemplo, em Zoller *e cols.* (1984); Higuchi *e cols.* (1988); Ho *e cols.* (1989); Horton *e cols.* (1989); e "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", (ed.) Erlich (1989).

O uso de metodologias de engenharia genética é bem conhecido na técnica. A reconstrução apropriada do gene e o seu posicionamento adequado em um vetor de plasmídeo hospedeiro entre um promotor, possivelmente um promotor regulado forte e finalizadores de transcrição/tradução podem obter a expressão da Mcpa em um hospedeiro estranho em particular. A adequabilidade de qualquer hospedeiro desse tipo também pode ser testada por meios conhecidos por aqueles versados na técnica.

Após as células microbianas transformadas (preferivelmente *Pseudomonas fluorescens*) terem expressado a Mcpa até um nível desejado (geralmente um nível elevado), as células podem ser coletadas, lisadas, pu-

rificadas e formuladas com adjuvante. Nesse aspecto da invenção, são preparadas composições que contêm proteínas recombinantes purificadas, que podem ser administradas em quantidades suficientes para induzir um efeito biológico desejado.

5 A presente invenção fornece composições de Mcpa ativa, incluindo aquelas nas quais a Mcpa foi produzida em sistemas microbianos. As células da presente invenção podem ser liberadas por meio de administração oral, nasal, ocular ou por injeção parental. Esses métodos de inoculação também podem ser usados para o tratamento de animais que não são aves.

10 Os métodos da presente invenção também podem ser usados para abreviar a NE. Essas vacinas podem ser intensificadas por um adjuvante e/ou acelerador da resposta imunológica por meio da administração da proteína recombinante purificada e do adjuvante em quantidades suficientes para induzir um efeito biológico desejado.

15 Células microbianas adequadas para uso na presente invenção incluem procariotas (organismos tanto Gram-positivos quanto Gram-negativos) e eucariotas inferiores, por exemplo, fungos. As espécies de células bacterianas adequadas na presente invenção incluem aquelas dos gêneros: 1) *Enterobacteriaceae*, incluindo as espécies dos gêneros *Escherichia*,

20 *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* e *Proteus*; 2) *Bacillaceae*; 3) *Rhizobiaceae*, por exemplo, *Rhizobium*; 4) *Spirillaceae*, por exemplo, fotobactérias, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; 6) *Lactobacillaceae*; 7) *Pseudomonadaceae*, por exemplo, *Pseudomonas* e *Acetobacter*; 8) *Azotobacteraceae* e *Nitrobacteraceae*. Outros organismos adequados incluem eucariotas inferiores, fungos (por exemplo, *Phycomycetes* e *Ascomycetes*), leveduras (por exemplo, *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*), levedura *Basidiomycetes* (por exemplo, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*), e semelhantes.

30 O hospedeiro celular que contém um ou mais genes heterólogos pode crescer em qualquer meio nutriente conveniente, no qual o constructo de DNA forneça uma vantagem seletiva (por exemplo, crescimento em um meio seletivo contendo antibióticos), pelo fornecimento de um meio seletivo

de tal forma que substancialmente todas as células retenham o(s) gene(s) heterólogo(s). Essas células podem então ser coletadas de acordo com formas convencionais.

Podem ser usadas vários constructos, o que inclui sistemas de replicação de plasmídeos, vírus ou centrômeros em combinação com segmentos replicantes autônomos (ars) para manutenção estável. Quando se deseja somente integração, podem ser usadas construções que possam permitir a replicação, e sejam transposons ou possuam atividade de inserção semelhante a transposon ou apresentem homologia com o genoma do hospedeiro. Frequentemente são empregadas sequências de DNA que possuem o gene heterólogo entre sequências que são homólogas às sequências no genoma do hospedeiro, cromossômica ou de plasmídeo. O(s) gene(s) heterólogo(s) pode estar presente em múltiplas cópias. Veja, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.399.216. Dessa forma, podem ser empregadas conjugação, transdução, transfecção e transformação para introdução do gene heterólogo.

Em modalidades nas quais é empregado um elemento extracromossômico, o constructo de DNA desejavelmente incluirá um marcador que permite uma seleção daquelas células hospedeiras que contêm o constructo. O marcador é comumente um que forneça resistência a biocidas, por exemplo, resistência a antibiótico ou resistência a metal pesado, complementação que permita prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, ou semelhante. Os sistemas de replicação podem fornecer propriedades especiais, por exemplo, replicação "*runaway*", podem envolver células COS ou outros recursos especiais.

Gene(s) heterólogo(s), que possuem sinais reguladores da iniciação e terminação da transcrição e da tradução reconhecidos pela célula hospedeira, podem ser empregados em conjunto com o gene heterólogo. A sequência de DNA pode ser manipulada de tal forma que seja fornecida uma sequência reguladora de iniciação da transcrição que seja diferente daquela natural.

Existe uma ampla variedade sequências de iniciação da trans-

criação para uma ampla variedade de hospedeiros. A sequência pode permitir a expressão constitutiva do gene de Mcpa ou a expressão regulada, em que a regulação pode ser indutível por uma substância química, por exemplo, um metabólito, por temperatura ou por um repressor regulável. Veja, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.374.927. A escolha específica do promotor dependerá de diversos fatores, da potência do promotor, da interferência do promotor com a viabilidade das células, do efeito dos mecanismos reguladores endógenos à célula sobre o promotor, e semelhantes. Há diversos promotores disponíveis por várias fontes, incluindo fontes comerciais.

Vetores adequados à expressão da Mcpa são conhecidos por aqueles versados na técnica. Da mesma forma, genes heterólogos que codificam cpas nativos são conhecidos por aqueles versados na técnica. Sequências de polipeptídeos e sequências codificadoras podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo várias bases de dados de patentes e outras bases de dados disponíveis publicamente (por exemplo, as bases de dados de ácidos nucléicos e de proteínas encontradas na "National Library of Medicine" ou no "European Molecular Biology Laboratory"). Em alguns aspectos da presente invenção, as células microbianas são manipuladas para expressar várias combinações de cpas.

A presente invenção fornece métodos de indução e/ou aceleração de uma resposta imunológica em um indivíduo que compreendem as etapas de administração a uma ave de criação de uma composição que compreende Mcpa purificada e uma ou mais moléculas adjuvantes em uma quantidade eficaz para despertar uma resposta imunológica no referido animal.

A presente invenção fornece métodos para a estimulação e/ou modulação do sistema imunológico de uma ave de criação em que o referido método compreende a administração de uma composição que contém proteína de Mcpa expressa de acordo com os ensinamentos da presente invenção.

Em outras modalidades, a presente invenção inclui composições que contêm uma (pelo menos uma) nova Mcpa da presente invenção, que

modulam um efeito biológico desejado. Essas composições são administradas em quantidades eficazes para estimular, modular, afetar ou produzir um efeito biológico desejado (por exemplo, resistência bacteriana).

O efeito biológico desejado pode ser selecionado, por exemplo, do grupo que consiste em: 1) ativação ou estimulação de macrófagos em um indivíduo; 2) estimulação ou modulação do sistema imunológico de um indivíduo; e 3) aumento da resistência bacteriana em um indivíduo.

Dessa forma, a presente invenção fornece diversas modalidades e aspectos não-limitantes que incluem:

10 - Vacina que compreende proteína derivada de um ou mais genes heterólogos que codificam um antígeno protetor modificado contra uma alfa-toxina de *C. perfringens* (Mcpa);

 - a referida vacina, em que os genes heterólogos estão contidos em um único vetor;

15 - a referida vacina, em que os genes heterólogos estão contidos em vários vetores;

 - a referida vacina, em que a célula microbiana é de organismos Gram-positivos, Gram-negativos ou de um eucariota inferior, por exemplo, fungos;

20 - a referida vacina, em que o sistema de expressão microbiano é *Pseudomonas fluorescens*.

A presente invenção também inclui um método de indução e/ou aceleração de uma resposta imunológica em uma ave de criação individual, incluindo um indivíduo em diversas aves de criação, a um antígeno ou imu-

25 nógeno, que compreende as etapas de administração, ao referido indivíduo:

 - uma vacina que compreende um ou mais genes heterólogos que codificam uma Mcpa;

 - e, opcionalmente, um lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo, em uma quantidade eficaz para despertar uma resposta imunológica.

30 Modalidades adicionais da presente invenção podem ser usadas para evitar NE em aves de criação (por exemplo, galinhas), incluindo a proteção de galinhas recém-nascidas, adolescentes e adultas do surgimento da

referida doença ou sintomas da doença.

As composições da presente invenção podem ser administradas por via oral, parenteral, como sprays (incluindo sprays de inalação), por via tópica, retal, nasal, bucal, vaginal ou por meio de um reservatório implantado. O termo "parenteral", como aqui usado, inclui injeção subcutânea, intradérmica, intravenosa, intra-atrial, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intra-esternal ou intracraniana, e outras técnicas de infusão. As composições podem ser formuladas em qualquer veículo adequado, incluindo, por exemplo, veículos descritos em E.W. Martin's "Remington's Pharmaceutical Science", Mack Publishing Company, Easton, PA.

Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios e publicações aqui referidas ou citadas são incorporadas por referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, na medida em que não sejam inconsistentes com os ensinamentos explícitos desta especificação.

A seguir, serão apresentados exemplos que ilustram procedimentos para a prática da invenção. Esses exemplos não devem ser considerados como limitantes. Todas as percentagens são por peso, e todas as proporções de misturas solventes são por peso, a menos que observado de forma diferente.

Abreviações usadas: SDS-PAGE, dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida; dl, deionizada; DTT, ditioneitol; TRIS, cloridrato de tris(hidroximetil) aminometano; MWCO, valor de corte do peso molecular; bp, pares de base; TAE, Tris Acetato EDTA, MSG, glutamato monossódico; CV, volume de coluna; PBS, solução salina tamponada com fosfato

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE UM GENE DE ALFA-TOXINA DE COMPRIMENTO TOTAL (cpa) DE ISOLADOS DE C. PERFRINGENS DERIVADOS DE GALINHAS

Este exemplo descreve o isolamento e determinação da sequência de base de fragmentos de DNA que contêm porções superpostas de

um gene que codifica uma proteína de alfa-toxina (cpa) de duas cepas de *Clostridium perfringens*. Essas cepas (BBL1 e BBL2) foram isoladas em Benchmark BioLabs (Lincoln, Nebraska) do intestino de galinhas diagnosticadas com enterite necrótica de ocorrência natural. Os dois isolados vieram de aves diferentes do mesmo rebanho e tinham características diferentes quando crescidos em laboratório (por exemplo, diferiam na quantidade de cpa que secretaram nos filtrados da cultura).

DNA genômico foi preparado a partir de células de BBL1 e BBL2 e usado como o modelo para reações em cadeia de polimerase (PCR) para amplificar fragmentos superpostos dos genes de cpa. Foram projetadas sequências iniciadoras pelas sequências de DNA dos genes de cpa altamente conservados de isolados humanos de *C. perfringens* (Números de Acesso no GenBank CLOPLC, CLOPLCO5 e NC 003366). Foram escolhidos pares de iniciadores para amplificar fragmentos superpostos que juntos continham a sequência de DNA de toda a região codificadora proteína de cpa e uma pequena quantidade de sequências flanqueadoras 5' e 3'. O Par de Iniciadores Um consistiu no Iniciador Direto (*forward*) PLC 5'ES (5'- GGTATAATTT-CAGTGCAAGTGTTAATCGTTATC-3') e no Iniciador Reverso PLC INTR1 (5'-CCATCCTTTGTTTTGATTCCAAAATAC-3') e produziu um produto de amplificação de 1.019 pares de base. O Par de Iniciadores Dois consistiu no Iniciador Direto PLC INTF1 (5'- GAAAATTTTCAGCATTAGCTAGATATGATGG-3') e no Iniciador Reverso PLC 3'R (5'- AGCTTTTATTTTGTAATACCACCAAACC-3') e produziu um produto de amplificação de 869 pares de base. Os dois produtos de amplificação eram superpostos em 558 pares de base. As reações de PCR continham (volume final de 25 µl) 214 ng (BBL1) ou 275 ng (BBL2) de modelo de DNA, 50 pmol de cada um dos Iniciadores Diretos e Reversos apropriados, 1 X Tampão D FailSafe® (Epicentre®, Madison, Wisconsin), e 1,25 unidades de Mistura de Enzima FailSafe®. A amplificação ocorreu durante 20 ciclos de: 96°, 30 seg; 45°, 30 seg; 72°, 30 seg; seguida por extensão por 10 minutos a 72°. Os produtos de PCR foram clonados no vetor TOPO TA 2.1 de acordo com as instruções do fornecedor (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) e transformados por métodos padronizados

em células Top10 de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Invitrogen). Os tamanhos da inserção de plasmídeos recombinantes preparados de colônias individuais foram analisados por digestão com enzima de restrição, e foram preparados plasmídeos de clones que possuem os tamanhos adequados para análise de sequência de DNA. As sequências de DNA das inserções de um clone de cada produto de amplificação de cada cepa foram determinadas por "Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Master Mix", de acordo com as recomendações do fornecedor (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Califórnia). As sequências superpostas de cada cepa foram montadas em uma única sequência de DNA que contém um quadro de leitura aberta (ORF) não interrompido que codifica uma proteína de alfa-toxina (cpa). A comparação das sequências de DNA dos ORFs de cpa de BBL1 e BBL2 mostrou que elas eram idênticas (**ID. DE SEQ. Nº: 1**) e, dessa forma, codificavam proteínas idênticas (**ID. DE SEQ. Nº: 2**). A proteína de pró-toxina alfa de 398 aminoácidos dessas cepas de BBL constitui uma nova classe (Tipo VI) de alfa-toxinas de galinha, como resumido na **Tabela 1**. A **Tabela 1** mostra os resíduos de aminoácidos (AA) presentes nas posições variantes das proteínas de alfa-toxina; todos os aminoácidos são idênticos nas 7 proteínas examinadas.

De acordo com os resultados de estudos de proteínas de alfa-toxina de outros isolados de *C. perfringens*, é previsto que os primeiros 28 resíduos de aminoácidos do **ID. DE SEQ. Nº: 2** constituem um peptídeo sinalizador de secreção que é removido durante a secreção da pró-toxina pela célula bacteriana, e que a alfa-toxina madura compreende os aminoácidos 29-398 do **ID. DE SEQ. Nº: 2** (370 aminoácidos).

EXEMPLO 2

PROJETO E SÍNTESE DE UM GENE MUTADO DE ALFA-TOXINA (Mcpa) DE COMPRIMENTO TOTAL GENE PARA EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE PLANTA

Otimização de sequências para expressão em plantas. Para se obter alta expressão de genes heterólogos em plantas, pode ser preferível remodelar os referidos genes de forma que eles sejam expressos mais efici-

entamente em células de plantas. Arroz e tabaco são duas dessas plantas nas quais pode ser preferível remodelar o(s) gene(s) heterólogo(s), antes da transformação para aumentar o nível de expressão (ou seja, produzir mais proteína) em uma célula de planta transgênica. Portanto, uma etapa no projeto de genes que codificam uma alfa-toxina bacteriana para expressão em plantas (ou seja, além do fornecimento de elementos promotores de gene de planta, íntrons, regiões não traduzidas 3' etc.) é a remodelação de uma região codificadora de proteína do gene heterólogo para expressão ótima.

Um motivo para a remodelagem de uma sequência codificadora de alfa-toxina bacteriana para expressão em células de plantas é por causa do teor não ótimo de G + C do gene nativo. Por exemplo, o teor de G + C muito baixo de muitos genes bacterianos nativos (e consequente desvio em direção ao alto teor de A + T) resulta na geração de sequências que mimetizam ou duplicam sequências de controle de gene de planta são sabidamente altamente ricas em A + T. A presença de algumas sequências ricas em A + T dentro do DNA codificador de proteína de genes introduzidos em plantas (por exemplo, regiões TATA box normalmente encontradas em promotores de gene de planta) pode resultar na transcrição aberrante dos genes. Por outro lado, a presença de outras sequências reguladoras que residem no mRNA transcrito (por exemplo, sequências sinalizadoras de poliadenilação (AAUAAA), ou sequências complementares aos pequenos RNAs nucleares envolvidos no *splicing* pré-mRNA), pode levar à instabilidade do RNA. A análise intensa dos 1.197 pares de base (bp) da sequência de DNA da região codificadora nativa da alfa-toxina de *C. perfringens* aqui revelada como **ID. DE SEQ. Nº: 1** revelou a presença de vários motivos de sequência que supostamente são prejudiciais à expressão de planta ótima, além de uma composição de códon não ótima. Dessa forma, um objetivo no design dos genes de planta otimizados que codificam uma alfa-toxina bacteriana é a geração de uma sequência de DNA que tenha natureza mais "próxima de planta", e na qual as modificações da sequência não prejudiquem a tradução ou criem instabilidade do mRNA.

Existem várias bases de dados de sequências de DNA disponí-

veis publicamente nas quais é possível encontrar informações sobre os teores de G + C de genomas de planta ou de regiões codificadoras de proteína de vários genes de planta. Uma dessas bases de dados está localizada no endereço da Internet (URL) <http://vwww.kazusa.or.jp/codon/>. Nessa página

5 da Internet, pode-se verificar que o teor de G + C médio de sequências codificadoras de proteína do tabaco (*Nicotiana tabacum*) é de 43,3% (análise de 1.268 sequências que compreendem 453.797 códons). Pode-se também verificar que o teor de G + C médio de sequências codificadoras de proteína do arroz (*Oryza sativa* cultivar japônica) é de 55% (análise de 32.630 sequências que compreendem 12.783.238 códons). Em comparação, o teor de

10 G + C da sequência codificadora da proteína de alfa-toxina de *C. perfringens* revelada no **ID. DE SEQ. Nº: 1** é de 33,3%. Dessa forma, pode ser vantajoso quando se projeta um gene de alfa-toxina para expressão em células de arroz ou tabaco elevar o teor de G + C da região codificadora de proteína até

15 uma faixa de 40-55%. Portanto, um objetivo no projeto de genes que codificam uma toxina bacteriana para expressão de planta, mais preferivelmente denominado genes de plantas otimizados, é a geração de uma sequência de DNA que possua um teor de G + C preferivelmente próximo àquele dos genes de planta nativos do hospedeiro que codificam enzimas metabólicas.

