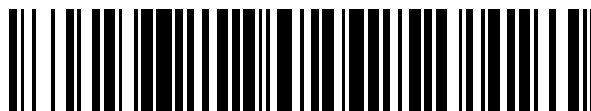


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 134**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07822693 .3**  
96 Fecha de presentación: **19.11.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2086578**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54 Título: **Uso de la bacteria Clostridium perfringens tipo C para la preparación de una vacuna**

30 Prioridad:  
**20.11.2006 EP 06124404**  
**20.11.2006 US 860447 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.05.2012**

73 Titular/es:  
**INTERVET INTERNATIONAL B.V.**  
**P.O. BOX 31 WIM DE KÖRVERSTRAAT 35**  
**5831 AN BOXMEER, NL**

72 Inventor/es:  
**WITVLIET, Maarten Hendrik;**  
**SMEETS, Jozef Franciscus Maria y**  
**REDHEAD, Keith**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 380 134 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de la bacteria *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna

- 5 La presente invención se refiere al uso de la bacteria *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna.

10 Las Clostridia son bacterias anaerobias formadoras de esporas Gram-positivas. Las Clostridia son ampliamente reconocidas como patógenos de animales tanto domésticos como salvajes. Una visión general de las diversas Clostridia y las enfermedades animales que producen se facilita por Songer, J.G. en *The Clostridia*; Capítulo 10: Clostridial Diseases in Animals, Molecular Biology and Pathogenesis, ed. Rood, J.I. y col., Academic Press Ltd (1997) ISBN 0-12-595020-9.

15 De las especies clostridiales actualmente conocidas, la *Clostridium perfringens* se considera algunas veces que es el patógeno bacteriano más extendido, y de todas las especies clostridiales, es ciertamente la causa más importante de enfermedad entérica clostridial en animales domésticos.

20 La especie *Clostridium perfringens* se subdivide en cinco tipos; tipo A-E, basándose en las principales toxinas que producen.

Los tipos A y C de *Clostridium perfringens*, y *Clostridium difficile*, son los principales patógenos clostridiales entéricos del cerdo.

25 Las infecciones entéricas clostridiales en cerdos se han descrito más específicamente por Songer, J.G. y Uzal, F.A. (J. Vet. Diagn. Invest 17: 528-536 (2005)).

30 *Clostridium perfringens* tipo C infecta cerdos, ganado vacuno, pollos, seres humanos, ovejas, perros y caballos. Los cochinitos son los más vulnerables a la infección por *Clostridium perfringens* tipo C. En cochinitos de 1-2 días de edad, la infección produce tasas de morbilidad de entre el 30%-50% e índices de letalidad del 50%-100%. Cochinitos mayores (1-2 semanas de edad) pueden tener una evolución más larga de la infección.

Las cerdas son la fuente común de infección.

35 El enfoque común para la protección de cochinitos es la vacunación de cerdas con una vacuna de *Clostridium perfringens* tipo C con el fin inducir anticuerpos que se transfieren a sus crías mediante el calostro. Esto conduce a un alto nivel de protección en cochinitos en ese momento de tiempo en el que son más vulnerables a la infección clostridial. Tales vacunas se basan en toxoides. Normalmente, son vacunas de sobrenadante desintoxicado en las que no están presentes células. Las vacunas de toxoide se han descrito, entre otros, por Springer, S. y Selbitz, H.-J. (FEMS Immun. and Medical Microbiol. 24: 333-336 (1999)).

40 *Clostridium perfringens* tipo A infecta corderos, cabras, terneros, pollos, cerdos caballos, perros y seres humanos. En cerdos completamente desarrollados, *Clostridium perfringens* tipo A es un miembro de la flora normal del intestino. Por tanto, actualmente se asume que cerdos completamente desarrollados no son adversamente afectados por la presencia de *Clostridium perfringens* tipo A en el intestino.

45 Sin embargo, puede producir enterocolitis necrótica porcina en cerdos neonatales y destetados. Las vacunas para la protección de cerdos contra *Clostridium perfringens* tipo A son raras. Actualmente sólo hay una vacuna (condicionalmente autorizada) comercialmente disponible.

50 Uno de los motivos para esto puede ser el hecho de que, como se ha dicho anteriormente, *Clostridium perfringens* tipo A sea un miembro de la flora normal. Por tanto, no se esperaría que desencadenara el sistema inmunitario.

