

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 484**

51 Int. Cl.:

A61K 39/08 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2006 E 06750659 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 1874344**

54 Título: **Vacuna de toxoide alfa de C. perfringens**

30 Prioridad:

18.04.2005 US 672289 P

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

21.09.2016

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL BV (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**JAYAPPA, HUCHAPPA y
O'CONNELL, KEVIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 583 484 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

Vacuna de toxoide alfa de *C. perfringens*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas que comprenden toxoides de tipo *alfa* de *C. perfringens*. La presente invención se refiere adicionalmente a métodos de uso de estas vacunas para proteger a los animales contra las enfermedades clostridiales. La presente invención también se refiere a métodos de fabricación de estas vacunas.

10

Antecedentes

El *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) es una bacteria anaeróbica que se encuentra de forma natural en el suelo, en la materia orgánica en descomposición y como parte de la flora intestinal normal de los animales, incluyendo los seres humanos. El *C. perfringens* es también el agente etiológico de numerosas enfermedades clostridiales que se encuentran en animales domésticos económicamente valiosos. El *C. perfringens* produce una serie de toxinas que causan efectos patógenos en animales, incluyendo la toxina *alfa*, la toxina *beta*, la toxina *beta* 2, la toxina *epsilon*, la toxina *teta*, la toxina *mu*, la toxina *delta*, la toxina *iota*, la toxina *kappa* y la toxina *lambda*. Además, el *C. perfringens* codifica otras sustancias biológicamente activas que pueden provocar efectos patológicos, incluyendo: la hialuronidasa, la fosfatasa ácida, la proteasa, la colagenasa, la sulfatasa y la neuraminidasa.

15

20

25

Las diferentes cepas de *C. perfringens* se señalan como los biotipos A a E, dependiendo del espectro de toxinas que produce la bacteria en particular [Justin *et al.*, *Biochemistry* 41:6253-6262 (2002); McDonel, *PHARMACOLOGY OF BACTERIAL TOXINS*; F Dorner y J Drews (eds.) Pergamon Press, Oxford (1986)]. Inicialmente, dicha tipificación se basaba en ensayos de neutralización serológicos en ratones o cobayas. Más recientemente, los métodos de tipificación molecular emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida a secuencias genéticas que codifican una de las numerosas toxinas de *C. perfringens*.

30

La clostridiosis intestinal en caballos se ha relacionado con altas concentraciones de *C. perfringens* de tipo A en el intestino. El equino afectado tiene una diarrea acuosa profusa y una alta tasa de mortalidad. El *C. perfringens* de tipo A también se ha ligado a la enfermedad entérica en cerdos amamantados y cerdos cebados, incluyendo los síntomas la enteritis necrotizante leve y la atrofia de las vellosidades [Songer, *Clin. Micro. Rev.* 9(2):216-234 (1996)].

35

Las enfermedades clostridiales provocadas por *C. perfringens* se caracterizan por la muerte súbita en aves carnosas con lesiones fibrinonecroticas confluentes ("toalla turca") en el intestino delgado (formas entéricas), y/o hepatitis asociada a *C. perfringens* con colangiohepatitis, o necrosis fibrinoide en el hígado. Las aves afectadas experimentan un curso rápido de depresión, diarrea y deshidratación. La mortalidad varía del 2 % al 50 %. La patología hepática conduce a la declaración de no apto para el consumo humano de los cadáveres en la matanza.

40

45

La enteritis necrótica (EN) es un ejemplo de una enfermedad entérica clostridial provocada por *C. perfringens* que conduce a consecuencias económicas importantes en aves de corral. La enfermedad es especialmente común en pollos de engorde criados en suelo de 2 a 10 semanas de edad, aunque la enfermedad también se ha notificado en pavos y gallinas ponedoras enjauladas. La enteritis necrótica se produce generalmente en aves de corral, ya sea como enfermedad secundaria o en una situación en la que se altera la microflora intestinal normal de manera que se permite la proliferación anormal del *C. perfringens* patógeno. La prevalencia de la enteritis necrótica subclínica es desconocida, ya que las lesiones solo pueden observarse a través de un examen post-mortem. Sin embargo, los informes del deterioro de la conversión del alimento y del peso corporal reducido se han atribuido a la enfermedad subclínica [Lovland y Kadhusdal, *Avian Path.* 30:73-81 (2001)]. Los factores predisponentes que conducen a la enteritis necrótica tanto en los brotes naturales como en los modelos experimentales incluyen: (a) la coccidiosis, (b) la migración de las larvas parasitarias, (c) los piensos ricos en harina de pescado o trigo y (d) las enfermedades inmunosupresoras. Además, la enteritis necrótica puede reproducirse experimentalmente: (i) proporcionando a los animales pienso contaminado por *C. perfringens*, (ii) administrando a los animales cultivos vegetativos por vía oral o en el cultivo o (iii) administrando por vía intraduodenal cultivos en caldo de toxinas en bruto libres de bacterias a los animales.