20 Em função da plasticidade gerada pela redundância/degeneração do código genético (ou seja, alguns aminoácidos são especificados por mais de um códon), a evolução dos genomas em diferentes organismos ou classes de organismos resultou no uso diferencial de códons sinônimos. Essa "preferência de códons" é refletida na composição de base média de re-

25 giões codificadoras de proteína. Por exemplo, organismos que possuem genomas com teores relativamente baixos de G + C utilizam mais códons que possuem A ou T na terceira posição de códons sinônimos, enquanto aqueles que possuem teores de G + C mais elevados utilizam mais códons que possuem G ou C na terceira posição. Por exemplo, verificou-se que em regiões

30 codificadoras do tabaco, G ou C é encontrado como a terceira base de 39,84% dos códons, enquanto em regiões codificadoras de arroz, G ou C é encontrado como a terceira letra de 61,29% dos códons. Além disso, acredi-

ta-se que a presença de códons "menores" dentro de um mRNA possa reduzir a taxa de tradução absoluta daquele mRNA, especialmente quando a abundância relativa do tRNA carregado que corresponde ao códon menor é baixa. Uma extensão desse raciocínio é que a diminuição da taxa de tradução por códons menores individuais seria pelo menos aditiva para múltiplos códons menores. Portanto, mRNAs que possuem teores relativos elevados de códons menores teriam, de forma correspondente, taxas baixas de tradução. Essa taxa se refletiria por níveis correspondentemente baixos da proteína codificada.

No projeto de genes que codificam uma alfa-toxina bacteriana para expressão em arroz ou tabaco (ou outras plantas como, por exemplo, milho, algodão ou soja), seria útil se a preferência de códons das prováveis plantas hospedeiras fosse determinada. A preferência de códons é a distribuição estatística de códons que a planta utiliza para a codificação dos aminoácidos de suas proteínas, e os usos de códons preferidos para arroz e tabaco são mostrados na **Tabela 2**. A preferência de códons pode ser calculada como a frequência na qual um único códon é usado em relação aos códons para todos os aminoácidos. Alternativamente, a preferência de códons pode ser calculada como a frequência na qual um único códon é usado para codificar um aminoácido em particular, em relação a todos os outros códons para aquele aminoácido (códons sinônimos). No projeto de regiões codificadoras para expressão em plantas de alfa-toxinas bacterianas, devem ser determinados os códons primários ("primeira escolha") preferidos pela planta, assim como a segunda, terceira, quarta etc. escolhas de códons preferidos, quando existirem múltiplas escolhas. Pode então ser projetada uma nova sequência de DNA que codifica a sequência de aminoácidos da alfa-toxina bacteriana, mas a nova sequência de DNA difere da sequência de DNA bacteriana nativa (que codifica a toxina) pela substituição de códons de planta (primeiro preferido, segundo preferido, terceiro preferido ou quarto preferido etc.) para especificar o aminoácido em cada posição dentro da sequência de aminoácidos da toxina. A nova sequência é então analisada quanto aos sítios de enzima de restrição que podem ter sido criados pelas

modificações. Os sítios identificados são ainda modificados por substituição dos códons por códons preferidos de primeira, segunda, terceira ou quarta escolha. Outros sítios na sequência que poderiam afetar a transcrição ou tradução do gene de interesse são as junções éxon:íntron (5' ou 3'), sinais de adição poli A ou sinais de terminação de RNA polimerase. A sequência é ainda analisada e modificada para reduzir a frequência de dupletos TA ou GC. Além dos dupletos, blocos de sequência G ou C que possuem mais do que cerca de seis resíduos que sejam iguais podem afetar a transcrição ou tradução da sequência. Portanto, esses blocos são vantajosamente modificados por substituição dos códons de primeira ou segunda escolha etc. pelo códon de escolha preferido seguinte.

O método descrito acima permite que aqueles versados na técnica modifiquem gene(s) que são estranhos para uma planta em particular de tal forma que os genes sejam expressos otimamente em plantas. O método é ainda ilustrado no pedido PCT WO 97/13402. Dessa forma, os genes sintéticos que são funcionalmente equivalentes às toxinas/genes da presente invenção podem ser usados para transformar hospedeiros, incluindo plantas. Diretrizes adicionais em relação à produção de genes sintéticos podem ser encontradas, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.380.831.

Para o projeto de um gene de planta otimizado que codifica uma alfa-toxina bacteriana, foi projetada uma sequência de DNA para codificar a sequência de aminoácidos da toxina da proteína, utilizando um código genético redundante estabelecido a partir de uma tabela de preferência de códons compilada a partir das sequências codificadoras de proteína para as plantas hospedeiras em particular (arroz e tabaco). Na **Tabela 2**, as Colunas C, D, I e J apresentam as distribuições (em % de uso para todos os códons para aquele aminoácido) de códons sinônimos para cada aminoácido, como encontrado nas regiões codificadoras de genes de *Oryza sativa* (arroz) e *Nicotiana tabacum* (tabaco). Os códons mais preferidos por cada tipo de planta são indicados com fonte em negrito, e a segunda, terceira ou quarta escolhas de códons podem ser identificadas quando existirem múltiplas escolhas. É evidente que alguns códons sinônimos para alguns aminoácidos

só são encontrados raramente em genes de planta (por exemplo, TTA no arroz e GCG no tabaco). Além disso, plantas de arroz e tabaco diferem no uso de códons (por exemplo, o códon Alanina GCC ocorre mais frequentemente em genes de arroz do que em genes de tabaco, enquanto o códon Arginina AGA é usado mais frequentemente em genes de tabaco do que em genes de arroz). Dessa forma, é óbvio que uma região codificadora de proteína projetada para refletir a composição de códons ótima de genes de uma espécie de planta pode ter uma subcomposição de códons ótima para expressão em outra espécie de planta. Portanto, no processo de planejamento da criação de uma sequência de DNA codificadora de proteína que se aproxime de uma distribuição de códons média de genes tanto de arroz quanto de tabaco, foi excluído qualquer códon que não seja usado frequentemente em relação aos outros códons sinônimos para aquele aminoácido em qualquer tipo de planta (indicado por DNU nas Colunas F e L da **Tabela 2**). Normalmente, um códon era considerado como sendo usado raramente caso ele se apresentasse em cerca de 10% ou menos do tempo para codificar o aminoácido relevante em genes de qualquer um dos tipos de planta (indicado por NA nas Colunas E e K da **Tabela 2**). Para equilibrar a distribuição das escolhas de códons restantes para um aminoácido, foi calculada uma representação da Média Ponderada para cada códon, com o uso da fórmula:

$$\text{Média Ponderada \% de C1} = 1 / (\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{etc.}) \times \%C1 \times 100$$

em que C1 é o códon em questão e %C2, %C3 etc. representam as médias dos valores % para arroz e tabaco de códons sinônimos restantes (valores % médios para os códons relevantes são tomados das Colunas E e K) da **Tabela 2**.

O valor % da Média Ponderada para cada códon é apresentado nas Colunas F e L da **Tabela 2**.

Uma nova sequência de DNA que codifica essencialmente a sequência de aminoácidos da proteína de alfa-toxina de *C. perfringens* do **ID. DE SEQ. Nº: 2** foi projetada para expressão ótima em células tanto de arroz quanto de tabaco com o uso de uma distribuição de códons equilibrada de códons usados frequentemente em genes de arroz e de tabaco. Como men-

cionado acima, os primeiros 28 aminoácidos da sequência da pró-toxina descrita no **ID. DE SEQ. Nº: 2** compreendem um sinalizador de secreção peptídeo. Consequentemente, foi projetada uma sequência de DNA de planta otimizada (**ID. DE SEQ. Nº: 3**) para codificar apenas a porção da proteína madura do **ID. DE SEQ. Nº: 2** (aminoácidos 29-398), mas que havia sido modificada para conter três alterações de aminoácidos para remover a atividade enzimática de fosfolipase C, como discutido acima e descrito no **ID. DE SEQ. Nº: 4**. Essas alterações estão resumidas abaixo:

Ácido aspártico 84 da pró-toxina (resíduo 56 da proteína madura) mutado para Leucina

Histidina 176 da pró-toxina (resíduo 148 a proteína madura) mutada para Glicina

Ácido glutâmico 180 (resíduo 152 da proteína madura) mutado para Glicina

A nova sequência de DNA difere da sequência de DNA bacteriana nativa que codifica a proteína de alfa-toxina pela substituição de códons de planta (primeiro preferido, segundo preferido, terceiro preferido ou quarto preferido) para especificar o aminoácido apropriado em cada posição dentro da sequência de aminoácidos da proteína. O projeto da sequência de DNA de planta otimizada foi iniciado por tradução reversa da sequência de proteína do **ID. DE SEQ. Nº: 4** com o uso de uma tabela de preferência de códons equilibrada de arroz-tabaco construída a partir das Colunas F e L da **Tabela 2**. A sequência inicial foi então modificada por compensação de alterações de códons (mantendo-se a representação de códons média ponderada global) para remover ou adicionar sítios de reconhecimento de enzima de restrição, remover estruturas secundárias intrafita altamente estáveis e remover outras sequências que possam ser prejudiciais às manipulações de clonagem ou expressão do gene projetado em plantas.

A sequência de DNA foi então re-analisada quanto aos sítios de reconhecimento de enzima de restrição que possam ter sido criados pelas modificações. Os sítios identificados foram ainda modificados por substituição dos códons relevantes com códons preferidos de primeira, segunda,

terceira ou quarta escolha. Outros sítios na sequência que poderiam afetar a transcrição ou tradução do gene de interesse incluem as junções éxon:intron (5' ou 3'), sinais de adição poli A ou sinais de terminação de RNA polimerase. A sequência modificada foi ainda analisada e ainda modificada para reduzir a frequência de dupletos de TA ou CG, e para aumentar frequência de dupletos de TG ou CT. Além desses dupletos, blocos de sequência que possuem mais do que cerca de seis resíduos consecutivos de [G+C] ou [A+T] podem afetar a transcrição ou tradução da sequência. Portanto, esses blocos de sequência também foram modificados por substituição dos códons de primeira ou segunda escolha etc. por outros códons de escolha preferidos. Os códons raramente usados não são incluídos em um grau substancial no projeto do gene, sendo usados apenas quando necessário para acomodar um critério de projeto diferente da composição de códons por si (por exemplo, adição ou eliminação de sítios de reconhecimento de enzima de restrição).

A sequência de DNA resultante possui um grau mais elevado de diversidade de códons, uma composição de bases desejada, contém sítios de reconhecimento de enzima de restrição colocados estrategicamente, e não possui sequências que possam interferir com a transcrição do gene, ou com a tradução do mRNA do produto. A **Tabela 3** apresenta uma comparação das composições de códon das regiões codificadoras para a proteína madura de alfa-toxina, como encontradas no gene nativo e na versão de planta otimizada, e compara ambas com as recomendações de composição de códons para uma sequência de planta otimizada calculada a partir das Colunas F e L da **Tabela 2**.

Foram feitas outras modificações para a sequência de planta otimizada que codifica a alfa-toxina madura de *C. perfringens*. Uma dessas modificações foi a adição de uma sequência de DNA que codifica o peptídeo direcionado ao retículo endoplasmático (ER) derivado do gene de alfa zeína do milho (*Zea mays*) de 15 kDa (Número de Acesso no Genbank M72708). Essa sequência de DNA compreende 63 bases, e foi modificada da sequência de milho original por substituições de códon para tornar sua composição

mais compatível com a expressão em células de arroz e tabaco (como descrito acima) e pela adição de um códon OCT para Alanina imediatamente após o códon de partida ATG (Metionina). A adição desse códon GCT coloca o códon de partida da tradução ATG em um contexto de sequência que é favorável à iniciação da tradução em plantas. A sequência de DNA otimizada de arroz-tabaco para o peptídeo de direcionamento ao ER de zeína de 15 kDa é descrita como o **ID. DE SEQ. Nº: 5**, e o peptídeo codificado é descrito como **ID. DE SEQ. Nº: 6**. Quando a sequência de DNA do **ID. DE SEQ. Nº: 5** é colocada no início da sequência de DNA do **ID. DE SEQ. Nº: 3**, é criado um quadro de leitura de comprimento total de 1.239 bases que codifica uma proteína de fusão que compreende o peptídeo de direcionamento ao ER de zeína de 15 kDa ligado à proteína de alfa-toxina madura de *C. perfringens*. Quando esse quadro de leitura é introduzido em células de plantas como um gene funcional, a proteína traduzida a partir do mRNA será dirigida para dentro do lúmen do retículo endoplasmático. Sabe-se na técnica que após penetrarem no ER, as proteínas heterólogas são frequentemente secretadas pela célula. Sabe-se ainda que algumas sequências peptídicas pequenas, quando adicionadas ao terminal carboxi de proteínas dirigidas ao ER, podem inibir a secreção das proteínas assim modificadas pela célula. Na medida em que é um objetivo dessa invenção acumular níveis elevados da proteína de alfa-toxina mutada de *C. perfringens* em células de arroz e tabaco, uma modificação adicional ao DNA revelado no **ID. DE SEQ. Nº: 3** foi a adição de códons que codificam um peptídeo KDEL (Lisina-Ácido aspártico-Ácido glutâmico-Leucina) (conhecido por facilitar a retenção de proteínas dentro do ER) à extremidade 3' da sequência. Na prática, como a proteína de alfa-toxina madura de *C. perfringens* revelada no **ID. DE SEQ. Nº: 4** termina em Lisina, só foram adicionados ao **ID. DE SEQ. Nº: 3** códons que especificam DEL (ou seja, GATGAGCTT). A sequência de DNA de planta de comprimento total otimizada que codifica essa proteína de fusão é revelada no **ID. DE SEQ. Nº: 7**, e a proteína de fusão codificada é revelada no **ID. DE SEQ. Nº: 8**.

Após uma sequência de DNA de planta otimizada ter sido projetada no papel ou no computador, moléculas DNA reais podem ser sintetiza-

- das no laboratório para corresponder em sequência precisamente à sequência projetada. Essas moléculas de DNA sintético podem ser clonadas e de outras formas manipuladas exatamente como se fossem derivadas de fontes naturais ou nativas. A síntese de um fragmento de DNA que compreende o
- 5 **ID. DE SEQ. Nº: 7** foi realizada por um fornecedor comercial (PicoScript, Houston, TX USA). O DNA sintético foi então clonado em vetores de expressão e introduzido em cultura de células, como descrito nos Exemplos 3 e 4.

EXEMPLO 3

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE Mcpa 6X-HIS-TAGGED PARA ESTU- 10 DOS CLÍNICOS E VALIDAÇÃO DE ANTÍGENO

- Construção de vetor de expressão de *E. coli* para Mcpa Ses-
mento de 6 resíduos de histidina no C-terminal. O plasmídeo DAS28P7B2 foi
obtido de PicoScript (Houston, TX), e contém o gene de Mcpa sintetizado
otimizado de planta entre os sítios de restrição NcoI e SacI. O fragmento
- 15 NcoI/SacI foi clonado em pET-41a(+) (Novagen, Nº de Catálogo: 70556-3) e
usado para expressão em *E. coli*. Esse vetor gerou uma proteína truncada.
Um exame mais detalhado da sequência de DNA indicou que a sequência
de Mcpa não estava *in frame* com o OST do terminal N pET-41a(+), S e His-
tags. Para corrigir o quadro de leitura e para expressar Mcpa como uma fu-
- 20 são de OST do terminal N e His-*tag* do terminal C, foi usada a seguinte es-
tratégia.

- Um fragmento de DNA foi projetado e sintetizado de forma habi-
tual em PicoScript para gerar sequência contida em DASPICO19. DASPI-
CO19 do sítio SpeI de pET-41a(+) ao sítio site NcoI, não incluindo o ses-
- 25 mento de 6 resíduos de histidina no C-terminal (região entre o *tag* de GST
do terminal N e o sítio múltiplo de clonagem). Isso foi seguido por uma pe-
quena região vinculadora mais a sequência de DNA do sítio EcoRV ao sítio
SacI de DAS28P7B2. Esse fragmento sintético foi usado para desenvolver o
vetor de expressão para Mcpa, pDAB2448. As etapas de clonagem envolvi-
- 30 das no constructo de vetor de expressão de *E. coli* de Mcpa com 6X-*his-tag*
no terminal C, pDAB2448, estão ilustradas na **Figura 3**. Um fragmento E-
coRV/NcoI de 1,1 kb de DAS28P7B2 foi clonado em DASPICO19, para for-

mar pDAB2447. Um fragmento *SpeI*/*SacI* de pDAB2447 foi clonado em pET-41a(+) para criar pDAB2448.

Expressão de Mcpa com cauda de histidina no terminal C.
pDAB2448 foi introduzido na cepa BL21(DE3) de *E. coli*, e os transformantes de *E. coli* que expressam a proteína de Mcpa cresceram de um dia para o outro para se obter a sementeira. A cultura da sementeira foi inoculada em 50 ml de Caldo de Luria (LB) contendo 50 µg/ml de canamicina em frascos de 250 ml. A cultura foi desenvolvida até uma OD₆₀₀ de 0,5 a 1,0, e depois foi induzida com isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida (IPTG) 1 mM e incubada a 37°C. Foram então coletadas amostras da cultura de 2 ml para análise de proteína em 4 h e aproximadamente 24 h após a indução. As células foram então lisadas em 200 µl de tampão de amostra e 5 µl de cada amostra foram analisados em gel de SDS-PAGE. Os resultados mostraram que toda a proteína de Mcpa estava no pélete; isso foi confirmado por hibridização por *Western blot*. Tentativas para se obter expressão solúvel por modificação das condições de indução (ou seja, concentrações de IPTG, temperatura e tempo de indução) não tiveram qualquer impacto sobre a expressão de proteína solúvel.

Construção de vetor de expressão de *E. coli* para Mcpa 6X-his-tagged no terminal N. Foi testado o efeito de uma cauda de histidina (*His-tag*) no terminal N sobre a expressão solúvel de Mcpa. Foi feito um novo vetor de expressão por clonagem de um fragmento *BglIII*/*EcoRV* de pDAB2448 no constructo *out-of-frame* descrita previamente. Esse novo vetor de expressão foi designado pDAB2449 (**Figura 4**).

Expressão de Mcpa com cauda de histidina no terminal N.
pDAB2449 foi transformado em *E. coli* e a expressão de Mcpa induzida com uso de condições padronizadas, como descrito previamente. Novamente, os resultados mostraram Mcpa como uma proteína insolúvel. As condições de indução foram otimizadas variando-se a temperatura e as concentrações de IPTG para se obter expressão solúvel (variáveis testadas: 20°C e 37°C; 20, 100, 250, e 1.000 50 µM de IPTG; 4 horas e indução de um dia para o outro). Uma quantidade significativa de proteína solúvel foi obtida com culturas

desenvolvidas a 20°C e induzidas com 250 µM de IPTG de um dia para o outro, ou desenvolvidas a 37°C e induzidas com 50 µM IPTG por 4 horas. As culturas foram escalonadas sob ambas as condições, e a proteína foi purificada por cromatografia em glutathiona sefarose. O pélete de células de 1 litro de cultura foi lisado em PBS com 0,6 mg/ml de lisozima por 30 min em temperatura ambiente, seguido por sonificação por 4 x 30 seg em um sonificador de Branson. O extrato de células clarificado foi usado para purificar Mcpa com o uso de 10 ml de resina de glutathiona sefarose 4B (Amersham). A proteína purificada foi incubada em um tampão contendo 25 mM de Tris-HCl, pH 8, e 4 mM de CaCl₂ (New England Biolabs), com quantidades variáveis de ente-roquinase (EK) por tempos de incubação variáveis para clivar a cauda de UST (UST-tag) e liberar a proteína de Mcpa. A reação foi incubada em temperatura ambiente com agitação, e as amostras foram analisadas por SDS-PAGE. Tentativas de clivar a cauda de GST e reter a Mcpa de comprimento total não tiveram sucesso em função da sensibilidade da porção do terminal N de Mcpa à clivagem inespecífica de EK. Várias tentativas para otimizar as condições de clivagem produziram alfa-toxina truncada. Portanto, a proteína foi expressa em *Pseudomonas fluorescens* como uma proteína 6X-his-tagged sem cauda de GST.