55 Como consecuencia, no se esperaría que se indujera la producción de anticuerpos contra *Clostridium perfringens* tipo A. Si se indujeran anticuerpos, *Clostridium perfringens* tipo A no sobreviviría en el intestino, dejando de ser un miembro de la flora normal. Como otra consecuencia, por supuesto no se esperaría que las cerdas transmitieran alguna protección a sus crías por el calostro. Por cualquier motivo, parece que *Clostridium perfringens* tipo A no induce inmunoestimulación suficiente. Selbitz y col. (Tierärztl Prax. 28(G) :337-340; (2000)) describen el uso de vacunas específicas para rebaño contra la infección por C. perfringens tipo A.

60 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que las vacunas contra *Clostridium perfringens* tipo C que comprenden sobrenadante de cultivo desintoxicado pueden inducir protección cruzada contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

65 Se encontró más sorprendentemente que la vacunación de cerdas con sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C conduce a una protección significativa de sus cochinitos contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

Se encontró incluso más sorprendentemente que incluso las cerdas rinden mejor después de esta vacunación. Esto es sorprendente debido a que generalmente se asumía, como se ha mencionado anteriormente, que los cerdos completamente desarrollados, tales como cerdas, no estaban afectados adversamente por infección por *Clostridium perfringens* tipo A. Este hallazgo demuestra por primera vez que lo opuesto es el caso.

5 Por tanto, una primera realización de la presente invención se refiere al uso de una bacteria de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cerdos completamente desarrollados contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

10 Una segunda realización de la presente invención se refiere al uso de una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cerdas contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

15 Una tercera realización de la presente invención se refiere al uso de una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para cerdas, para la protección de cochinitos contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

20 Una cuarta realización de la presente invención se refiere al uso de una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cochinitos contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

Como el experto entenderá, de hecho, el uso de una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna es un procedimiento de dos etapas: la bacteria *Clostridium perfringens* tipo C se usa para el crecimiento en un medio de cultivo con el fin de obtener el sobrenadante de cultivo que es la base para la preparación de la vacuna según la invención.

25 Por tanto, otra realización de la presente invención se refiere al uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cerdos completamente desarrollados contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

30 Todavía otra realización de la presente invención se refiere al uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cerdas contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

35 De nuevo, otra realización de la presente invención se refiere al uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para cerdas, para la protección de cochinitos contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

40 También una realización de la presente invención se refiere al uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cochinitos contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.

45 Dentro del tipo de toxina de *Clostridium perfringens* tipo C puede hacerse una división entre aquellas cepas que producen toxinas beta-2 y aquellas cepas que no producen. Aproximadamente el 40% de todas las cepas de *Clostridium perfringens* tipo C producen esta toxina.

Se encontró que una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C que produce toxina beta-2 es incluso más adecuada que una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C no productora de toxina beta-2. Tales cepas y su identificación se han descrito, entre otros, por Fisher, D.J. y col. (Inf. & Immun. 74: 5200-5210 (2006)).

50 Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a un uso en el que usa una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C que produce toxina beta-2.

55 Las vacunas preparadas como se ha descrito anteriormente no son ni mucho menos las únicas vacunas que se administran a cerdos en el proceso de cría de cerdos comercial. Las vacunas clostridiales se administran frecuentemente aproximadamente en el mismo momento que las vacunas contra otros organismos y virus patógenos del cerdo.

60 Por tanto, en otra realización preferida, la vacuna preparada como se describe en la presente invención comprende adicionalmente uno o más antígenos derivados de organismos o virus patógenos del cerdo, anticuerpos contra aquellos antígenos o información genética que codifica tales antígenos.

65 Tales organismos o virus se seleccionan preferentemente del grupo de virus de la pseudorabia, virus PRRS, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Brachyspira hyodysenteriae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Por tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a una vacuna preparada como se describe en la presente invención que comprende adicionalmente uno o más antígenos derivados de organismos o virus patógenos del cerdo, en la que estos organismos o virus se seleccionan del grupo de virus de la pseudorabia, virus PRRS, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, 5 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Brachyspira hyodysenteriae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

A continuación de la infección por *Clostridium perfringens*, los cochinitos frecuentemente sufren infección por 10 *Escherichia coli*. La *Escherichia coli* es la causa de otra grave enfermedad entérica en cochinitos. Por tanto, los cochinitos o las cerdas preñadas se vacunan frecuentemente con vacunas contra *Escherichia coli*. Las vacunas contra *E. coli* se usan comúnmente en el campo y están comercialmente disponibles.