55

60

Los tipos A o C de *C. perfringens* son los dos biotipos que causan la enteritis necrótica en las aves de corral, siendo la toxina *alfa* la toxina detectada más común [Wages y Opengart, *Necrotic Enteritis*. págs.: 781-785, en: *Diseases of poultry*, 11ª edición, (eds., Saif *et al.*), Iowa State Press, Ames, IA (2003)]. De hecho, más del 90 % de los aislados de *C. perfringens* obtenidos de cuarenta y dos aves infectadas produjo una toxina *alfa* letal, junto con sialidasa, y las toxinas *teta* y *mu* [Daube *et al.*, *AJVR* 54:496-501 (1996)]. Además, la enterotoxina producida por el *C. perfringens* de tipo A se ha identificado en pollos con enteritis necrótica y puede desempeñar un papel en la enfermedad intestinal [Niilo, *Can. J. Comp. Med.* 42:357-363 (1978)].

65

Recientemente, se ha notificado que los *C. perfringens* de tipo A o de tipo C pueden codificar el gen *cpb2* [Gilbert *et al.*, *Gene* 203:56-73 (1997)] y expresar su producto, la toxina *beta* 2. Se ha observado una fuerte relación entre la

expresión de la toxina *beta* 2 y la enteritis neonatal en cerdos [Bueschel *et al.*, *Vet Micro* 94:121-129 (2003)]. También se ha implicado a la toxina *beta* 2 como factor patogénico en la enteritis de caballos y ganado. Bueschel *et al.*, citado anteriormente, informaron adicionalmente, que el 37,2 % de los tres mil veinte aislados de *C. perfringens* que obtuvieron codificaron la toxina *beta* 2 y de los aislados de *C. perfringens* de tipo A examinados, el 35,1 % codificaron la toxina *beta* 2. Se encontró que la muestra limitada (n = 5) de aislados de campo de *C. perfringens* de tipo A aviar fue positiva al ≈35 % para el genotipo *cpb2*, y el 40 % de éstos también expresaron la toxina *beta* 2. Además, empleando la PCR, Engstrom *et al.*, [*Vet Micro* 94:225-235 (2003)] encontraron que el 12 % de los aislados de *C. perfringens* de pollos con hepatitis también fueron positivos para *cpb2*. También se ha demostrado que la enterotoxina del *C. perfringens* de tipo A es patógena en pollos, provocando la acumulación de líquido en un modelo de bucle intestinal ligado [Niilo, *Appl. Micro.* 28:889-891 (1974)].

Los esfuerzos actuales para controlar el *C. perfringens* se basan en medidas sanitarias y de poner antibióticos en el pienso animal. El componente clostridial de la enfermedad responde bien a los antibióticos y generalmente es suprimido por los aditivos antibióticos para piensos y los fármacos anticoccidiales ionóforos. Sin embargo, los antibióticos son costosos y están sujetos a preocupaciones crecientes relacionadas con la promoción de la resistencia bacteriana.

La vacunación también se ha convertido en una importante medida de control en los animales domésticos, ya que el curso de muchas enfermedades asociadas a *C. perfringens* es rápido y con frecuencia mortal. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.292.307 define una vacuna multivalente "universal" preparada a partir de toxoides de *C. perfringens* de tipo A, de tipo B y de tipo D que incluye adicionalmente toxoides de *Cl. oedematiens* y toxoide de *Cl. septicum*. Además, hay vacunas disponibles en el mercado que con frecuencia son multivalentes y consisten en células inactivadas, toxinas o combinaciones de estas dos [véase, Songer, *Clin. Micro. Rev.* 9(2):216-234 (1996)].