20 Construção de plasmídeo de expressão de *Pseudomonas fluorescens* para Mcpa 6X-his-tagged. O gene de Mcpa (ID. DE SEQ. Nº: 9) foi amplificado por PCR a partir do vetor de expressão de *E.coli*, pDAB2449, que continha o gene de Mcpa de comprimento total como modelo de DNA, usando iniciadores de PCR diretos e reversos (Integrated DNA Technologies, Skokie, IL).

Iniciador direto: 5' aga gaa cta gta aaa agg aga aat cca tgc atc acc atc acc atc act ccg cgg 3'

Iniciador reverso: 5' aga gac tcg agc tat cat ttg ata ttg tag gtt gaa ttg c 3'

Um sítio de restrição SpeI foi introduzido 5' do sítio de ligação ribossômico otimizado com o uso do iniciador direto e um sítio XhoI foi introduzido abaixo do códon de parada de tradução com o uso do iniciador reverso. Isso permitiu a clonagem do gene de Mcpa em um vetor de expressão de

pf, resultando no constructo pDAB2454 (**Figura 5**). A ligação do gene de Mcpa sintetizado 6X-*his-tagged* no terminal N nos sítios *SpeI* e *XhoI* foi obtida de acordo com Sambrook e cols. (1989). A verificação do gene clonado foi feita com um sistema de análise de DNA Beckman Coulter CEQ 2000XL e analisada com o software Sequencher.

Expressão de Mcpa com cauda de histidina no terminal N em *P. fluorescens*. Células de *P. fluorescens* capazes de transformação foram preparadas por inoculação de 5 ml de LB com estoque em glicerol congelado de *P. fluorescens*, cepa MB324, obtida da coleção de culturas de Dow AgroSciences (DAS), e desenvolvida de um dia para o outro a 30°C, agitada a 300 rpm. No dia seguinte, 750 µl de cultura de um dia para o outro foram inoculados em 50 ml de LB contidos em um frasco de 250 ml. As células cresceram até uma OD₆₀₀ de 0,2-0,4. Após ter sido alcançada a densidade adequada, a amostra da cultura foi resfriada em gelo por 5-10 minutos, transferida para um tubo cônico de 50 ml, e centrifugada a 7.000 rpm por cinco minutos em uma centrífuga de chão Sorvall RC5C com utilização de um rotor GSA. As células peletizadas foram lavadas e ressuspensas três vezes com água deionizada estéril gelada, antes da suspensão final de células em 400 µl de água estéril. O DNA ligado foi precipitado com etanol até um volume de 10 µl. A alíquota de 10 µl de DNA ligado foi adicionada a 100 µl de suspensões de células lavadas em cadinhos de eletroporação de 0,2 cm, e submetidas à eletroporação com um BioRad GenePulser a 200 Ohms, 25 µF e 2,25 kV em constantes de tempo de 4,6 a 4,8. Permitiu-se que os transformantes se recuperassem por 2 horas a 30°C, 300 rpm, e depois eles foram plaqueados sobre placas de ágar LB contendo 30 µg/ml de tetraciclina. As placas foram incubadas a 30°C por 36-48 horas. Os transformantes foram avaliados e o constructo de expressão de *Pf* contendo Mcpa de comprimento total 6X-*his-tagged* no terminal N, pDAB2454, foi verificada por análise de enzima de restrição e sequenciamento das junções *SpeI* e *XhoI* com a utilização do sequenciador de Beckman e do software Sequencher. Estoques em glicerol de *Pt* que expressa Mcpa 6X-*his-tag* no terminal N foram feitos e armazenados a -80°C.

Crescimento e indução de *P. fluorescens* que expressa Mcpa 6X-his-tagged. Uma alíquota de 200 µl de estoque em glicerol foi inoculada em 50 ml de meio LB em frascos de 250 ml, suplementado com tetraciclina até uma concentração final de 30 µg/ml. As culturas foram incubadas em
5 uma máquina de agitação New Brunswick Innova a 30°C por aproximadamente 16 horas a 300 rpm. As culturas de semeadura de um dia para o outro foram então usadas para inocular 1 litro de meio de cultura (veja o Apêndice para os Exemplos 3 e 4) distribuído igualmente em cinco frascos de 1 litro (inóculo de 2% e 30 µg/ml de tetraciclina). Os frascos foram incubados em
10 uma máquina de agitação New Brunswick Innova a 300 rpm e 30°C por 24 horas, e depois foram induzidos com IPTG até uma concentração final de 0,3 mM. As culturas foram incubadas por mais 48 horas, antes da coleta.

Purificação de Mcpa 6X-his-tagged. Após indução e expressão de 1 litro de células de cultura de *Pf* recombinante contendo a proteína de
15 Mcpa 6X-his-tagged (**ID. DE SEQ. Nº: 10**), as células foram peletizadas por centrifugação da cultura a 7.500 rpm por 20 minutos, e foram transferidas para o recipiente de um *beadbeater* de 400 ml com 200 ml de glóbulos de vidro de 0,1 mm (BioSpec). O recipiente foi preenchido com tampão de fosfato (tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,3 M), e depois foram
20 adicionados 2 ml de coquetel de inibidor de protease Sigma para proteínas com cauda de histidina. O pélete de células foi lisado por agitação com os glóbulos 8 vezes por 1 minuto cada, separado por intervalos 1 minuto no gelo. Após o ciclo final de agitação com glóbulos, os glóbulos ficaram em repouso por 5 minutos no gelo, antes da decantação das células lisadas em
25 tubos de Falcon de 50 ml. As células lisadas foram então centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos para separar o lisado do pélete.

Uma coluna de gravidade contendo 20 ml de resina de metal imobilizado de cromatografia por afinidade TALON® (BD Biosciences) foi usada para purificar a proteína de Mcpa com cauda de histidina do lisado. A
30 resina foi equilibrada com 20 volumes de coluna de tampão de fosfato 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M, e o sobrenadante foi cuidadosamente passado através da coluna três vezes. O fluxo através da amostra foi coleta-

do e colocado no gelo. A coluna foi então lavada novamente com 20 volumes de coluna de tampão de equilíbrio, seguidos por 5 volumes de coluna de tampão de equilíbrio contendo imidazol 10 mM. O fluxo foi retido separadamente. Finalmente, 5 volumes de coluna de tampão de equilíbrio contendo imidazol 200 mM (tampão de eluição) foram usados para eluir a proteína de Mcpa 6X-*his-tagged* da resina. Foram feitas análises por SDS-PAGE (gel de Bis-Tris 10%, Invitrogen Corporation) e *Western blot* com o uso de 10 µl de cada fluxo: lavagem sem imidazol, lavagem com imidazol 10 mM e eluição com imidazol 200 mM, para confirmar a presença de Mcpa nas frações purificadas. A proteína purificada foi quantificada por análise de Bradford.

Liofilização de proteína. As proteínas foram dialisadas em um tampão contendo Tris-HCl 3 mM, pH 7,5. Elas foram então quantificadas com a utilização do ensaio de proteína baseado em Bradford PIERCE, e foi calculada a proteína total. Para isso, foi adicionada trehalose 0,5%, e a amostra foi liofilizada de um dia para o outro. O peso do pó liofilizado de proteína foi medido, e o percentual de pureza foi estimado após subtração do peso de tampão de Tris-HCl, trehalose e água residual. O rendimento da proteína purificada final foi > 80 mg.

EXEMPLO 4

20 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE Mcpa SEM CAUDA PARA ESTUDOS CLÍNICOS VALIDAÇÃO DE ANTÍGENO

Construção de plasmídeo de expressão de *Pseudomonas fluorescens* para Mcpa sem cauda de histidina. O gene de Mcpa foi amplificado a partir do constructo pDAB2454 (Exemplo 3) por uma reação de PCR que utiliza iniciadores designados com o software Vector NTI 8 para excluir a cauda de histidina, cauda de S e sítios de trombina.

Iniciador Direto: 5' aga gaa cta gta aaa agg aga aat cca tga gtt ggg atg gaa aga ttg atg gca ctg g 3'

Iniciador Reverso: 5 aga gac tcg agc tat cat ttg ata ttg tag gtt gaa ttg c 3'

30 Para fins de clonagem e expressão, os iniciadores incluíam um sítio de ligação de ribossomo mais os sítios de clonagem *SpeI* e *XhoI*. A reação de PCR foi realizada com o uso do Protocolo de PCR FailSafe de EPI-

CENTRE e com o sistema de PCR FailSafe (Nº de Catálogo: FS99060) com 2x Pré-mistura de PCR FailSafe (A, Nº de Catálogo: FSP995A) por 30 ciclos de PCR (94°C, 2 min.; 94°C, 1 min.; 52°C, 1 min.; 72°C, 1 min.; 4°C manter; Ciclador Térmico MJ Research DNA Engine DYAD Peltier). Os produtos de
 5 reação foram purificados a partir de um gel de agarose 1% após extração do gel de agarose QIAEXII (Nº de Catálogo: 20051), e digeridos com *SpeI* e *XhoI*. A verificação do produto de PCR foi feita com um sistema de análise de DNA Beckman Coulter CEQ 2000XL e analisado com o software Sequencher.

10 O produto de PCR foi ligado em um vetor TOPO® TA (pCR2.1) com o uso do Kit de Clonagem Invitrogen TOPO® TA (Nº de Catálogo: K4500-01), e depois transformado quimicamente em células competentes de *E. coli* (TOP10F', Nº de Catálogo: K4550-40). Os transformantes foram plaqueados sobre placas de ágar LB ampicilina (100 µg/ml) X-galactosidase, e
 15 incubados a 37°C por 24 horas (agitadora incubadora refrigerada New Brunswick Scientific Innova 4230). Os transformantes foram avaliados, e o novo vetor, pDAB3909, foi verificado por análise de enzima de restrição única, *BamHI* e *NotI*. Além disso, os clones positivos foram ainda verificados por sequenciamento das junções *SpeI* e *XhoI*, de acordo com o Protocolo de
 20 Sequenciamento de Beckman (Nº de Catálogo: 608120) com 45 ciclos (96°C, 2 min.; 96°C, 20 seg.; 50°C, 20 seg.; 60°C, 4 min.; 4°C, ∞; Gene Amp PCR System 9700) e analisados com Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corp.). A eletroforese em gel do DNA revelou que clones positivos continham o gene de *Mcpa* em aproximadamente 1,2 kb. Estoques em glicerol de
 25 pDAB3909 foram feitos e armazenados a -80°C.

O constructo do vetor de expressão de *Mcpa* sem cauda de histidina para *P. fluorescens* foi completada por clonagem do gene de *Mcpa* sem cauda de histidina (ID. DE SEQ. Nº: 11) por pDAB3909 no plasmídeo de expressão de *Pf* usado para se obter pDAB2454. O gene foi extraído de
 30 pDAB3909 e ligado no plasmídeo de expressão de *Pf* utilizando os sítios *SpeI* e *XhoI*. A reação de ligação ocorreu de um dia para o outro em uma imersão a 16°C (Ciclador Térmico de DNA Perkin Elmer Cetus). A transfor-

mação do produto ligado foi feita por eletroporação com a utilização do seguinte protocolo: foram preparadas células competentes de *P. fluorescens* por inoculação de 5 ml de LB com um estoque em glicerol congelado de *P. fluorescens*, cepa MB324, e foram desenvolvidas de um dia para o outro a 30°C, agitadas a 300 rpm (agitadora incubadora refrigerada New Brunswick Scientific Innova 4230). No dia seguinte, 750 µl de cultura de um dia para o outro foram inoculados em 50 ml de LB contidos em um frasco de 250 ml. As células cresceram até uma OD₆₀₀ de 0,2-0,4. Após ter sido alcançada a densidade adequada, a amostra da cultura foi resfriada em gelo por 5-10 minutos, transferida para um tubo cônico de 50 ml e centrifugada a 7.000 rpm por cinco minutos em uma centrífuga de chão Sorvall RC5C com utilização de um rotor GSA. As células peletizadas foram lavadas e ressuspensas três vezes com água deionizada estéril gelada, antes da suspensão final de células em 400 µl de água estéril. O DNA ligado foi precipitado com etanol até um volume de 10 µl. A alíquota de 10 µl de DNA ligado foi adicionada a 100 µl de suspensões de células lavadas em cadinhos de eletroporação de 0,2 cm, e submetidas à eletroporação com um BioRad GenePulser a 200 Ohms, 25 µF e 2,25 kV, em constantes de tempo de 4,6 a 4,8. Permitiu-se que os transformantes se recuperassem por 2 horas a 30°C, 300 rpm, e depois eles foram plaqueados sobre placas de ágar LB contendo 30 µg/ml de tetraciclina. As placas foram incubadas a 30°C por 36-48 horas. Os transformantes foram então avaliados, e o constructo final, pDAB3910, foi verificada por análise de enzima de restrição. Estoques em glicerol de pDAB3910 (**Figura 6**) foram feitos e armazenados a -80°C.

Crescimento e indução de *P. fluorescens* que expressa Mcpa sem cauda de histidina. Estoques congelados em glicerol de *Pseudomonas fluorescens* contendo plasmídeo, pDAB3910, foram usados para expressão de proteína de Mcpa sem cauda de histidina (**ID. DE SEQ. Nº: 12**). Uma alíquota de 200 µl de estoque em glicerol foi inoculada em 50 ml de meio LB em frascos de 250 ml, suplementado com tetraciclina até uma concentração final de 30 µg/ml. As culturas foram incubadas em uma máquina de agitação New Brunswick Innova a 30°C por aproximadamente 16 horas a 300 rpm. As

culturas de semeadura de um dia para o outro foram então usadas para inocular 1 litro de meio de cultura (veja o Apêndice para os Exemplos 3 e 4) distribuído igualmente em cinco frascos de 1 litro (inóculo de 2% e 30 µg/ml de tetraciclina). Os frascos foram incubados em uma máquina de agitação

5 New Brunswick Innova a 300 rpm e 30°C por 24 horas, e depois foram induzidos com IPTG até uma concentração final de 0,3 mM. As culturas foram incubadas por mais 48 horas, antes da coleta.

Após 48 horas, as culturas foram derramadas em garrafas de centrífuga estéreis de 500 ml, e centrifugadas em uma centrífuga Sorvall

10 RC5C a 8.165 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os péletes foram armazenados a -80°C. Cada cultura foi subsequentemente avaliada e o constructo final, pDAB3910, foi verificada por análise de enzima de restrição e por sequenciamento das junções SpeI e XhoI utilizando o Protocolo de Sequenciamento de Beckman por 45 ciclos (96°C, 2 min.; 96°C, 20

15 seg.; 50°C, 20 seg.; 60°C, 4 min.; 4°C manter; Gene Amp PCR System 9700) e analisada com Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corp.). Foram feitos um aumento de escala de 2 litros e a coleta de células transformadas de *Pf* com o gene de *Mcpa* sem cauda de histidina seguindo os procedimentos descritos acima.

20 Purificação de proteína de *Mcpa* sem cauda de histidina. Uma alíquota de 24 g de pasta de células foi ressuspensa em 200 ml de tampão de lise (Tris 50 mM, pH 8,0, 5% (v/v) glicerol, EDTA 20 mM, Triton X-1000, 5% (v/v), DTT 1 mM) e 1 X coquetel de inibidor de protease (Nº de Catálogo Sigma: P8465) e lisada por agitação com glóbulos de vidro de 0,1 mm em uma câ-

25 mara de rompimento de 450 ml (BioSpec). As células foram processadas 7 vezes em intervalos de um minuto, separados por períodos de repouso de 1 minuto no gelo, para evitar o superaquecimento. Adicionalmente, a câmara foi resfriada com gelo. O lisado foi colocado em garrafas de centrífuga de 250 ml e centrifugado a 14.000 x g em um rotor SLC-1500 por 20 minutos. O

30 sobrenadante foi filtrado três vezes (0,85 µm, 0,45 µm e 0,22 µm). O pélete foi descartado.

A amostra clarificada foi purificada por cromatografia por troca

aniônica por carga em uma coluna de Sefarose Q XK 26/11 equilibrada com Tampão A (Tris 50 mM, pH 8,0, glicerol 5% (v/v), EDTA 20 mM, Triton X-100 0,5% (v/v), DTT 1 mM) a 5 ml/min. A proteína de Mcpa foi eluída com gradiente linear de 10 volumes de coluna (CV) até Tampão B 50% (Tampão A + NaCl 1 M) por 100 minutos, e depois Tampão B 100%. Foram coletadas frações de 10 ml, e foi obtido o perfil de eluição (**Figura 7**).

A análise por SDS-PAGE das frações eluídas indicou a presença de proteína de Mcpa em aproximadamente 42 kDa. Foi preparada uma ampliação do cromatograma superposto a uma fotografia da análise por SDS-PAGE das frações retiradas. A localização da proteína de Mcpa sem cauda de histidina na SDS-PAGE foi anotada.

As proteínas fracionadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de Tris-glicina com metanol 20% a 100 volts por 60 minutos para análise "*Western blot*". O *blot* foi incubado brevemente em PBS-Tween (Pierce, Rockford, IL), e depois bloqueado em tampão de bloqueio de leite 5% v/v e Tween 20 0,5% dissolvido em PBS por 60 minutos em temperatura ambiente. Anti-CPA de coelho (Dow AgroSciences, Lote Nº: DAS1041-156-2) foi usado como anticorpo primário. O anticorpo foi diluído até 1 µg/ml em uma alíquota fresca de tampão de bloqueio, e incubado com o *blot* por 60 minutos em temperatura ambiente. O *blot* foi lavado com PBS 2 vezes por 15 minutos em temperatura ambiente. Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (Nº de Catálogo KPL: 075- 1506) com um conjugado de fosfatase alcalina foi usado para detectar o anticorpo primário.

O anticorpo foi diluído até 1/1.000 em uma alíquota fresca de tampão de bloqueio, e incubado com o *blot* por 60 minutos em temperatura ambiente. O *blot* foi lavado em PBS 3 vezes por 10 minutos em temperatura ambiente. O *blot* foi desenvolvido com NBT/BCIP (Pierce, Rockford, IL Nº de Catálogo: 34042) e lavado com água destilada e seco ao ar.

Foram preparados um SDS-PAGE e um *Western blot* a partir das frações 56-70 reunidas em pool, comparadas com Mcpa purificada com cauda (Exemplo 3) e um controle negativo (lisado de células transformadas com vetor vazio). O gel indicou aproximadamente 90% de pureza da amos-

tra de Mcpa sem cauda de histidina. No *Western Blot*, foram observadas algumas ocorrências de agregação e degradação da banda de Mcpa. Além disso, foi observada reatividade cruzada no controle negativo.