Por tanto, es muy deseable una vacuna de combinación que comprenda tanto componentes de sobrenadante de 15 cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C como de vacuna contra *Escherichia coli* debido a que protege contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo C, *Clostridium perfringens* tipo A y *Escherichia coli*.

Por tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a una vacuna preparada como se describe en la 20 presente invención que comprende adicionalmente uno o más antígenos derivados del organismo patógeno del cerdo *Escherichia coli*.

La invención se ejemplifica en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Producción de antígeno de *Clostridium perfringens* tipo C

Una cepa de *Clostridium perfringens* tipo C estándar, la cepa 587 (también llamada CWC 1/S, de la Colección de 30 R.U. Weybridge) se cultivó en un fermentador hasta el comienzo de la fase de crecimiento estacionario. El cultivo se centrifugó y el sedimento que contenía las células bacterianas se desechó. Se añadió formaldehído al sobrenadante a una concentración final de 0,5% v/v para inactivar las toxinas, seguido de concentración por medio de ultrafiltración y filtración a 0,2 µm.

#### Preparación de vacunas

Se formuló una vacuna mezclando el antígeno de *Clostridium perfringens* tipo C y un adyuvante basado en tocoferol. 35 Cada dosis de vacuna (2 ml) comprendió 20 µl de un concentrado de sobrenadante de cultivo de toxoide de antígeno de *Clostridium perfringens* tipo C concentrado 17 veces.

La vacuna cumplió con la monografía de la Farmacopea europea 0363 (vacuna contra *Clostridium perfringens* para 40 uso veterinario) en lo referente a seguridad y potencia de las vacunas de tipo C.

Adicionalmente, en este experimento se añadieron antígenos de *E. coli* purificados (fimbrias F4ab, F4ac, F5 y F6 y 45 toxina lábil al calor) para suprimir la posible infección por *E. coli*. Estos componentes se conocen en la técnica, y el experto sabría cómo preparar una vacuna basándose de estos componentes.

Alternativamente, sin embargo, el experto podría usar una vacuna contra *E. coli* comercialmente disponible y lista 50 para uso tal como Porcilis Porcoli DF (obtenible por Intervet Int. B.V., Wim de Korverstraa 35, Boxmeer, Los Países Bajos).

La vacuna de control comprende los mismos componentes, excepto el antígeno de *Clostridium perfringens* tipo C, 55 que no estaba presente en el grupo de control.

#### Protección de cerdas

Una granja productora de cerdos holandesa en la que hubo un brote clínico de *Clostridium perfringens* tipo A se 60 seleccionó para un estudio de eficacia en campo de doble ciego aleatorizado. Se encontró que la cepa aislada de *Clostridium perfringens* tipo A de la granja producía tanto α-toxina como β2-toxina.

Las cerdas se vacunaron IM durante el embarazo a aproximadamente 6 y 2 semanas antes de parir con tanto una 65 vacuna que contenía antígenos de *E. coli* solos (grupo de control) como con una vacuna que contenía antígenos de *E. coli* y antígeno de *Clostridium perfringens* tipo C (grupo de prueba). Las vacunas se codificaron por color (2 x vacuna de prueba, 1 x vacuna de control) para asegurar el cegado, y la distribución de las cerdas con respecto a los grupos fue aproximadamente 2:1 (Tabla 1).

Tabla 1. Tamaños de grupo

Grupo	Número de cerdas	Número de cochinitos nacidos vivos por cerda	Número total de cochinitos
Control	41	11,6	453
Prueba	77	12,1	904

Desde el día de la primera vacunación hasta el momento del destete de los cochinitos (3-4 semanas después del parto), las cerdas se observaron cada 3 días para salud general, ingesta de alimentos y diarrea. Para facilitar el análisis estadístico se usó un sistema de puntuación clínico (Tabla 2). Los cochinitos nacidos de las cerdas vacunadas se observaron diariamente durante la primera semana de vida, una vez cada tres días a partir de una semana hasta el destete y después semanalmente hasta el final del periodo de cría. Se registraron la salud general, ingesta de alimentos, diarrea y mortalidad (Tabla 2).