La vacunación de ganado hembra también puede inducir la protección pasiva de su descendencia nacida posteriormente. La protección pasiva de los neonatos de mamíferos frente a infecciones clostridiales patológicas se basa en la transferencia de anticuerpos específicos en forma de anticuerpos del calostro. Por ejemplo, Smith y Matsuoka [*Am. J. Vet. Res.* 20:91-93 (1959)] emplearon una vacuna inactivada para inocular ovejas preñadas y notificaron la protección inducida por vía materna de los corderos jóvenes frente a la toxina *epsilon* de *C. perfringens*.

La inmunidad pasiva en los mamíferos jóvenes normalmente dura de 2 a 3 semanas [Songer, *Clin. Micro. Rev.* 9(2):216-234 (1996)].

A diferencia de los mamíferos lactantes, la inmunidad pasiva en las aves tiene varias deficiencias evidentes, en particular, la ausencia completa de los anticuerpos maternos que se obtienen de la leche. Aunque la inmunidad pasiva es solo una posible explicación para la correlación observada, Heier *et al.*, [*Avian Diseases* 45:724-732 (2001)] notificaron que la supervivencia de los pollos fue considerablemente mayor en la población de pollos de Engorde Noruego que tenían mayores títulos de anticuerpos maternos de origen natural específicos frente a la toxina *alfa* de *C. perfringens* que en las poblaciones que tenían títulos bajos. Además, Lovland *et al.* [*Avian Pathology* 33(1):83-92 (2004)] notificó resultados que fueron coherentes con la protección pasiva modesta de la progenie de las gallinas que habían sido inoculadas con las vacunas a base de toxoides de *C. perfringens* de tipo A o de tipo C, en comparación con la progenie de las gallinas sin vacunar.

Lovland *et al.* usaron una vacuna de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de tipo A a 1 TCP/ml, para una dosis intramuscular de 0,25 ml por gallina. La vacuna era una composición acuosa formulada con un adyuvante de hidróxido de aluminio (Alhidrogel™). Lovland *et al.* notificaron que "las respuestas inmunitarias fueron, en gran medida, independientes de los niveles de dosis que variaban de 0,25 a 1 ml".

Hasta ahora, la protección comercialmente importante frente a *C. perfringens* no parecía ser posible a menos que estuvieran presentes en el inóculo los anticuerpos maternos para la mayoría, si no todos, los componentes patológicos producidos por las bacterias *C. perfringens*. Por ejemplo, la vacunación de la presa con un producto que no contenga la enterotoxina solo ofrece una protección parcial a los lechones y el anticuerpo anti-toxina *epsilon* en cabras madre protege frente a la muerte por toxemia, pero no frente a la enterocolitis [Songer, *Clin. Micro. Rev.* 9(2):216-234 (1996)].

En efecto, a pesar de la tabulación de una cantidad impresionante de datos con respecto a los diversos biotipos de *C. perfringens* y sus correspondientes toxinas y sustancias bioactivas nocivas, las enfermedades clostridiales en animales de producción de alimentos siguen siendo un problema económico importante para los agricultores. Por tanto, existe una necesidad de proporcionar medios adicionales para proteger al ganado contra los efectos patológicos de *C. perfringens*. Más en particular, sigue habiendo una necesidad de proporcionar una vacuna segura y eficaz frente a *C. perfringens* en aves de corral. Además, existe una necesidad de proporcionar una vacuna simple frente a *C. perfringens* que pueda administrarse a animales hembras, especialmente ganado hembra fértil y/o preñado, que protegerá pasivamente su descendencia. La cita de cualquier referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia esté disponible como "técnica anterior" de la presente solicitud.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona vacunas frente a *C. perfringens* que comprenden un toxoide *alfa* de *C. perfringens* como antígeno. La presente invención proporciona adicionalmente vacunas que consisten esencialmente en un toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens* como antígeno, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Preferentemente, de una a dos dosis de 0,25 - 0,6 ml por dosis de una vacuna de la presente invención es suficiente para inducir al menos cuatro unidades de antitoxina (U.A.) de anticuerpo anti-toxina *alfa* por ml de antisuero de un animal (por ejemplo, un pollo) vacunado con la vacuna. En una realización de este tipo, la determinación de las unidades de antitoxina (U.A.) de anticuerpo anti-toxina *alfa* por ml de antisuero de un animal vacunado con la vacuna se realiza de seis a siete semanas después de la inmunización. En una realización particular, una sola dosis de la vacuna es suficiente para inducir al menos 4 unidades de antitoxina (U.A.) de anticuerpo anti-toxina *alfa* por ml de antisuero del animal vacunado, mientras que, en una realización alternativa, son necesarias dos dosis de la vacuna. En una realización, el antígeno uno tiene 2 o más unidades de potencia de combinación total (TCP, del inglés *Total Combination Power*).