Espectrometria de massa por dessorção a laser com auxílio de matriz no modo tempo de voo (MALDI-TOF) e sequenciamento do terminal N de Mcpa sem cauda de histidina também foram usados para verificar a identidade da proteína purificada. A sequência do terminal N da amostra (S W D G K I D G T G) combinava com a sequência de Mcpa esperada dos resíduos # 2 a 11 no terminal N. Após digestão da amostra por tripsina, os peptídeos detectados por MALDI-TOF foram comparados com a impressão digital da massa peptídica (PMF) esperada da de Mcpa com o uso do software PAWS (Genomic Solutions, Inc.). Foi identificado um total de 18 peptídeos de Mcpa sem cauda de histidina, gerando uma cobertura de PMF de 56%. Essa análise indicava fortemente que a PMF da amostra combinava com a sequência teórica de Mcpa sem cauda de histidina.

As frações mais limpas (Frações 56-70) foram reunidas em pool e concentradas até aproximadamente 35 ml com concentradores por centrifugação Millipore 10K-MWCO (usados de acordo com as instruções do fabricante). O concentrado foi injetado em cassetes de diálise "Snake Skin Slide-A-Lyzer" (3,5-k MWCO, Nº de Catálogo: GD96524) e dialisado de um dia para o outro contra 2 litros de IX PBS pH 8,0 a 4°C. A amostra dialisada foi distribuída em duas alíquotas de aproximadamente 25 ml, congelada em tubos cônicos de Falcon pré-tarados de 50 ml e liofilizada por 2 dias (Virtis Freezemobile 25 EL). A liofilização gerou 1,13 g de pó, que foi armazenado a 4°C. A concentração de proteína total foi determinada (ensaio de Bradford) e a pureza calculada em 2,2% por peso, gerando aproximadamente 25 mg de Mcpa sem cauda de histidina.

Em resumo, uma amostra de Mcpa sem cauda de histidina de 25 mg foi purificada a partir de 400 ml de cultura de *Pf* por meio de cromatografia por troca aniônica. O esquema de purificação pode ser otimizado ainda mais. Adicionalmente, a diálise contra Tris 3 mM pH, 8,0, com trehalose 0,5%, em vez de 1X tampão PBS, é recomendada para estabilidade de lon-

go prazo da proteína. A Mcpa sem cauda de histidina gerada foi usada como um antígeno de teste.

APÊNDICE PARA OS EXEMPLOS 3 E 4

Meio para o frasco de semeadura de *Pseudomonas fluorescens*

- 5 Meio LB (pode ser Miller ou Lennox)
Dividir 50 ou 100 ml de meio em um frasco de 250 ml.
Fechar com uma rolha de espuma e tampar.
Autoclavar por 20 min a 121°C.

EXEMPLO 5

10 TESTE DE TOXICIDADE DE PROTEÍNAS DE CPA RECOMBINANTES PURIFICADAS

- Foram desenvolvidos dois ensaios *in vitro*, cada um para detecção de uma atividade característica de alfa-toxina de *Cp* nativa, hemólise de células sanguíneas vermelhas (RBC) ou de lecitinase. No ensaio de hemólise,
- 15 células sanguíneas vermelhas (RBCs) foram incubadas com uma suposta cpa não-tóxica e observadas quanto aos efeitos hemolíticos, comparado com controles positivos e negativos. O ensaio foi útil para determinar a atividade ou concentração aproximada de fosfolipase C (PLC) em amostras experimentais, com base em um padrão contendo uma quantidade conhecida
 - 20 de unidades de PLC.

- Lecitina (L- α fosfatidilcolina) é o fosfoglicerídeo mais abundante, um fosfolípídeo que serve como um componente estrutural importante de membranas celulares. Quando a alfa-toxina é secretada por *Cp*, ela se liga de forma nativa às membranas da célula hospedeira, cliva lecitina e desencadeia uma cascata de eventos que resulta na diminuição de oxigênio no
- 25 sítio infectado pela bactéria e na proliferação de *Cp*. Um segundo ensaio foi desenvolvido e usado para medir a atividade de lecitinase de amostras experimentais e, dessa forma, determinar a atividade ou concentração aproximada de PLC por comparação com um padrão (Logan, 1991). A atividade de
 - 30 lecitinase foi detectada e quantificada *in vitro* por incubação de proteínas de cpa recombinantes com uma solução de lecitinase. A turvação aumentada, medida por espectrofotometria, indicou atividade de clivagem. Ambos os en-

saios serviram de instrumento para demonstrar um design eficaz de antígenos na remoção ou redução das atividades hemolíticas e de lecitinase tóxicas, antes do início dos estudos animais.

Ensaio de lise de RBC para detecção de atividade de alfa-toxina de *Clostri-*

5 *dium perfringens*

Preparação de padrão de PLC. O padrão de PLC liofilizado (Sigma P-4039, 500 unidades, Lote N^o: 014K86152) foi aberto em uma câmara de biossegurança limpa. O conteúdo do frasco de PLC foi reidratado com DPBS estéril (N^o de Catálogo Cellgro: 21-031-CV) até uma concentra-
10 ção final de 106 unidades de PLC/ml, para uso como solução de estoque. A solução de estoque foi armazenada em aliquotas de 50 em tubos criogênicos a -80°C até ser utilizada.

Tampão de borato de cálcio. Foi usado tampão de borato de cálcio para diluir todas as amostras testadas. O tampão foi preparado com o
15 uso do seguinte procedimento: ácido bórico 200 mM (Sigma) e cloreto de cálcio 1,3 mM (Sigma) dissolvidos em 500 ml de água RO/DI. pH até 7,6 com 100 mM tetraborato de sódio (Borax) (19 g/500 ml de água RO/DI); volume ajustado até 1 litro. O tampão foi armazenado em temperatura ambiente, com uma data de validade de um ano.

20 Solução a 1% (v/v) de células sanguíneas vermelhas. Uma solução a 1% (v/v) de RBCs de galinha (cRBC) (Colorado Serum Company: N^o de Catálogo CS 1151) foi preparada using DPBS para lavagem e diluição da seguinte forma:

25 1. Transferir 5 ml de cRBCs em solução de Alsevers em um tubo cônico de 15 ml.

2. Centrifugar a 250 x g por 10 minutos para peletizar as cRBCs.

3. Aspirar o sobrenadante e as células sanguíneas brancas da parte de cima do pélete.

4. Ressuspender o pélete em 10 ml de solução salina.

30 5. Peletizar as células a 250 x g por 10 minutos.

6. Repetir as etapas 3 - 5 mais duas vezes, ou até que o sobrenadante esteja transparente (caso o sobrenadante permaneça vermelho a-

pós a terceira lavagem em solução salina, as cRBCs do estoque estão muito velhas e devem ser destruídas. Observe que as cRBCs em solução de Alsevers são estáveis por aproximadamente 2 semanas a 2-7°C).

7. Após a lavagem final em solução salina, aspirar o sobrenadante e salvar o pélete de cRBC compactado.

8. Diluir as cRBCs até 1% (v/v) em tampão de DPBS. Observe que são necessários aproximadamente 5 ml da solução de cRBC 1% por placa no teste.

9. Determinar a absorbância a 540 nm das células sanguíneas lisadas na solução a 1%. A faixa aceitável é de 0,4 – 0,5 de A_{540} .

i. Transferir 400 litros da solução de cRBC a 1% (v/v) para um tubo pequeno e adicionar 1,6 ml de água RO/DI.

ii. Turbilhonar na maior velocidade por 20 segundos para lisar as células.

iii. Zerar o espectrofotômetro com 400 μ l de tampão de DPBS em 1,6 ml de água a 540 nm.

iv. Transferir a solução de cRBCs lisadas para um cadinho e ler a absorbância a 540 nm.

v. Caso a absorbância a 540 nm seja de 0,4 a 0,5, a solução 1% é aceitável para uso no ensaio. Caso a absorbância a 540 nm seja $< 0,4$ ou $> 0,5$, a solução 1% deve ser ajustada por adição de tampão de DPBS para diminuir a absorbância até a faixa adequada ou por adição de mais cRBCs do pélete de células para aumentar a absorbância. Caso a solução 1% seja ajustada em função de uma absorbância a 540 nm que esteja fora dos limites, a solução de cRBC ajustada deve ser lisada, e a nova A_{540} determinada. Alternativamente, pode ser preparada uma nova solução de cRBC 1%, e essa testada novamente, caso a solução 1% inicial esteja fora da faixa.

Procedimento do ensaio. Os poços de uma placa de 96 poços com fundo em "U" (Nº de Catálogo Falcon: 35-3918) foram carregados com 50 μ l de tampão de borato de cálcio. A amostra ou a solução de estoque de PLC (50 μ l) foi então adicionada ao primeiro poço de uma fileira ou coluna. A amostra ou o controle foi misturado e diluído serialmente aos poços subse-

quentes por transferência de 50 μ l, até a diluição final desejada ser obtida. Os 50 μ l restantes foram removidos do último poço de diluição e descartados, de tal forma que cada poço contivesse 50 μ l de amostra ou controle. Cinquenta μ l de solução de RBCs 1% foram então adicionados a todos os poços e a placa foi misturada em uma agitadora de placas por 30 segundos. A placa foi incubada a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por uma hora. Uma leitora de placas foi usada para determinar a absorbância de cada poço a 620 nm. Uma imagem da placa também foi capturada com a utilização de um dispositivo de registro de imagens "Syngene GeneGenius Bio Imaging System".

Os dados da lise de RBC foram analisados com o uso dos valores de A_{620} , bem como por uma análise visual qualitativa dos poços na placa. A lise completa de RBCs era indicada por um valor de A_{620} baixo e por um poço turvo sem células coletadas no fundo da placa. A lise parcial produz um poço turvo com um pequeno "botão" de RBC no fundo da placa que é menor do que os poços de controle. A ausência de lise era indicada por uma coleção completa de todos os RBCs no fundo do poço e um tampão transparente acima da coleção de RBCs. A lise de RBCs era uma indicação *in vitro* de atividade biológica da amostras e/ou dos controles.

As amostras foram testadas ao lado de padrões contendo concentrações conhecidas de PLC, o que permite a determinação da concentração de PLC em uma amostra por comparação com uma curva-padrão. Os controles negativos incluíam tampão sem amostra ou padrão e RBCs 1% sem tampão. A validade do ensaio dependia dos controles negativos que indicam ausência de atividade de lise em qualquer diluição.

Teste de proteínas de Mcpa recombinantes purificadas de fontes bacterianas. A cpa mutante (Mcpa) foi expressa e purificada a partir de *Pseudomonas fluorescens* (Pf) para uso como um antígeno de referência (Exemplos 3 e 4). A versão 6X-his-tagged de Mcpa (ID. DE SEQ. Nº: 10, Lote Nº: DAS F1041-188-2, Exemplo 3) foi avaliada no ensaio de lise de RBC e não foi detectada nenhuma atividade hemolítica na concentração máxima testada ($500 \pm \text{g/ml}$, Tabela 4). Também foi gerada em Pf uma versão não-marcada (Mcpa NHT, ID. DE SEQ. Nº: 12, Exemplo 4) e purificada

(Nº de Lote: E2036-70-1072295). No entanto, verificou-se que essa proteína lisa RBCs em concentrações tão reduzidas quanto 7,81 µg/ml. Na medida em que a cauda de histidina (*His-tag*) não estava presente para purificação, foi usado um método alternativo que inclui o detergente Triton X-100 (0,5% v/v) no tampão de purificação. Foi especulado que o Triton X-100 residual na preparação talvez seja responsável pela hemólise. Foi produzido outro lote de Mcpa NHT (Nº de Lote: E2036-88-96) com uma remoção mais cuidadosa do detergente, e testado no ensaio de lise de RBC. Os resultados indicaram que, quando o Triton X-100 era removido mais completamente, a atividade de lise de RBC não era detectada (**Figura 8**). O Lote E2036-88-96 de Mcpa NHT na ausência de Triton X-100 residual não lisou RBCs de galinha até uma concentração de 500 µg/ml. Os pontos finais da atividade de PLC em todos os três lotes de Mcpa estão resumidos na Tabela 4.

Ensaio de lecitinase para detecção de atividade de alfa-toxina de *Clostridium perfringens*.

Emulsão de gema de ovo. Emulsão de gema de ovo (Oxoid SR0047C) foi usada como a fonte de lecitina para o ensaio *in vitro*. A emulsão foi centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído a 1:8 com tampão de borato de cálcio 0,9% (CaCl 0,002 M, H₃BO₃ 0,2 M, pH 7,6).

Procedimento do ensaio. Aliquotas de 50 µl de amostras de teste e controle positivo de fosfolipase C (PLC) (descrito previamente, Sigma P-4039) foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços. Cada amostra foi diluída serialmente em tampão de borato de cálcio, mantendo um volume total de 50 µl por poço. Cinquenta µl de emulsão de gema de ovo foram então adicionados por poço. A placa foi colocada em uma agitadora por 30 segundos, e lida a 620 nm para uma leitura basal. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora, e foi feita uma leitura final da placa a 620 nm. Foi calculado o aumento dos valores da A₆₂₀ em 1 hora em relação à leitura basal. A atividade de PLC foi interpretada como um aumento de 50% ou mais na turvação do poço. Os cálculos foram feitos com o uso da seguinte equação:

$$\% \text{ de aumento da turvação} = [100 \times (\text{leitura em 1 hora} / \text{leitura a}$$

0 hora)] – 100

Teste de proteínas de Mcpa recombinantes purificadas de fontes bacterianas. Mcpa com cauda de histidina e Mcpa sem cauda de histidina (Mcpa NHT) dos Exemplos 3 e 4, expressas e purificadas por *P. fluorescens* foram avaliadas quanto à atividade de lecitinase. A proteína de Mcpa com cauda de histidina demonstrou ausência de atividade de PLC no ensaio de lecitinase, quando testada até uma concentração de 1.000 µg/ml. Os antígenos de Mcpa NHT não exibiram atividade lecitinase até a concentração máxima testada, 500 µg/ml (**Figura 9**).

A avaliação de lecitinase e de hemólise dos antígenos de Mcpa purificada demonstraram que essas atividades de α -toxina foram acentuadamente reduzidas ou eliminadas por meio do design de novas mutações pontuais da proteína de comprimento total.

EXEMPLO 6

VACINAÇÃO SUBCUTÂNEA COM ALFA TOXINA RECOMBINANTE MUTANTE PARA PROTEÇÃO DE GALINHAS CONTRA ENTERITE NECRÓTICA

Preparação da vacina. Amostras liofilizadas de Mcpa purificada e Mcpa NHT, como descritas nos Exemplos 3 e 4 (Números de Lote DASF1197-08-03, Mcpa (Pf); e DASE2036-88-96, Mcpa sem cauda de histidina (PJ)) foram armazenadas a -20°C antes de sua utilização. Para formulação da vacina, os antígenos foram reidratados com água estéril e EDTA 1 mM foi adicionado. Mcpa e Mcpa NHT foram formuladas com polímero acrílico de lecitina mais colesterol Quil A (LAP/QAC) com uma proporção de Quil A:colesterol de 1:1 ou 4:1 por peso, como indicado no design do estudo (**Tabela 5**).

Procedimento do estudo. Frangos Cornish Rock foram recebidos no dia da eclosão (Dia 0) de McMurray Hatchery, Webster City, IA, e abrigados em chocadeiras em tabuleiro em serragem com iluminação contínua. "Low-protein-Fish Meal Starter" (LP-FM Starter, Número de Lote 092505) suplementado com zinco até 400 ppm foi fornecido (APÊNDICE para o Exemplo 6) na quantidade de aproximadamente 750 g por dia por grupo de

tratamento; os pintos tiveram livre acesso à água.

As aves foram vacinadas nos 5º e 15º Dias, como indicado no design do estudo. As vacinas foram formuladas no dia da injeção e administradas por via subcutânea na parte posterior do pescoço.

5 No 8º Dia, a dieta dos pintos foi mudada para "High Protein-Fish Meal Grower" (HP-FM Grower, Número de Lote 100405) suplementado com zinco até 400 ppm pela duração do estudo (APÊNDICE para o Exemplo 6).

A ração foi retirada no 24º Dia por aproximadamente 20 horas. Após o ataque, duas vezes por dia, por 4 dias, com *Cp* cepa JGS 4143 na
10 ração (100 g de ração por 125 ml de cultura). O componente de *Cp* da mistura foi preparado da seguinte forma: culturas de *Cp* armazenadas a -80°C foram inoculadas em volumes de 100 ml de meios líquidos de tioglicolato (FTG) e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas. Um inóculo de 5% foi transferido
15 em volumes de 100 ml de meio de carne cozida (CMM), seguido por incubação a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas. Finalmente, volumes de 1 litro de FTG inoculados com 5% da cultura de CMM foram incubados a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas, antes da mistura com a ração.

As aves foram observadas quanto aos sinais de NE (depressão, inapetência, mal estar, diarreia, penas desordenadas), e as que exibem
20 sinais severos foram sacrificadas para necropsia e pontuação da lesão. As aves sobreviventes foram submetidas à necropsia e as pontuações de lesão registradas no 29º Dia.

Sistema de pontuação para necropsia

0: sem lesões macroscópicas

25 1+: intestino delgado dilatado e com paredes finas ou friáveis; contém conteúdo amarelo/marrom, aquoso, com cheiro ruim; camada mucosa espessada separada da muscular da mucosa; erosão ou desprendimento das pontas das vilosidades, acúmulo de restos necróticos, fibrina e bactérias

2+: edema e hiperemia; necrose focal ou ulceração do intestino
30 delgado; erosão moderada das pontas das vilosidades

3+: grandes placas de necrose e ulceração; hemorragia; desprendimento da mucosa

4+: necrose de todo o revestimento do intestino, incluindo desprendimento completo em áreas distintas; pseudomembrana frequentemente presente; erosão das vilosidades; típico de casos de campo

5 Análise dos dados. As pontuações das lesões para todos os tratamentos foram analisadas, inicialmente, em conjunto como uma lista simples de tratamentos sem estrutura. A seguir, um subconjunto de tratamentos T4-T7 foi adicionalmente analisado como uma Fatorial com dois níveis. O primeiro nível comparou Mcpa *Tagged* vs *Non-tagged* e o Segundo nível comparou as proporções de LAP/QAC de 1:1 a 4:1. Os dados de pontuação da lesão foram analisadas como uma medida categórica ordenada e a análise foi uma análise de Contingência. Se essa análise fosse significativa, os tratamentos individuais eram então comparados com o uso de análises de contingência simples de cada par de tratamentos possível. Todas as análises foram realizadas com a utilização do pacote estatístico JMP.