10 Tabla 2 Sistema de puntuación usado para cerdas y cochinitos:

Puntuación clínica	Comportamiento	Apetito	Consistencia fecal	Composición fecal
0	Normal	Normal	Normal	Normal
1	Deprimido	Ligeramente inapetente	Blanda	Moco presente
2	Aletargado	Marcada inapetencia	Líquida	Moco con sangre presente
3	Moribundo	No mama	Acuosa	Sangre presente con cilindros intestinales

Resultados

Tabla 3. Observaciones clínicas de cerdas

Puntuación (N)		0	1	2	3	Media
Comportamiento general	Control	687	99	51	20	0,30
	Prueba	1623	33	0	0	0,02
Apetito	Control	597	139	71	49	0,50
	Prueba	1598	47	9	0	0,04
Consistencia fecal	Control	385	250	153	68	0,89
	Prueba	1564	67	17	7	0,07
Composición fecal	Control	780	71	4	0	0,09
	Prueba	1647	8	0	0	0,01

15 La Tabla 3 muestra el efecto de la vacunación con una vacuna que comprende los antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C en comparación con la vacunación con una vacuna sin antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C.

20 Como se deduce inequívocamente de la Tabla 3, la vacunación con la vacuna que comprende los antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C produjo una mejora muy significativa del estado de salud de las cerdas.

Protección de las crías de cerdas vacunadas

25 Por tanto, la tasa de mortalidad en las camadas de las cerdas que se habían vacunado con la vacuna que comprende los antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C se comparó con las camadas de las cerdas que se habían vacunado con una vacuna sin antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C.

30 Como se deduce inequívocamente de la Tabla 4, la tasa de mortalidad en las camadas de las cerdas que se había vacunado con la vacuna que comprende los antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C fue significativamente menor que en el grupo de control.

35 Además, la Tabla 5 muestra que los cochinitos de cerdas que se habían vacunado con la vacuna que comprende los antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C tenían puntuaciones clínicas significativamente menores que el grupo de control.

Tabla 4. Mortalidad semanal en las camadas de control y de prueba

Edad (días)	Control	Prueba
0-6	29	22
7-13	3	3
14-21	7	2
21-27	6	1
28-34	2	1
35-41	0	0
42-48	1	1
49-55	1	1
56-62	1	0
63-70	0	0
Total (%)	50 (11,04)	31 (3,43)

Tabla 5. Observaciones clínicas de cochinitos

Puntuación (N)		0	1	2	3	Media
Comportamiento general	Control	336	232	137	73	0,93
	Prueba	1159	271	55	11	0,28
Apetito	Control	426	166	128	58	0,77
	Prueba	1336	125	31	4	0,13
Consistencia fecal	Control	544	118	71	40	0,49
	Prueba	1419	48	17	12	0,08
Composición fecal	Control	636	104	31	6	0,24
	Prueba	1414	70	10	1	0,06

- 5 Conclusión: Los datos muestran que la vacunación de cerdas con una vacuna que contiene antígenos de *Clostridium perfringens* tipo C produce una mejora significativa del estado de salud de tanto las cerdas vacunadas como de sus crías en medio de un brote de *Clostridium perfringens* tipo A.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cerdos completamente desarrollados contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.
2. Uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cerdas contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.
- 10 3. Uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para cerdas para la protección de cochinitos contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.
4. Uso de un sobrenadante de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo C para la preparación de una vacuna para la protección de cochinitos contra la infección por *Clostridium perfringens* tipo A.
- 15 5. Uso según la reivindicación 1-4, **caracterizado por que** se usa una bacteria *Clostridium perfringens* tipo C que produce toxina beta-2.
- 20 6. Uso según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por que** para la preparación de dicha vacuna se usan adicionalmente uno o más antígenos derivados de organismos o virus patógenos del cerdo, anticuerpos contra aquellos antígenos o información genética que codifica tales antígenos.
- 25 7. Uso según la reivindicación 6, **caracterizado por que** dicho organismo o virus patógeno se selecciona del grupo de virus de la seudorrabia, virus PRRS, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Brachyspira hyodysenteriae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
8. Uso según la reivindicación 7, **caracterizado por que** dicho organismo patógeno del cerdo es *Escherichia coli*.