En una de dichas realizaciones el animal es un ave. En una realización particular, el ave es un pollo. En otra realización, el ave es un pavo.

En una realización, el antígeno se originó a partir de una célula de *C. perfringens* de tipo A, por ejemplo, un *alfa* toxoide de *C. perfringens* de tipo A.

En una realización, una vacuna de la presente invención comprende un antígeno que es antígeno de un solo tipo de *C. perfringens*, a condición de que solamente esté presente antígeno de un solo tipo de *C. perfringens* en dicha vacuna. En una realización particular de este tipo, el *C. perfringens* es de tipo A. En una realización específica, la vacuna comprende un sobrenadante de toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens*, de tipo A.

En una vacuna de la presente invención, el antígeno es un toxoide *alfa* de una toxina *alfa* codificada de forma natural por una célula de *C. perfringens*. En otra vacuna de la presente invención, el antígeno es un polipéptido recombinante, es decir, uno que es codificado por un gen que ha sido manipulado genéticamente. En una realización de este tipo, el polipéptido recombinante es un toxoide *alfa* en el que las regiones enzimáticas de la *alfa* toxina correspondiente se han retirado o alterado genéticamente, pero, uno o más epítopos antigénicos se han conservado.

En una realización particular, el antígeno está en una preparación de células enteras. En otra realización, el antígeno está en una preparación sin células. En otra realización más, el antígeno es un toxoide *alfa* en un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*. En una realización particular de este tipo, el sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* es también una preparación sin células.

En otro aspecto de la presente invención, una vacuna también puede contener múltiples antígenos que pueden dar como resultado la producción de anticuerpos de diversas especificidades cuando se administra a un sujeto animal. No es necesario que todos estos anticuerpos sean protectores frente a una enfermedad. En una realización particular de este tipo, dichos antígenos también son de *C. perfringens*. Por tanto, una vacuna de la presente invención puede contener otros diversos factores patógenos activos o inactivados, junto con un toxoide *alfa*. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, el toxoide *alfa* puede combinarse con otras células, toxoides y extractos clostridiales y no clostridiales así como fragmentos antigénicos inactivos de toxina *alfa*.

Una vacuna multivalente de este tipo de la presente invención comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens* y comprende adicionalmente un antígeno viral y/o un antígeno bacteriano y/o un antígeno parasitario. En una realización particular de este tipo, la fuente viral del antígeno es el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa. En otra realización, la fuente viral del antígeno es el virus de la bronquitis infecciosa. En otra realización más, la fuente viral del antígeno es el reovirus. En otra realización más, la fuente viral del antígeno es el virus de la enfermedad de Newcastle. En otra realización más, la fuente bacteriana del antígeno es *E. coli*. En otra realización más, la fuente bacteriana del antígeno es *Salmonella*. En otra realización más, la fuente bacteriana del antígeno es *Campylobacter*. En otra realización más, la fuente parasitaria del antígeno es *Eimeria*. En una realización particular de esta tipo, el antígeno empleado en la vacuna es una parte de un merozoíto de *Eimeria*, un ooquiste de *Eimeria* o una mezcla de los mismos. En una realización relacionada, el hospedador natural del parásito es un ave. En una realización particular de este tipo, el parásito es *Eimeria* y el hospedador natural del parásito es un pollo.

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

En una vacuna multivalente particular de la presente invención, la vacuna comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens* y comprende adicionalmente uno o más antígenos virales del virus de la enfermedad infecciosa de la

bolsa, y/o el virus de la bronquitis infecciosa, y/o el reovirus, y/o el virus de la enfermedad de Newcastle, y/o antígenos bacterianos de *E. coli*, y/o *Salmonella*, y/o *Campylobacter*, y/o un antígeno parasitario de *Eimeria*.

5 En una realización alternativa, una vacuna multivalente de la presente invención consiste esencialmente en un toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens*. En una realización relacionada, la vacuna contiene adicionalmente un antígeno viral y/o un antígeno bacteriano y/o un antígeno parasitario, como se proporciona en el presente documento.