15 Pontuações das lesões. A frequência de pontuações da lesão por grupo de tratamento é resumida na **Tabela 6**. A análise mostrou diferenças significantes entre os tratamentos ($p = 0,001$). Um gráfico em mosaico (**Figura 10**) ilustra a frequência de pontuações de lesão por grupo, com aves não pontuáveis removidas do conjunto de dados. A análise revelou que todos os tratamentos atacados foram significativamente diferentes do controle não atacado e que o tratamento T4 (Mcpc(*Pf*)[LAP/QAC 4:1]) e o tratamento T6 (Mcpc sem cauda de histidina(PALAP/QAC 4:1)) foram significativamente diferentes dos controles atacados não vacinados ($p = 0,0239$ e $p = 0,0116$, respectivamente, **Tabela 7**). Esses dados indicam fortemente que as alfa-toxinas recombinantes mutantes derivadas de *Pf*, *tagged* ou *nontagged*, com o adjuvante LAP/QAC 4:1 foram eficazes na redução da gravidade de lesões de enterite necrótica em pintos, quando administradas como uma vacina subcutânea.

APÊNDICE PARA O EXEMPLO 6

Composição da ração

"Low Protein — Fish Meal Starter" (LP-FM)	
Componente	% de Composição
Trigo (<i>Feedmill</i>)	85,00
Farelo de soja (<i>Bulk</i>)	3,00
Farelo de peixe	6,00
Gordura líquida (<i>Bulk</i>)	2,00
Di-Cal (Co-Phos)	0,74
Calcário	0,90
Sal grosso	0,36
Microminerais	0,10
Vitaminas A-D-E	0,10
Metionina	0,10
Dyna K KCl	0,80
Lisina	0,90
Total	100,00

Zinco suplementado até aproximadamente 400 ppm

"High Protein-Fish Meal Grower" (HP-FM Grower)	
Componente	% de Composição
Trigo (<i>Feedmill</i>)	33,5
Farelo de soja (<i>Bulk</i>)	14,7
Farelo de peixe	50,0
Gordura líquida (<i>Bulk</i>)	1,25
Calcário	1,75
Sal grosso	0,225
Microminerais	0,075
Vitaminas A-D-E	0,075
Total	100

Zinco suplementado até aproximadamente 400 ppm

Tabela I. Variações em alfa-toxinas de galinha comparadas com Cepa 13 (isolado humano)

AA No.	Str13*	Tipo I*	Tipo II*	Tipo III*	Tipo IV*	Tipo V*	Tipo VI
13	T	A	A	T	A	A	T
15	A	A	A	V	A	A	A
22	A	A	A	V	A	A	A
47	V	V	V	V	V	V	I
54	L	L	L	M	M	L	L
71	E	E	E	D	E	E	Q
149	L	L	L	I	L	L	L
202	D	D	D	D	D	A	A
205	A	A	A	A	A	T	A
373	I	I	V	V	I	I	V

*Sheedy *e cols.* (2004)

Tabela 2. Representação de códon sinônimos em regiões codificadoras de 32.630 genes de *Oryza sativa* (arroz) (Colunas C e I), e 1.268 genes de *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Colunas D e J). Os valores para uma representação equilibrada de códons ajustados para um design de gene sintético otimizado de planta estão nas Colunas F e L

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Aminoácido	Códon	Arroz %	Tabaco %	Média arroz - tabaco	Média Ponderada	Aminoácido	Códon	Arroz %	Tabaco %	Média arroz - tabaco	Média Ponderada
ALA (A)	GCA	18,8	31,0	24,9	30,4	LEU (L)	CTA	9,0	10,5	NA	DNU
	GCC	32,3	17,3	24,8	30,2		CTC	27,3	13,0	20,2	25,6
	GCC	27,9	8,1	NA	DNU		CTG	22,6	11,2	16,9	21,4
	GCT	21,0	43,6	32,3	39,4		CTT	16,8	25,9	21,3	27,0
ARG (R)	AGA	15,0	31,7	23,3	32,8	LYS (K)	TTA	7,3	15,3	NA	DNU
	AGG	21,8	24,6	23,3	32,6		TTG	16,9	24,0	20,5	26,0
	CGA	10,4	11,9	11,2	15,7		AAA	34,3	50,0	42,1	42,1
	CGC	22,5	8,1	NA	DNU		AAG	65,7	50,0	57,9	57,9
	CGG	19,4	7,7	NA	DNU	MET (M)	ATG	100,0	100,0	100,0	100,0
	CGT	11,0	16,00	13,5	19,0	PHE (F)	TTC	61,6	41,9	51,8	51,8

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Aminoácido	Códon	Arroz %	Tabaco %	Média arroz - tabaco	Média Ponderada	Aminoácido	Códon	Arroz %	Tabaco %	Média arroz - tabaco	Média
ASN (N)	AAC	54,7	39,4	47,1	47,1		TTT	38,4	58,1	48,2	48,2
	AAT	45,3	60,6	52,9	52,9	PRO (P)	CCA	24,8	38,9	31,8	31,8
ASP (D)	GAC	52,2	31,1	41,6	41,6		CCC	21,1	13,6	17,3	17,3
	GAT	47,8	68,9	58,4	58,4		CCG	30,5	10,0	20,3	20,3
CYS (C)	TGC	65,2	42,6	53,9	53,9	SER (S)	CCT	23,7	37,5	30,6	30,6
	TGT	47,8	57,4	46,1	46,1		AGC	20,3	12,5	16,4	18,5
END	TAA	24,7	42,6	33,7				AGT	11,6	17,3	14,5
	TAG	31,8	19,6	25,7		TCA		15,5	22,6	19,0	21,5
	TGA	43,5	37,8	40,6		TCC		20,5	14,1	17,3	19,6
GLN (Q)	CAA	41,0	58,9	50,0	50,0		TCG	15,8	7,2	NA	DNU
	CAG	59,0	41,1	50,0	50,0		TCT	16,4	26,2	21,3	24,1
GLU (E)	GAA	36,9	55,7	46,3	46,3	THR (T)	ACA	23,7	32,7	28,2	33,7
	GAG	63,1	44,3	53,7	53,7		ACC	30,5	19,1	24,8	29,6

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Aminoácido	Códon	Arroz %	Tabaco %	Média arroz - tabaco	Média Ponderada	Aminoácido	Códon	Arroz %	Tabaco %	Média arroz - tabaco	Média Ponderada
GLY (G)	GGA	21,4	34,6	28,0	28,0		ACG	23,6	8,8	DNU	DNU
	CCC	37,0	16,2	26,6	26,6		ACT	22,3	39,4	30,8	36,8
	GGG	22,3	15,4	18,9	18,9	TRP (W)	TGG	100,0	100,0	100,0	100,0
	GGT	19,3	33,7	26,5	26,5	TYR (Y)	TAC	58,8	41,4	50,1	50,1
HIS (H)	CAC	54,5	38,3	46,4	46,4		TAT	41,2	58,6	49,9	49,9
	CAT	45,5	61,7	53,6	53,6	VAL (V)	GTA	10,7	18,3	NA	DNU
ILE (I)	ATA	20,8	25,8	23,3	23,3		GTC	29,8	17,0	23,4	27,4
	ATC	45,2	24,6	34,9	34,9		GTG	36,1	24,3	30,2	35,3
	ATT	34,0	49,6	41,8	41,8		GTT	23,4	40,4	31,9	37,3

**NA = Não aplicável

***DNU = Não usar

Tabela 3. Composições de códons de regiões codificadoras para proteína madura de alfa-toxina (370 aminoácidos). A região codificadora da alfa-toxina nativa de *C. perfringens* é comparada com uma versão otimizada de planta contendo três mutações.

Aminoác.	Códon	Gene nativo #	Gene nativo %	Gene de planta otim. #	Gene de planta otim. %	Recomend. p/ planta otimizada	Aminoác.	Códon	Gene nativo #	Gene nativo %	Gene de planta otim. #	Gene de planta otim. %	Recomend. p/ planta otimizada
ALA (A)	GCA	12	44,4	7	25,9	30,4	LEU (L)	CTA	4	25,0	0	0,0	DNU
	GCC	0	0,0	9	33,3	30,2		CTC	0	0,0	4	23,5	25,6
	GCG	0	0,0	0	0,0	DNU		CTG	1	6,3	4	23,5	21,4
	GCT	15	55,6	11	40,7	39,4		CTT	2	12,5	4	23,5	27,0
ARG (R)	AGA	8	88,9	3	33,3	32,8	LYS (K)	TTA	9	56,3	0	0,0	DNU
	AGG	1	11,1	3	33,3	32,6		TTG	0	0,0	5	29,4	26,0
	CGA	0	0,0	1	11,1	15,7		AAA	25	69,4	14	38,9	42,1
	CGC	0	0,0	0	0,0	DNU		AAG	11	30,6	22	61,1	57,9
ASN (N)	CGG	0	0,0	0	0,0	DNU	MET (M)	ATG	8	100,0	8	100,0	100,0
	CGT	0	0,0	2	22,2	19,0	PHE (17)	TTC	6	40,0	9	60,0	51,8
	AAC	6	23,1	11	42,3	47,1		TTT	9	60,0	6	40,0	48,2
	AAT	20	76,9	15	57,7	52,9	PRO (P)	CCA	6	60,0	3	30,0	31,8

Aminoác.	Códon	Gene nativo #	Gene nativo %	Gene de planta otim. #	Gene de planta otim. %	Recomend. p/ planta otimizada	Aminoác.	Códon	Gene nativo #	Gene nativo %	Gene de planta otim. #	Gene de planta otim. %	Recomend. p/ planta otimizada
HIS (H)	CAC	2	22,2	5	62,5	46,4	VAL (V)	TAT	22	84,6	12	46,2	49,9
	CAT	7	77,8	3	37,5	53,6		GTA	8	57,1	0	0,0	DNU
ILE (I)	ATA	11	50,0	5	22,7	23,3		GTC	0	0,0	4	28,6	27,4
	ATC	3	13,6	8	36,4	34,9		GTG	1	7,1	4	28,6	35,3
	ATT	8	36,4	9	40,9	41,8		GTT	5	35,7	6	42,9	37,3
Totais		188	187		184		Totais		183	184			

Tabela 4. Ponto final da atividade hemolítica de amostras de Mcpa purificadas e controle.		
Amostra ou padrão	Número de Lote	Ponto final da atividade hemolítica diluição/concentração
Padrão de PLC	014K86152	0,265 unidades/ml
Mcpa	DAS F1041-188-2	> 500 $\mu\text{g/ml}$
Mcpa NHT	E2036-70-1072295	15,63 $\mu\text{g/ml}$
Mcpa NHT	E2036-88-96	> 500 $\mu\text{g/ml}$

NHT = *nontagged*

Tabela 5. Design do estudo clínico para avaliação de antígenos de Mcpa em galinhas jovens.						
Grupo Nº	Tratamento (dias 5 e 15)			Ataque	n=	Vacina (dose/ volume)
	Antígeno	Tampão	Adjuvante			
1	NA	NA	NA	Não	15	NA
2	Nenhum	PBS	LAP/QAC (1:1)	Sim	15	Nenhum/0,5 ml
3	Mcpa <i>tagged</i> (Pf)	PBS + EDTA 1 mM	LAP/QAC (1:1)	Sim	15	40 mg/0,5 ml
4	Mcpa <i>tagged</i> (Pf)	PBS + EDTA 1 mM	LAP/QAC (4:1)	Sim	15	40 mg/0,5 ml
5	Mcpa <i>nontagged</i> (Pf)	PBS + EDTA 1 mM	LAP/QAC (1:1)	Sim	15	40 mg/0,5 ml
6	Mcpa <i>nontagged</i> (Pf)	PBS + EDTA 1 mM	LAP/QAC (4:1)	Sim	15	40 mg/0,5 ml

PBS = solução salina tamponada com fosfato

LAP/QAC = polímero acrílico de lecitina mais colesterol Quil A

5 SQ = administração subcutânea

LAP/QAC (1:1) = polímero acrílico de lecitina e colesterol Quil A (Quil A : colesterol = proporção de 1:1 por peso)

LAP/QAC (4:1) = polímero acrílico de lecitina e colesterol Quil A (Quil A : colesterol = proporção de 4:1 por peso)

Tabela 6. Pontuações das lesões por grupo de tratamento.						
Grupo Nº	Pontuações das lesões					
	0	1+	2+	3+	4+	Não pontuáveis
1	15					
2			2	5	6	2
3		1	6	6	2	
4		3	4	2	2	
5		1	7	3	2	1
6		4	6	2	2	

* morte antes do término do estudo; autólise do intestino impediu a pontuação

Tabela 7. Resultados de análise de contingência por pontuações de lesão.	
Tratamento grupo comparação	valor p
PBS + atacado vs PBS + não atacado	<0,0001
Mcpa + atacado LAP/QAC 1:1 vs PBS + não atacado	<0,0001
Mcpa + atacado LAP/QAC 4:1 vs PBS + não atacado	<0,0001
Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 1:1 vs PBS + não atacado	<0,0001
Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 4:1 vs PBS + não atacado	<0,0001
Mcpa + atacado LAP/QAC 1:1 vs PBS + atacado	0,1374
Mcpa + atacado LAP/QAC 4:1 vs PBS + atacado	0,0239
Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 1:1 vs PBS + atacado	0,0743
Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 4:1 vs PBS + atacado	0,0116
Mcpa + atacado LAP/QAC 1:1 vs Mcpa + atacado LAP/QAC 4:1	0,4034
Mcpa + atacado LAP/QAC 1:1 vs Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 1:1	0,8125
Mcpa + atacado LAP/QAC 1:1 vs Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 4:1	0,2630
Mcpa + atacado LAP/QAC 4:1 vs Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 1:1	0,5914
Mcpa + atacado LAP/QAC 4:1 vs Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 4:1	0,9799
Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 1:1 vs Mcpa sem cauda de histidina + atacado LAP/QAC 4:1	0,5381

LISTAGEM DE SEQUENCIA

<110> Ainley, William M.
 Armstrong, Janna
 Madduri, Krishna
 Merlo, Donald Joseph
 Smith, Kelley A.
 Thompson, Mark
 Webb, Steven R.
 Shen, Liu Yin

<120> Vacina para aves domésticas, para enterite necrótica, compreendendo um antígeno de toxina alfa mutado de clostridium perfringens mutante, e métodos de produção da vacina

<130> DAS-137X

<140> 60/854,741
 <141> 2006-10-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 1197
 <212> DNA
 <213> Clostridium perfringens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1194)
 <223> Sequencia que codifica proteína

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(84)
 <223> Codifica peptídeo sinalizador de secreção nativo

<400> 1
 atgaaaagaa agatttgtaa ggcacttatt tgtgctacgc tagcaactag cctatgggct 60
 ggggcatcaa ctaaagtcta cgcttgggat ggaaagattg atggaacagg aactcatgct 120
 atgattgtaa ctcaagggat ttcaatctta gaaaatgata tgtccaaaaa tgaaccagaa 180
 agtgtaagaa aaaacttaga gatttttaaag cagaacatgc atgaacttca attaggttct 240
 acttatccag attatgataa gaatgcttat gatctatata aagatcattt ctgggatcct 300
 gatacagata ataatttctc aaaggataat agttggtatt tagcttattc tatacctgat 360
 acaggggaat cacaataaag aaaattttca gcattagcta gatatgaatg gcaaagagga 420
 aactataaac aagctacatt ctatcttggg gaggctatgc actattttgg tgatatagat 480
 actccatata atcctgctaa tgttactgca gttgatagtg caggacatgt taagtttgag 540
 acttttgcag aggaaagaaa agagcagtat aaaataaata cagcagggtg caaaactaat 600
 gaggcttttt atgctgatat cttaaaaaac aaagatttta atgcatgggc aaaagaatat 660
 gcaagggggt ttgctaaaac aggaaaatca atatactaca gtcatgctag tatgagtcac 720

```

agttgggatg attgggatta tgcagcaaaa gtaactctag ctaactctca aaaaggaaca      780
gcaggatata tttatagatt cttacacgat gtatcagagg gtaatgatcc atcagttggc      840
aagaatgtaa aagaactagt agcttacata tcaactagtg gtgaaaaaga tgctggaaca      900
gatgactaca tgtatttttg aatcaaaaca aaggatggaa aaactcaaga atgggaaatg      960
gacaacccgg gaaatgactt tatgactgga agtaaagata cttatacttt caagttaaag     1020
gatgaaaatc taaaaattga tgacatacaa aatatgtgga ttagaaaaag aaaatataca     1080
gcattcccgag atgcttataa gccagaaaat ataaaggtaa tagcaaatgg aaaagttgta     1140
gtggacaaag atataaatga gtggatttca ggaaattcaa cttataatat aaaataa        1197

```

```

<210> 2
<211> 398
<212> PRT
<213> Clostridium perfringens

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(28)
<223> Peptideo sinalizador de secreção

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(398)
<223> Proteína madura

```

```

<400> 2

```

```

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 Ile 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 Gln 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 Ala 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 Val 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> 3
<211> 1113
<212> DNA
<213> Clostridium perfringens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1211)
<223> Fosfolipase C de Clostridium perfringens mutante isolada de uma
DNA ave com sinais direcionado e de retenção ao RE. Esta sequencia de
tem o uso de códons re-trabalhado otimizado para a expressão em
tabaco e arroz

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(63)
<223> Codifica o sinal direcionado ao reticulo endoplasmático de zeína de
15 kDa

<220>
<221> misc_feature
<222> (229)..(231)
<223> Codifica Mutação D84L (Ácido aspártico a Leucina no aminoácido 84
da proteína nativa)

<220>
<221> misc_feature
<222> (505)..(507)
<223> Codifica Mutação H176G (Histidina a Glicina no aminoácido 176
da proteína nativa)

<220>
<221> misc_feature
<222> (517)..(519)
<223> Codifica Mutação E180G (Ácido glutâmico a Glicina no aminoácido 180
da proteína nativa)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1171)..(1182)
<223> Codifica sinal de retenção do Reticulo Endoplasmático KDEL

<220>
<221> misc_feature
<222> (1185)..(1211)
<223> Parada da translação de seis-quadro

<400> 3
tgggatggaa agattgatgg cactggcact catgccatga ttgtgactca agggatttcc 60
atcttggaaa atgacctctc caagaatgag ccagaaagtg tgaggaagaa cctggagatt 120
ttgaagcaga acatgcatga actccagctt ggttctacct atccgttgta tgacaagaat 180
gcttatgatc tgtaccaaga tcaattctgg gaccctgata cagataacaa ttccagcaag 240
gacaactcat ggtacctggc ttattcaatt ccagacaccg gggaatccca gataaggaag 300
ttctctgcac ttgcaagata tgaatggcaa cgtggcaact acaaacaagc aacattctat 360
cttggtgagg ccatgcacta ctttggtgat atagacacac cctaccacc tgccaatgtc 420
actgctgttg acagtgctgg cggtgttaag tttgggacct ttgctgaaga gagaaaagag 480