10 Una vacuna de la presente invención también puede comprender un adyuvante. Un adyuvante animal popular es un adyuvante de hidróxido de aluminio. Un adyuvante alternativo puede estar comprendido en una emulsión de agua-en-aceite junto con el antígeno. En una vacuna particular de este tipo, la emulsión de agua-en-aceite se prepara con una fase de aceite del 70 % y una fase acuosa del 30 %. En otra realización, el adyuvante específicamente no es un adyuvante de hidróxido de aluminio. En una de dichas realizaciones, la vacuna que incluye un adyuvante que no es de hidróxido de aluminio se administra a aves de corral. En una realización particular, una vacuna comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, un adyuvante y uno o más antígenos protectores, ya sean recombinantes o naturales, obtenidos a partir de un virus, una bacteria y/o un extracto bacteriano.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para proporcionar inmunidad activa a un ave mediante la inmunización de un ave con una vacuna de la presente invención. En una realización particular, la dosis de vacuna para dicha inmunidad activa es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 ml. En una realización, el ave es un pavo. En otra realización, el ave es un pollo. En otra realización más, el ave es un faisán. La presente invención también proporciona un método de administración de una vacuna multivalente de la presente invención a un ave para protegerla frente a múltiples enfermedades.

20 La presente invención también proporciona métodos para proporcionar inmunidad pasiva a la progenie de un animal hembra (por ejemplo, una hembra preñada) que comprende la administración de una vacuna de la presente invención a un animal hembra (por ejemplo, la madre) antes del nacimiento de su progenie. En una realización, la hembra es un ave y la vacuna se administra a la hembra aviar antes de su puesta de los huevos que comprenden la progenie. De esta manera se proporciona a su progenie inmunidad pasiva. En una de dichas realizaciones, el ave es un pollo. En otra realización, el ave es un pavo. En otra realización más, el ave es un faisán.

25 En una realización particular, el método proporciona inmunidad pasiva frente a una enfermedad clostridial a la progenie del animal vacunado. En un método de este tipo la enfermedad clostridial es una enfermedad entérica clostridial. En un método particular de este tipo, la enfermedad entérica clostridial es la enteritis necrótica. En otro método de este tipo la enfermedad clostridial es la colangiohepatitis. En otra realización más, el método proporciona inmunidad pasiva frente a una enfermedad clostridial a la progenie del animal vacunado, así como proporciona protección frente a la dermatitis gangrenosa, el *C. septicum* y/o la hepatitis.

30 En una realización, el método para proporcionar inmunidad pasiva a la progenie de un animal hembra comprende la administración de una vacuna multivalente al animal hembra para proteger su progenie frente a múltiples enfermedades. En una realización particular de este tipo, el animal hembra es de la familia de las aves de corral y su progenie se protege frente a múltiples enfermedades de las aves de corral.

35 En una realización particular, la dosis para proporcionar inmunidad pasiva a la progenie de un animal hembra es de aproximadamente 0,25 ml por dosis de la vacuna. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 0,4 ml por dosis de la vacuna. En otra realización más, la dosis es de aproximadamente 0,6 ml por dosis de la vacuna. En una realización ejemplificada a continuación, la dosis es de aproximadamente 0,5 ml por dosis de la vacuna.

40 La presente invención proporciona adicionalmente un proceso para la fabricación de una vacuna de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de la presente invención. Un método de este tipo comprende cultivar una célula de *C. perfringens* en un medio de cultivo para producir una cantidad de células cultivadas que secreten una toxina *alfa* de *C. perfringens* en el medio celular. Después, se produce el toxoide *alfa* de *C. perfringens* mediante la inactivación de la toxina *alfa* secretada. La mayor parte de las células cultivadas se retira del medio de cultivo para formar un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*. En una realización particular del método, la concentración de sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* se ajusta de modo que sea suficiente para inducir al menos cuatro unidades de antitoxina (U.A.) de anticuerpo anti-toxina *alfa* por ml de antisuero de un animal (por ejemplo, un pollo) que ha sido vacunado ya sea con una o dos dosis de 0,25-0,6 ml por dosis de dicha vacuna. En una realización de este tipo, el proceso de concentración incluye la diafiltración frente a una solución tamponada con el fin de retirar los contaminantes de bajo peso molecular.

45 El proceso para fabricar una vacuna de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de la presente invención puede comprender adicionalmente la mezcla del sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* con un adyuvante. En una realización de este tipo, el sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* se mezcla en una emulsión de agua-en-aceite. En una realización particular de este tipo, la emulsión de agua-en-aceite se prepara con una fase de aceite del 70 % y una fase acuosa del 30 %.