```

```

cagtacaaga taaacacagc aggctgcaaa acaaatgagg ctttctatgc tgacatcttg      540
aagaacaaag atttcaatgc ctggtcaaaa gagtatgcca gaggttttgc caaaactgga      600
aatccatct attacagcca tgccagcatg agccacagtt gggatgactg ggattatgct      660
gcaaaagtta ctttggcaaa ctctcagaaa ggaactgctg gttacatcta ccgattcctc      720
catgatgtca gtgagggcaa tgatccctct gttggcaaga atgtgaaaga gcttggtgct      780
tacatatcaa cttctggtga gaaagatgct ggaactgatg actacatgta tttcggaatc      840
aagacaaagg atggaaagac ccaagaatgg gaaatggaca accctggaaa tgactttatg      900
acaggttcaa aggacactta cactttcaag ctgaaggatg aaaatctcaa gattgatgac      960
attcaaaaca tgtggattcg taaaaggaaa tacacagcat ttccagatgc ctataagccg     1020
gaaaacatca aggtcatagc aaatggaaag gttgtcgtgg acaaggatat caatgagtgg     1080
atttctggca attcaaccta caatatcaaa tga                                  1113

```

```

<210> 4
<211> 370
<212> PRT
<213> Clostridium perfringens

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> Residuo mutado D56L

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (148)..(148)
<223> Residuo mutado H148G

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (152)..(152)
<223> Residuo mutado E152G

```

```

<400> 4

```

```

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

```

```

Gln Gly Ile 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 Gln Asn Met His Glu Leu
          35          40          45

```

```

Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Leu 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 Gly Val Lys Phe Gly 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 Ala 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 Val 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> 5
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Sequencia artificial

<220>
 <223> Sequencia de DNA de planta otimizada quimicamente sintetizada para
 peptídeo direcionado ao retículo endoplasmático de zeína de 15 kDa
 modificado

<400> 5
 atggctaaga tggtcattgt gcttggtgtg tgcttggtc tctctgctgc ctcagcttct 60
 gcc 63

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Sequencia artificial

<220>
 <223> Sequencia de aminoácido quimicamente sintetizada do peptídeo direcio-
 nado
 ao retículo endoplasmático de zeína de 15 kDa modificado codificada
 pela SEQ
 ID NO:5

<400> 6
 Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ser Ala
 20

<210> 7
 <211> 1185
 <212> DNA
 <213> Sequencia artificial

<220>
 <223> Sequencia de DNA de planta otimizada quimicamente sintetizada codifi-
 cando
 proteína de alfa-toxina madura mutada de C. perfringens com peptídeo
 direcionado ao retículo endoplasmático de zeína de 15 kDa modificado,
 e
 peptídeo de retenção KDEL ER

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(63)
 <223> Peptídeo direcionado ao RE com zeína de 15 kDa

<220>
 <221> misc_feature

<222> (64)..(1173)

<223> Proteína de alfa-toxina madura mutada de *C. perfringens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1171)..(1182)

<223> Peptídeo de retenção KDEL ER

<400> 7

```
atggctaaga tggtcattgt gcttgtttgtg tgcttggtc tctctgctgc ctcagcttct 60
gcctgggatg gaaagattga tggcactggc actcatgccg tgattgtgac tcaagggatt 120
tccatcttgg aaaatgacct ctccaagaat gagccagaaa gtgtgaggaa gaacctggag 180
atthttgaagc agaacatgca cgaactccag cttggttcta cctatccgtt gtatgacaag 240
aatgcttatg atctgtacca agatcacttc tgggacctg atacagataa caatttcagc 300
aaggacaact catggtacct ggcttattca attccagaca ccggggaatc ccagataagg 360
aagttctctg cacttgcaag atatgaatgg caacgtggca actacaaaca agcaacattc 420
tatcttgggtg aggccatgca ctactttggt gatatagaca caccctacca ccctgccaat 480
gtcactgctg ttgacagtgc tggcgggtgtt aagtttggga cctttgctga agagagaaaa 540
gagcagtaca agataaacac agccggctgc aaaacaaatg aggctttcta tgctgacatc 600
ttgaagaaca aagatttcaa tgcttggtca aaagagtatg ccagagggtt tgccaaaact 660
ggaaaatcca tctattacag ccattgccagc atgagccaca gttgggatga ctgggattat 720
gctgcaaaag ttactttggc aaactctcag aaaggaactg ctggttacat ctaccgattc 780
ctccatgatg tcagtgaggg caatgatccc tctgttggca agaattgtgaa agagcttggt 840
gcttacatat caacttctgg tgagaaagat gctggaactg atgactacat gtatttcgga 900
atcaagacaa aggatggaaa gaccaagaa tgggaaatgg acaaccctgg aaatgacttt 960
atgaccgggtt caaaggacac ttacactttc aagctgaagg atgaaaatct caagattgat 1020
gacattcaaa acatgtggat tcgtaaaagg aaatacacag catttccaga tgcttataag 1080
ccggaaaaca tcaaggatcat agcaaatgga aaggttgctg tggacaagga tatcaatgag 1140
tggatttctg gcaattcaac ctacaatatc aaagatgagc tttga 1185
```

<210> 8

<211> 394

<212> PRT

<213> Sequencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusão quimicamente sintetizada da proteína de alfa-toxina madura mutada de *C. perfringens* do peptídeo direcionado ao retículo endoplasmático de zeína de 15 kDa, e peptídeo de retenção KDEL ER

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> RE com zeína de 15 kDa peptídeo direcionado

<220>

<221> misc_feature
 <222> (22)..(391)
 <223> Proteína de alfa-toxina madura mutada de *C. perfringens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (391)..(394)
 <223> Peptídeo de retenção KDEL ER

<400> 8

Met Ala Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ser Ala Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His
 20 25 30

Ala Met Ile Val Thr Gln Gly Ile Ser Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser
 35 40 45

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

Asn Met His Glu Leu Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Leu Tyr Asp Lys
 65 70 75 80

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

Asn Asn Phe Ser Lys Asp Asn Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro
 100 105 110

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

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

Ala Met His Tyr Phe Gly Asp Ile Asp Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn
 145 150 155 160

Val Thr Ala Val Asp Ser Ala Gly Gly Val Lys Phe Gly Thr Phe Ala
 165 170 175

Glu Glu Arg Lys Glu Gln Tyr Lys Ile Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr
 180 185 190

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

Trp Ser Lys Glu Tyr Ala Arg Gly Phe Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile
 210 215 220

Tyr Tyr Ser His Ala Ser Met Ser His Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr
 225 230 235 240
 Ala Ala Lys Val Thr Leu Ala Asn Ser Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr
 245 250 255
 Ile Tyr Arg Phe Leu His Asp Val Ser Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val
 260 265 270
 Gly Lys Asn Val Lys Glu Leu Val Ala Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu
 275 280 285
 Lys Asp Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Met Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys
 290 295 300
 Asp Gly Lys Thr Gln Glu Trp Glu Met Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe
 305 310 315 320
 Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn
 325 330 335
 Leu Lys Ile Asp Asp Ile Gln Asn Met Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr
 340 345 350
 Thr Ala Phe Pro Asp Ala Tyr Lys Pro Glu Asn Ile Lys Val Ile Ala
 355 360 365
 Asn Gly Lys Val Val Val Asp Lys Asp Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly
 370 375 380
 Asn Ser Thr Tyr Asn Ile Lys Asp Glu Leu
 385 390

<210> 9
 <211> 1269
 <212> DNA
 <213> Sequencia artificial

<220>
 <223> Codifica fosfolipase C mutante com cauda de histidina, sítio de reco-
 nhecimento
 de trombina, cauda de S and sítio de reconhecimento de enteroquinase

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1269)
 <223> Sequencia que codifica proteina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(159)
 <223> Sequencia codificando para cauda de histidina, sítio de reconheci-
 mento de
 trombina, Cauda de S e sítio de reconhecimento de enteroquinase

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (325)..(327)
<223> Codifica Mutação D84L (Ácido aspártico a Leucina no aminoácido 84
da proteína nativa)

-
<220>
<221> misc_feature
<222> (601)..(603)
<223> Codifica Mutação H176G (Histidina a Glicina no aminoácido 176
da proteína nativa)

-
<220>
<221> misc_feature
<222> (613)..(615)
<223> Codifica Mutação E180G (Ácido glutâmico a Glicina no aminoácido 180
da proteína nativa)

<400> 9
atgcatcacc atcaccatca ctccgcgggt ctggtgccac gcggtagtag tgcaattggt 60
atgaaagaaa ccgctgctgc taaattcgaa cgccagcaca tggacagccc agatctgggt 120
accggtgggt gctccggtga tgacgacgac aagagtccat gggatggaaa gattgatggc 180
actggcactc atgccatgat tgtgactcaa gggatttcca tcttggaaaa tgacctctcc 240
aagaatgagc cagaaagtgt gaggaagaac ctggagattt tgaagcagaa catgcacgaa 300
ctccagcttg gttctaccta tccgttgtat gacaagaatg cttatgatct gtaccaagat 360
cacttctggg accctgatac agataacaat ttcagcaagg acaactcatg gtacctggct 420
tattcaattc cagacaccgg ggaatcccag ataaggaagt tctctgcact tgcaagatat 480
gaatggcaac gtggcaacta caaacaagca acattctatc ttggtgaggc catgcactac 540
tttggtgata tagacacacc ctaccacct gccaatgtca ctgctgttga cagtgtggc 600
ggtgttaagt ttgggacctt tgctgaagag agaaaagagc agtacaagat aaacacagcc 660
ggctgcaaaa caaatgaggc tttctatgct gacatcttga agaacaaaga tttcaatgcc 720
tggtcaaaaag agtatgccag aggttttgcc aaaactggaa aatccatcta ttacagccat 780
gccagcatga gccacagttg ggatgactgg gattatgctg caaaagttac ttgggcaaac 840
tctcagaaaag gaactgctgg ttacatctac cgattcctcc atgatgtcag tgagggcaat 900
gatccctctg ttggcaagaa tgtgaaagag cttgttgctt acatatcaac ttctggtgag 960
aaagatgctg gaactgatga ctacatgtat ttcggaatca agacaaagga tggaaagacc 1020
caagaatggg aaatggacaa ccctggaaat gactttatga ccggttcaaa ggacacttac 1080
actttcaagc tgaaggatga aaatctcaag attgatgaca ttcaaaacat gtggattcgt 1140
aaaaggaaat acacagcatt tccagatgcc tataagccgg aaaacatcaa ggtcatagca 1200
aatggaaaag ttgtcgtgga caaggatata aatgagtgga tttctggcaa ttcaacctac 1260
aatatcaaaa 1269

<210> 10
<211> 423
<212> PRT

```

```

<213> Sequencia artificial

<220>
<223> Proteína quimicamente sintetizada codificada pela SEQ ID NO:9

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(423)
<223> Fosfolipase C mutante com cauda de histidina, sítio de reconhecimento
de
trombina, cauda de S e sítio de reconhecimento de enteroquinase

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(53)
<223> Cauda de histidina, sítio de reconhecimento de trombina, cauda de S e
sítio de reconhecimento de enteroquinase

<220>
<221> misc_feature
<222> (109)..(109)
<223> Mutação D84L (Ácido aspártico a Leucina no aminoácido 84
da proteína nativa)

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)..(201)
<223> Mutação H176G (Histidina a Glicina no aminoácido 176 da proteína
nativa)

<220>
<221> misc_feature
<222> (205)..(205)
<223> Mutação E180G (Ácido glutâmico a Glicina no aminoácido 180
da proteína nativa)

<400> 10

Met His His His His His His Ser Ala Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
1          5          10          15

Thr Ala Ile Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
20          25          30

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Asp Asp
35          40          45

Asp Asp Lys Ser Pro Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His
50          55          60

Ala Met Ile Val Thr Gln Gly Ile Ser Ile Leu Glu Asn Asp Leu Ser
65          70          75          80

Lys Asn Glu Pro Glu Ser Val Arg Lys Asn Leu Glu Ile Leu Lys Gln
85          90          95

Asn Met His Glu Leu Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Leu Tyr Asp Lys
100         105         110

```

Asn Ala Tyr Asp Leu Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asp
 115 120 125

Asn Asn Phe Ser Lys Asp Asn Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro
 130 135 140

Asp Thr Gly Glu Ser Gln Ile Arg Lys Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr
 145 150 155 160

Glu Trp Gln Arg Gly Asn Tyr Lys Gln Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu
 165 170 175

Ala Met His Tyr Phe Gly Asp Ile Asp Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn
 180 185 190

Val Thr Ala Val Asp Ser Ala Gly Gly Val Lys Phe Gly Thr Phe Ala
 195 200 205

Glu Glu Arg Lys Glu Gln Tyr Lys Ile Asn Thr Ala Gly Cys Lys Thr
 210 215 220

Asn Glu Ala Phe Tyr Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala
 225 230 235 240

Trp Ser Lys Glu Tyr Ala Arg Gly Phe Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile
 245 250 255

Tyr Tyr Ser His Ala Ser Met Ser His Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr
 260 265 270

Ala Ala Lys Val Thr Leu Ala Asn Ser Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr
 275 280 285

Ile Tyr Arg Phe Leu His Asp Val Ser Glu Gly Asn Asp Pro Ser Val
 290 295 300

Gly Lys Asn Val Lys Glu Leu Val Ala Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Glu
 305 310 315 320

Lys Asp Ala Gly Thr Asp Asp Tyr Met Tyr Phe Gly Ile Lys Thr Lys
 325 330 335

Asp Gly Lys Thr Gln Glu Trp Glu Met Asp Asn Pro Gly Asn Asp Phe
 340 345 350

Met Thr Gly Ser Lys Asp Thr Tyr Thr Phe Lys Leu Lys Asp Glu Asn
 355 360 365

Leu Lys Ile Asp Asp Ile Gln Asn Met Trp Ile Arg Lys Arg Lys Tyr
 370 375 380

Thr Ala Phe Pro Asp Ala Tyr Lys Pro Glu Asn Ile Lys Val Ile Ala
385 390 395 400

Asn Gly Lys Val Val Val Asp Lys Asp Ile Asn Glu Trp Ile Ser Gly
405 410 415

Asn Ser Thr Tyr Asn Ile Lys
420

<210> 11
<211> 1116
<212> DNA
<213> Sequencia artificial

<220>
<223> Codifica fosfolipase C mutante com dois aminoácidos extras

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1116)
<223> Sequencia que codifica proteína

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> Sequencia codificando para dois aminoácidos introduzidos durante amplificação PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (172)..(174)
<223> Codifica Mutação D84L (Ácido aspártico a Leucine no aminoácido 84 da proteína nativa)

<220>
<221> misc_feature
<222> (448)..(450)
<223> Codifica Mutação H176G (Histidina a Glicina no aminoácido 176 da proteína nativa)

<220>
<221> misc_feature
<222> (460)..(462)
<223> Codifica Mutação E180G (Ácido glutâmico a Glicina no aminoácido 180 da proteína nativa)

<400> 11
atgagttggg atggaaagat tgatggcact ggcactcatg ccatgattgt gactcaaggg 60
atttccatct tggaaaatga cctctccaag aatgagccag aaagtgtgag gaagaacctg 120
gagattttga agcagaacat gcacgaactc cagcttggtt ctacctatcc gttgtatgac 180
aagaatgctt atgatctgta ccaagatcac ttctgggacc ctgatacaga taacaatttc 240
agcaaggaca actcatggta cctggccttat tcaattccag acaccgggga atcccagata 300
aggaagttct ctgcacttgc aagatatgaa tggcaacgtg gcaactacaa acaagcaaca 360
ttctatcttg gtgaggccat gcaactcttt ggtgatatag acacacccta ccaccctgcc 420
aatgtcactg ctggtgacag tgctggcggg gttaagtttg ggacctttgc tgaagagaga 480

```

aaagagcagt acaagataaa cacagccggc tgcaaaacaa atgaggcttt ctatgctgac      540
atcttgaaga acaaagattt caatgcctgg tcaaaagagt atgccagagg ttttgccaaa      600
actggaaaat ccatctatta cagccatgcc agcatgagcc acagttggga tgactgggat      660
tatgctgcaa aagttacttt ggcaaactct cagaaaggaa ctgctgggta catctaccga      720
ttcctccatg atgtcagtga gggcaatgat cctctgttg gcaagaatgt gaaagagctt      780
gttgcttaca tatcaacttc tggtgagaaa gatgctggaa ctgatgacta catgtatttc      840
ggaatcaaga caaaggatgg aaagacccaa gaatgggaaa tggacaaccc tggaaatgac      900
tttatgaccg gttcaaagga cacttacact ttcaagctga aggatgaaaa tctcaagatt      960
gatgacattc aaaacatgtg gattcgtaaa aggaaataca cagcatttcc agatgcctat     1020
aagccggaaa acatcaaggt catagcaaat ggaaagggtg tcgtggacaa ggatatcaat     1080
gagtggattt ctggcaattc aacctacaat atcaaa                                1116

```

```

<210> 12
<211> 372
<212> PRT
<213> Sequencia artificial

```

```

<220>
<223> Proteína sintetizada quimicamente codificada pela SEQ ID NO:11

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(423)
<223> Fosfolipase C mutante com dois aminoácidos extras

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> dois aminoácidos introduzidos durante a amplificação PCR

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Mutação D84L (Ácido aspártico a Leucina no aminoácido 84
da proteína nativa)

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (150)..(150)
<223> Mutação H176G (Histidina a Glicina no aminoácido 176
da proteína nativa)

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (154)..(154)
<223> Mutação E180G (Ácido glutâmico a Glicina no aminoácido 180
da proteína nativa)

```

```

<400> 12

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asn Ile Lys
 370

REIVINDICAÇÕES

1. Antígeno protetor para a imunização de aves contra enterite necrótica, o referido antígeno compreendendo o ID. DE SEQ. Nº: 4.
2. Polinucleotídeo que codifica o antígeno de acordo com a reivindicação 1.
3. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 2, compreendendo uma sequência selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. Nº: 3, ID. DE SEQ. Nº: 7, ID. DE SEQ. Nº: 9 e ID. DE SEQ. Nº: 11.
4. Antígeno de acordo com a reivindicação 1, em que o referido antígeno compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. Nº: 8, ID. DE SEQ. Nº: 10 e ID. DE SEQ. Nº: 12.
5. Método para a produção de um antígeno protetor como definido na reivindicação 1, o referido método compreendendo o constructo de um vetor de expressão de planta que contém uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o referido antígeno, a transformação de uma célula de planta com o referido vetor de expressão de planta, o cultivo da referida célula de planta transformada sob condições adequadas à produção do referido antígeno e o enriquecimento do referido antígeno da referida célula de planta transformada.
6. Método para a produção de um antígeno protetor como definido na reivindicação 1, o referido método compreendendo o constructo de um vetor de expressão procariótico que contém um polinucleotídeo que codifica o referido antígeno, a transformação de uma célula procariótica com o referido vetor de expressão procariótico, o cultivo da referida célula procariótica transformada sob condições adequadas à produção do referido antígeno e o enriquecimento do referido antígeno da referida célula procariótica transformada.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida célula procariótica é uma célula de *Pseudomonas fluorescens*.
8. Polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína que compreende os resíduos 29 a 398 do ID. DE SEQ. Nº: 2.
9. Proteína que compreende os resíduos 29 a 398 do ID. DE

SEQ. Nº: 2.

10. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 8, que codifica o ID. DE SEQ. Nº: 2.

11. Proteína de acordo com a reivindicação 9, que codifica o ID.
5 DE SEQ. Nº: 2.

PLC de cisne CLOPLC humana CLOPCA bovina PLC de galinha do tipo I PLC de galinha do tipo II PLC de galinha do tipo III PLC de galinha do tipo IV PLC de galinha do tipo V Alfa-toxina de galinha BBL PLC de galinha mutv1	1	60	(1) MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMITQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
	(1)	(1)	MKRKICKALICAAATSLWAGASTKVYAWDGKIDGTGTHAMIVTQGVILENDLSKNEPE
PLC de cisne CLOPLC humana CLOPCA bovina PLC de galinha do tipo I PLC de galinha do tipo II PLC de galinha do tipo III PLC de galinha do tipo IV PLC de galinha do tipo V Alfa-toxina de galinha BBL PLC de galinha mutv1	61	120	(61) SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEKDWYLYYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
	(61)	(61)	SVRKNLEILKENMHLEQLGSTYPDYDKNAYDLYQDHFWDPDTDNNEFSKDNSWYLAYSIPD
PLC de cisne CLOPLC humana CLOPCA bovina PLC de galinha do tipo I PLC de galinha do tipo II PLC de galinha do tipo III PLC de galinha do tipo IV PLC de galinha do tipo V Alfa-toxina de galinha BBL PLC de galinha mutv1	121	180	(121) TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE
	(121)	(121)	TGESQIRKFSALARYEWQRGNYKQATFYEGEAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAGHVKFE

FIG. 1A

		181	240
PLC de cisne			
CLOPLC humana		(181)	TFAE[REDACTED]QYKINT[REDACTED]G[REDACTED]KTN[REDACTED]FY[REDACTED]H[REDACTED]N[REDACTED]DFN[REDACTED]MSKE[REDACTED]AR[REDACTED]FAKT[REDACTED]K[REDACTED]Y[REDACTED]YSHA[REDACTED]MS[REDACTED]
CLOPCA bovina		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
PLC de galinha do tipo I		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
PLC de galinha do tipo II		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
PLC de galinha do tipo III		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
PLC de galinha do tipo IV		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
PLC de galinha do tipo V		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
Alfa-toxina de galinha BBL		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
PLC de galinha mutv1		(181)	TFAERKEQYKINTAGCKTNE[REDACTED]FY[REDACTED]DILKNKDFN[REDACTED]AWSKEYARGFAKTGKSIYYSHASMSH
		241	300
PLC de cisne		(241)	SWD[REDACTED]W[REDACTED]DYAAKV[REDACTED]LANSQKGT[REDACTED]GYIYRFLHDVS[REDACTED]G[REDACTED]D[REDACTED]S[REDACTED]KNV[REDACTED]ELVAYI[REDACTED]T[REDACTED]GEK[REDACTED]AGT[REDACTED]
CLOPLC humana		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
CLOPCA bovina		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo I		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo II		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo III		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo IV		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo V		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
Alfa-toxina de galinha BBL		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
PLC de galinha mutv1		(241)	SWDDWDYAAKVTLANSQKGTAGIYRFLHDVSEGN[REDACTED]DPSVGKNVKELVAYI[REDACTED]STSGEKDAGT[REDACTED]
		301	360
PLC de cisne		(301)	DDYMYFGIKTKDG[REDACTED]TQEW[REDACTED]MDNPGNDFMTGS[REDACTED]D[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
CLOPLC humana		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
CLOPCA bovina		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo I		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo II		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo III		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo IV		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
PLC de galinha do tipo V		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
Alfa-toxina de galinha BBL		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]
PLC de galinha mutv1		(301)	DDYMYFGIKTKDGKTQEWEMDNP[REDACTED]GNDFMTGSKD[REDACTED]TYTFELKD[REDACTED]NLKIDDIQNMWIRK[REDACTED]KYT[REDACTED]

FIG. 1B

PLC de cisne	(361)	FFDYPNKKIANGVVKKDINWISGNSYNIK	398
CLOPLC humana	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
CLOPCA bovina	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
PLC de galinha do tipo I	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
PLC de galinha do tipo II	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
PLC de galinha do tipo III	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
PLC de galinha do tipo IV	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
PLC de galinha do tipo V	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
Alfa-toxina de galinha BBL	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	
PLC de galinha mutv1	(361)	AFDAYKPENIKIANGKVVDKDKDINWISGNSYNIK	

FIG. 1C

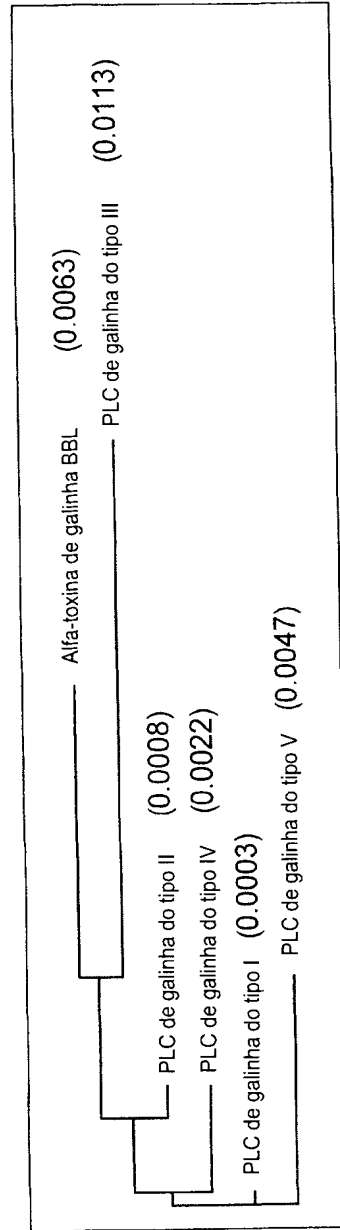


FIG. 2

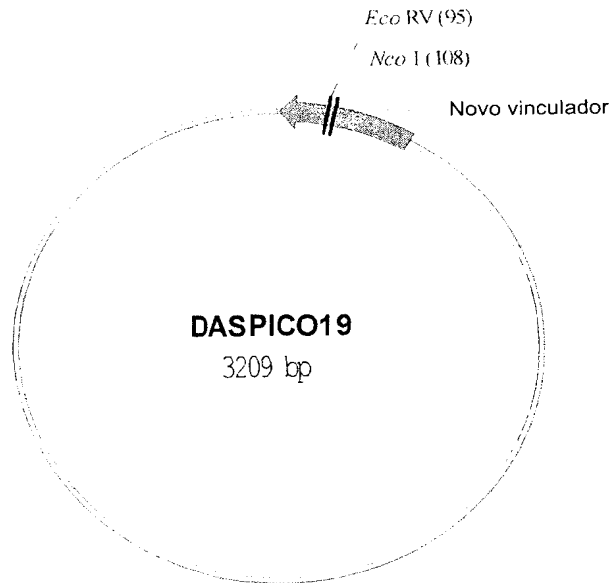


FIG. 3A

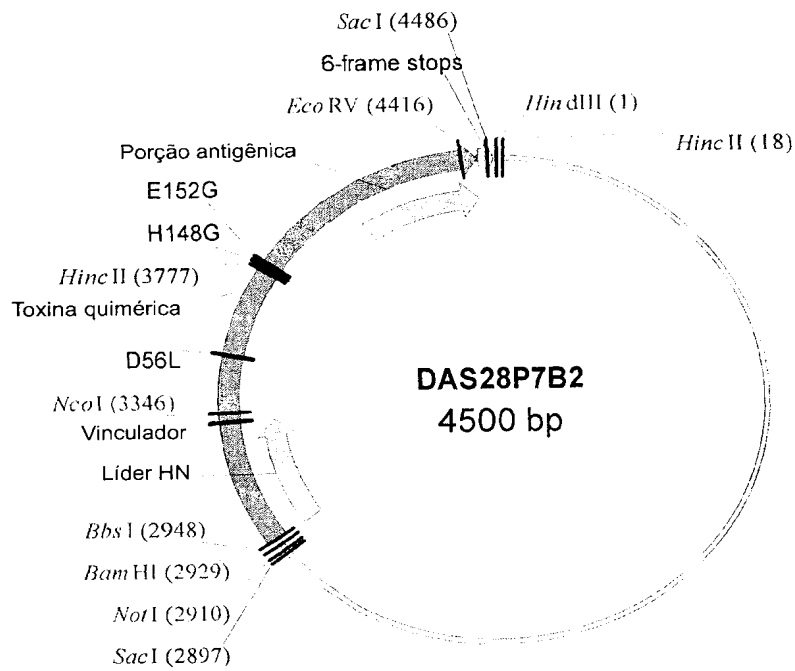


FIG. 3B

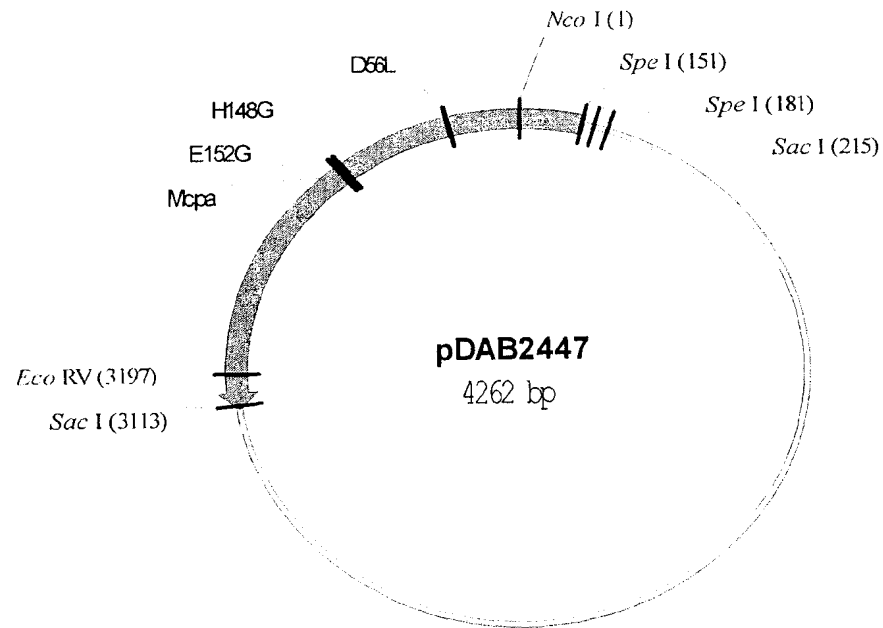


FIG. 3C

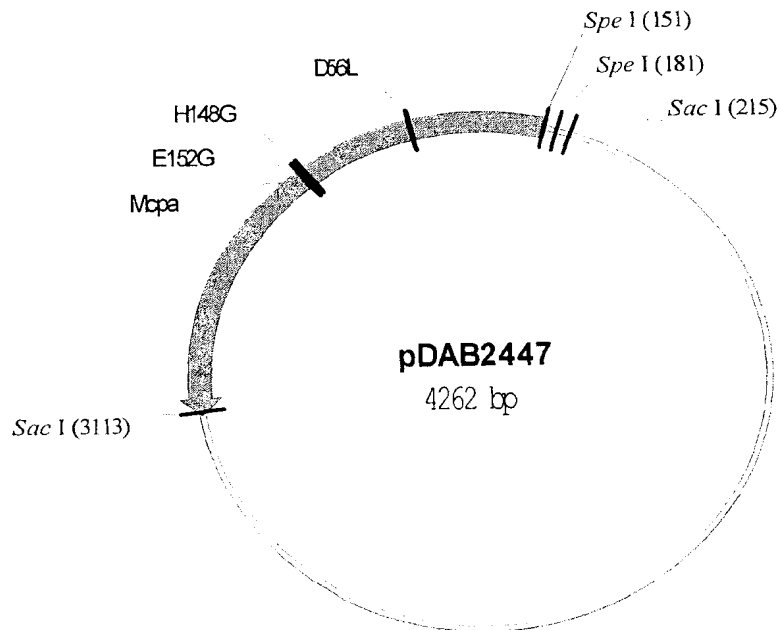


FIG. 3D

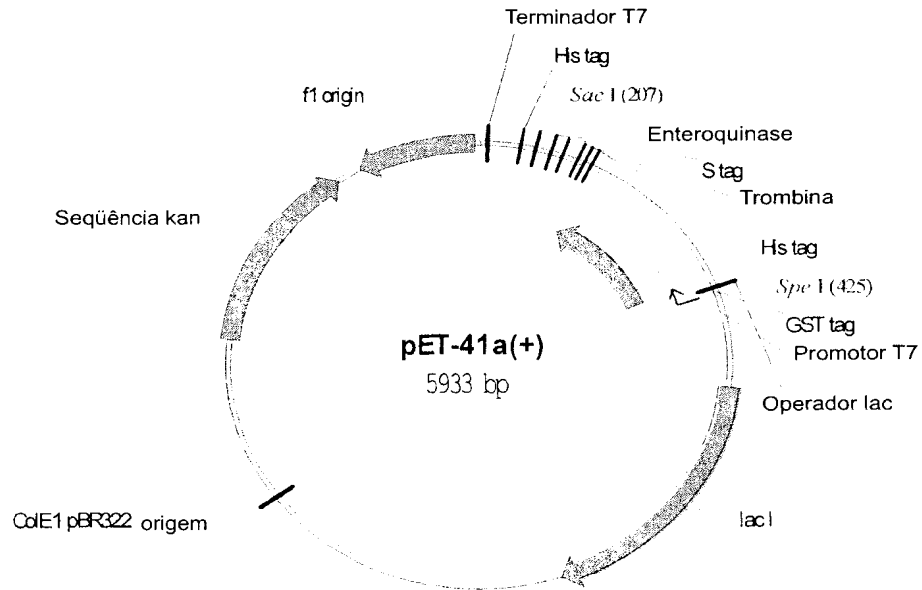


FIG. 3E

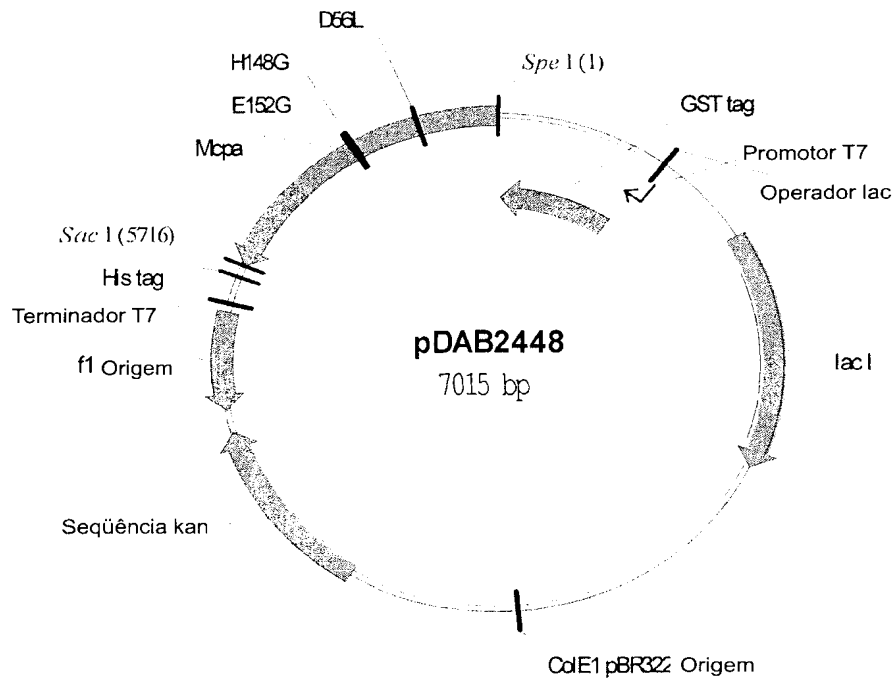


FIG. 3F

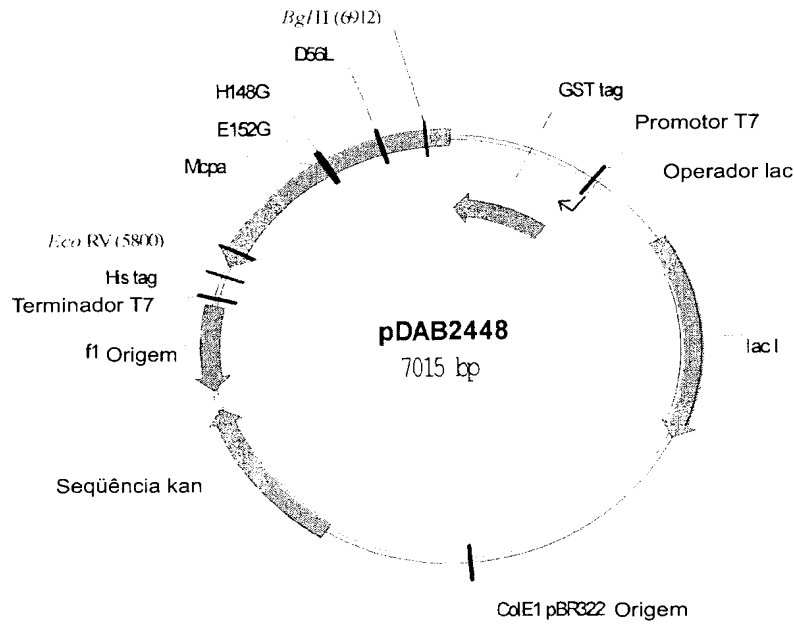


FIG. 4A

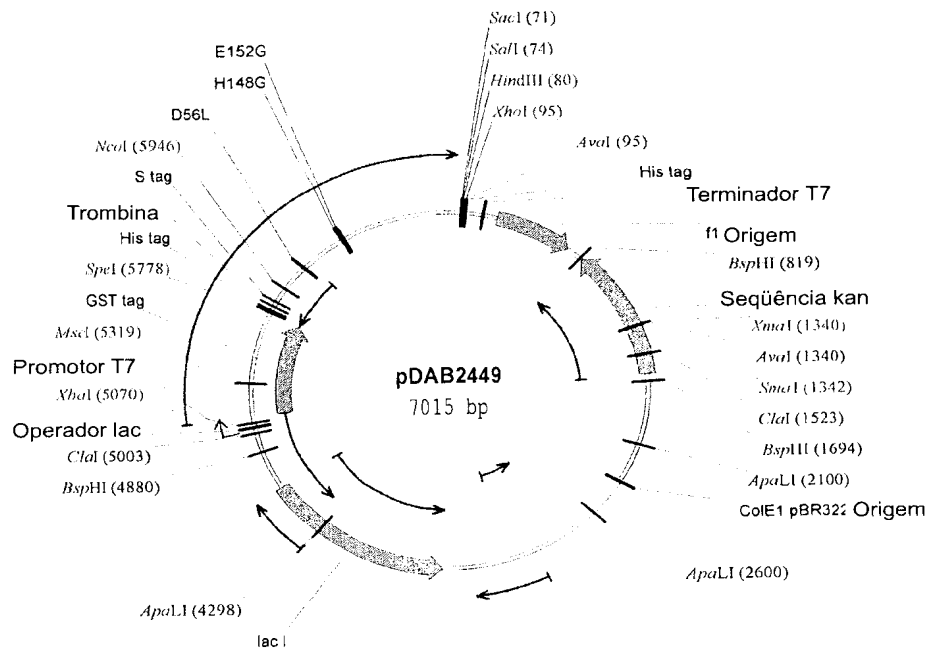


FIG. 4B

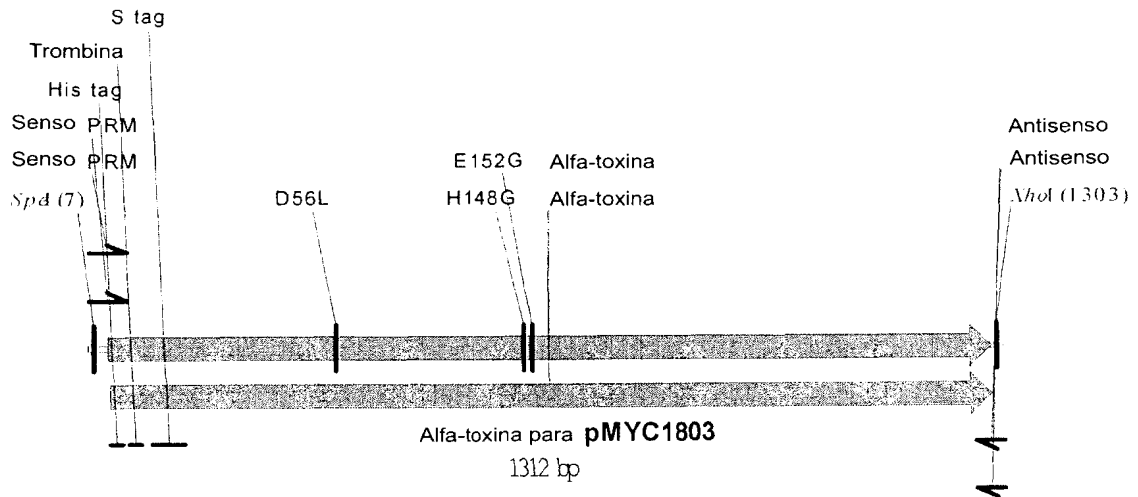


FIG. 5A

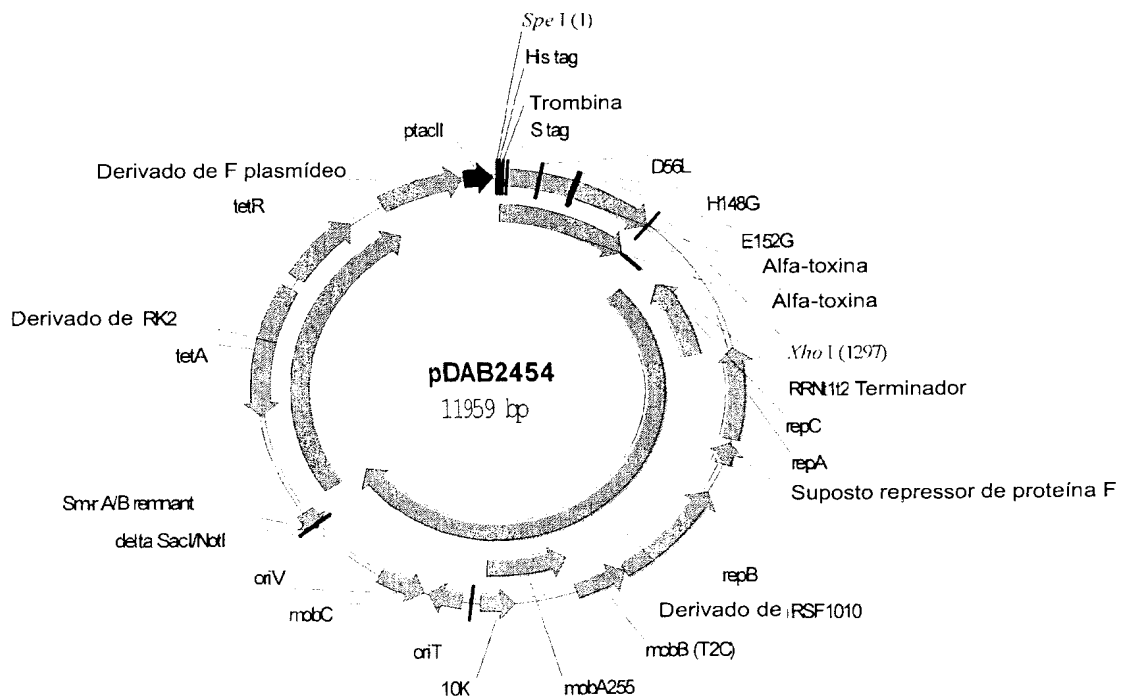


FIG. 5B

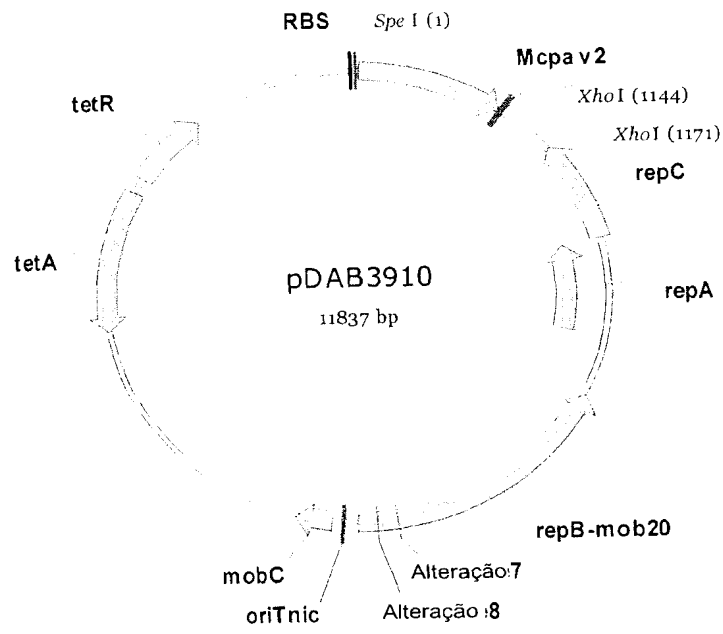


FIG. 6

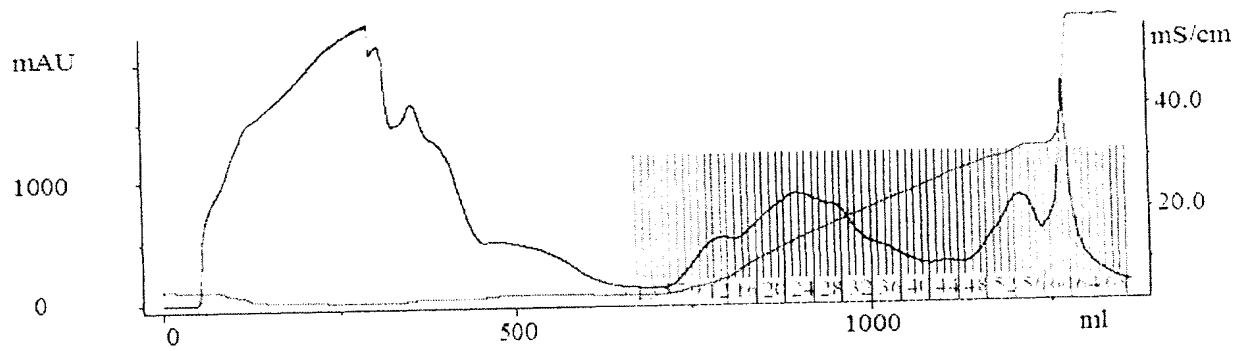


FIG. 7

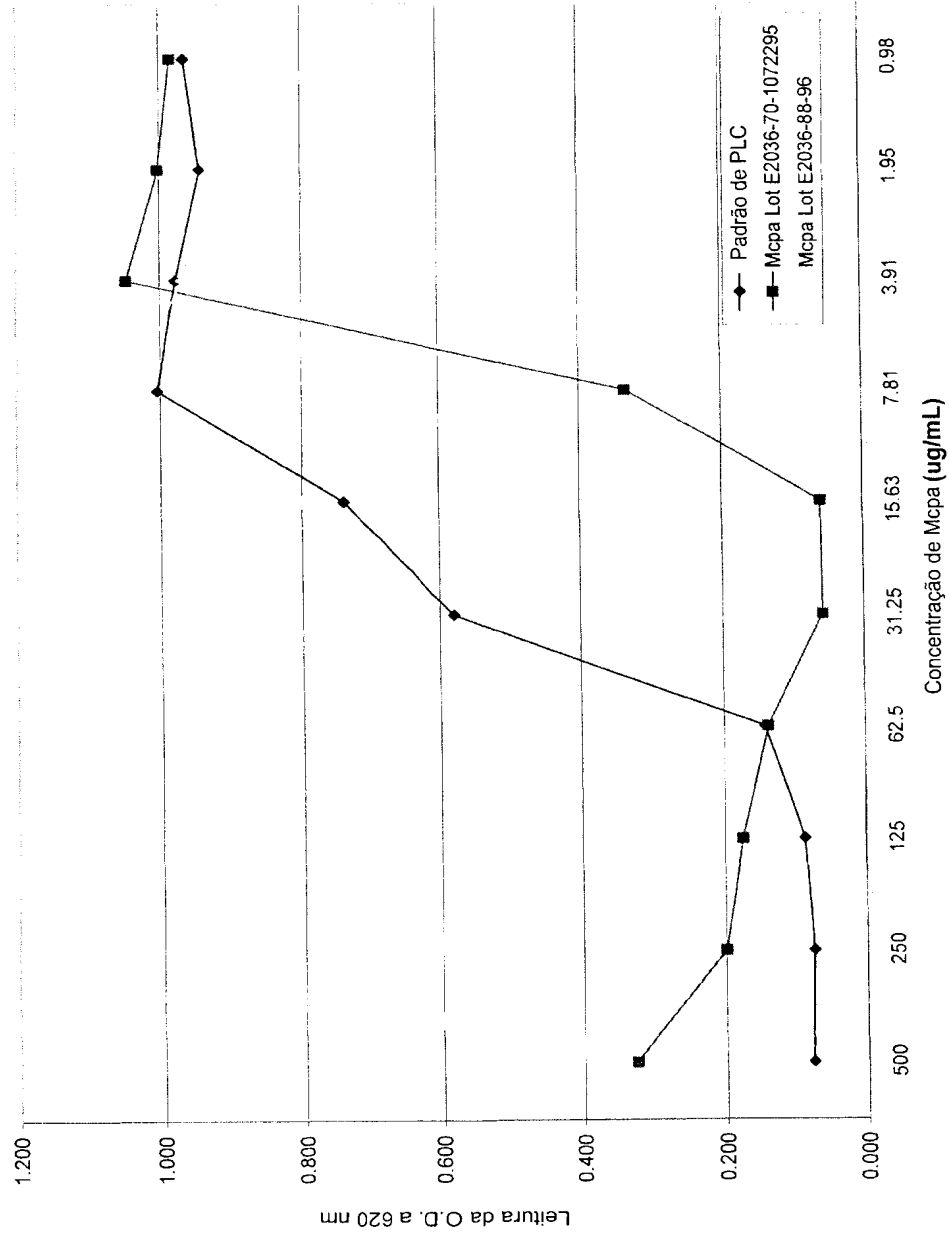


FIG. 8

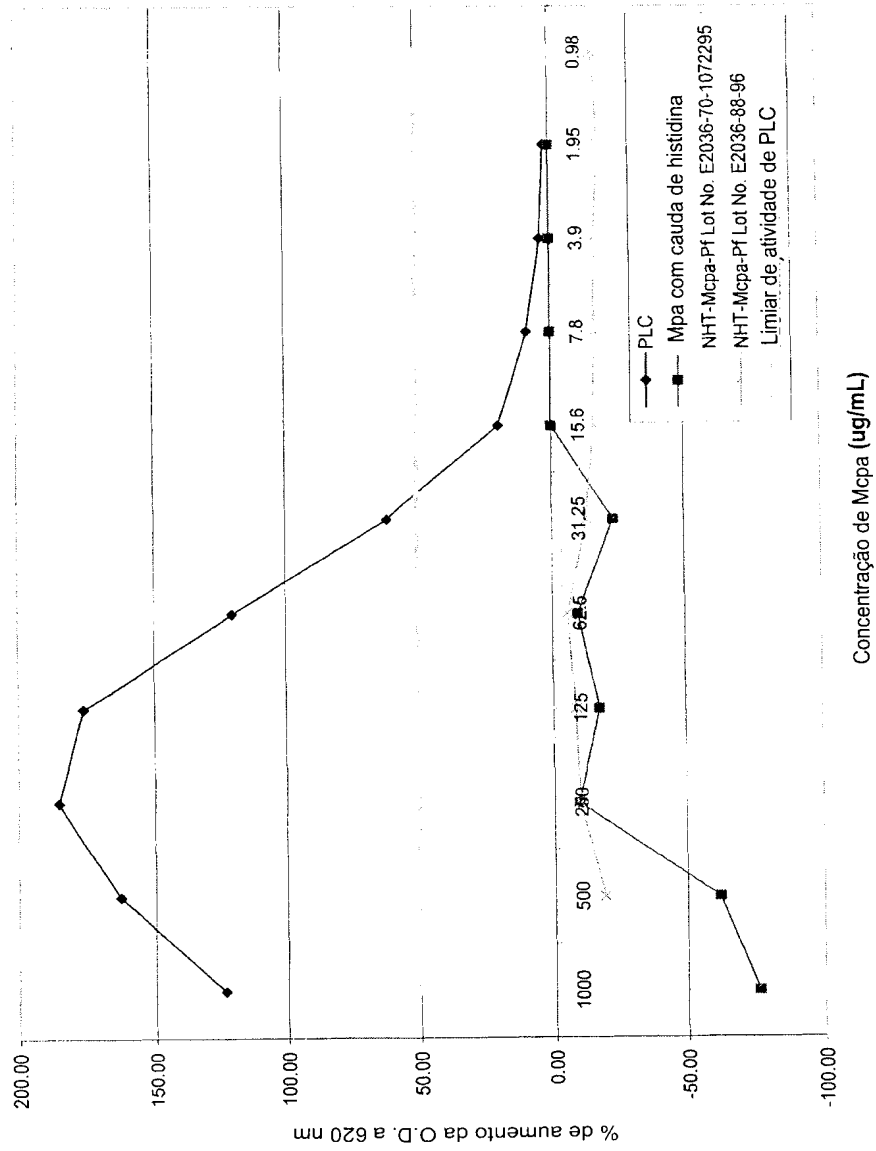


FIG. 9

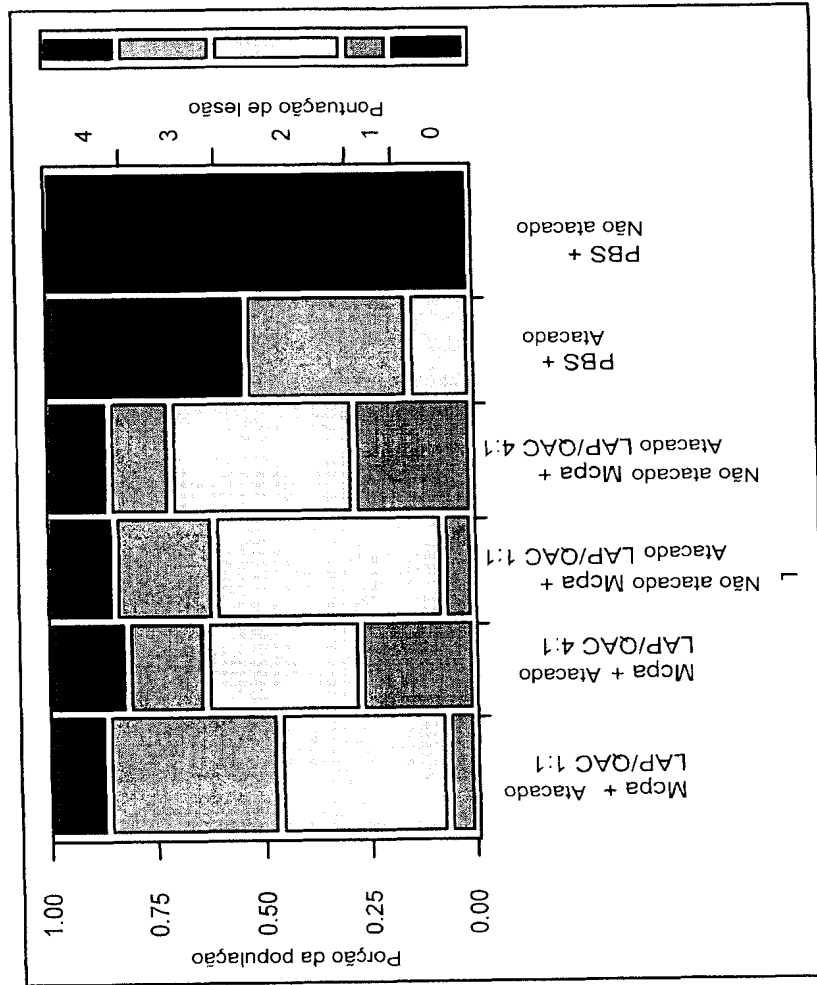


FIG. 10

RESUMO

Patente de Invenção: **"VACINA PARA AVES DOMÉSTICAS, PARA ENTERITE NECRÓTICA, COMPREENDENDO UM ANTÍGENO DE TOXINA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS MUTANTE, E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA VACINA"**.

5 A presente invenção refere-se, em parte, ao desenvolvimento de uma vacina para aves de criação contra enterite necrótica (NE). A vacina utiliza um antígeno protetor que é uma proteína de α -toxina mutada (Mcpa) de comprimento total não-tóxica de *Clostridium perfringens* (Cp). A utilidade dessa vacina foi demonstrada por redução da gravidade da lesão em exper-

10 imentos de ataque por NE, por exemplo. Também são aqui reveladas novas abordagens para a produção dessa vacina em quantidades significativas. Uma abordagem exemplificada envolve a produção de uma vacina contra NE (alfa-toxina mutada) em sistemas bacterianos de expressão, de preferência com a utilização do sistema de *Pseudomonas fluorescens*, para uso

15 comercial no controle de NE na indústria de aves de criação. As vacinas em questão podem ser administradas preferivelmente em galinhas de várias formas diferentes. Também é descrita uma nova alfa-toxina do Tipo VI de isolados de galinha de Cp.