Las células de *C. perfringens* empleadas en el proceso pueden ser de una célula de un solo tipo de *C. perfringens*. En una realización particular de este tipo, la célula de un solo tipo de *C. perfringens* es una célula de *C. perfringens* de tipo A. En una realización alternativa, la célula de un solo tipo de *C. perfringens* es una célula de *C. perfringens* de tipo C.

5 Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona vacunas únicas frente a *C. perfringens* que son seguras y efectivas para la prevención de enfermedades clostridiales en animales. En una realización particular, la administración de una vacuna de la presente invención a un sujeto animal hembra da como resultado tanto la inmunización del animal hembra como el desarrollo de anticuerpos que pueden ser transferidos pasivamente a su progenie nacida posteriormente. En una realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad mínima específica de un toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens* que es eficaz frente a infecciones por *C. perfringens* perjudiciales. En una realización particular, la vacuna comprende una combinación segura e inmunológicamente eficaz de un toxoide *alfa* de la presente invención y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

20 Las vacunas de la presente invención pueden usarse para proteger frente a cualquier afección o enfermedad en las que el *C. perfringens* desempeñe un papel. Dichas enfermedades incluyen las enfermedades clostridiales. En una realización de este tipo, la enfermedad clostridial es una enfermedad entérica clostridial. Por tanto, en una realización particular, la presente invención proporciona vacunas que son eficaces para la prevención de la enfermedad entérica clostridial en aves de corral conocida como enteritis necrótica. También pueden prevenirse otros síndromes de enfermedad mediante las vacunas de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, la hepatitis relacionada con clostridios, la colangiohepatitis y la dermatitis gangrenosa.

30 La presente invención desvela que una vacuna que comprende una cantidad mínima específica de toxoide *alfa* (es decir, que tiene una TCP mínima específica) obtenida a partir de un solo tipo de *C. perfringens*, protege la progenie del sujeto animal hembra vacunado frente a enfermedades clostridiales, tales como la enteritis necrótica, con independencia de si se expresan cualesquier toxinas letales adicionales por el *C. perfringens* expuesto. La presente invención desvela adicionalmente una vacuna que desencadena una respuesta anti-toxina *alfa* mínima específica del animal hembra vacunado, que también protege la progenie de ese sujeto animal hembra vacunado de enfermedades clostridiales, independientemente de si se expresan cualesquier toxinas letales adicionales por un *C. perfringens* de origen natural. Las vacunas de la presente invención también pueden administrarse con un adyuvante aceptable.

40 Como se ejemplifica a continuación, vacunar las gallinas con una vacuna derivada de un aislado de *C. perfringens* de tipo A inactivado que expresa una toxina *alfa*, pero no una toxina *beta 2* correspondiente, de forma inesperada, condujo a la inmunización pasiva de los pollos de la progenie, de tres semanas de edad, frente a una exposición a una cepa de *C. perfringens* que expresaba tanto la toxina *alfa* como la toxina *beta 2*. Hasta ahora, no había habido ninguna evidencia de dicha protección cruzada frente a estas dos toxinas distintas. Por tanto, la presente invención proporciona vacunas relativamente simples que son capaces de estimular una cantidad mínima específica de anti-toxinas *alfa* y, por tanto, proteger frente a enfermedades clostridiales, por ejemplo, la enteritis necrótica, independientemente de qué otras toxinas pueda expresar la cepa de exposición de *C. perfringens*.

50 De hecho, a pesar de la multitud de toxinas y otras proteínas biológicamente activas producidas por *C. perfringens* que han demostrado tener efectos patógenos en los animales, y de las múltiples citas en la bibliografía sobre las contribuciones de estas diversas toxinas y otras proteínas a la patología de la enteritis necrótica, las vacunas únicas desveladas en el presente documento proporcionan una respuesta inmune sustancial al *C. perfringens* en gallinas de engorde vacunadas e inmunidad pasiva a su descendencia nacida posteriormente.

60 Aunque la presente invención es completamente independiente de cualquier teoría o modelo, los resultados proporcionados en el presente documento son coherentes con que la toxina *alfa* de *C. perfringens* sea el componente antigénico que es a la vez necesario y suficiente para la protección frente a la enteritis necrótica. Aunque la *beta*, la *beta 2* y las enterotoxinas puedan ser críticas para la patología de la enteritis necrótica, los resultados proporcionados en el presente documento son coherentes con que el toxoide *alfa* sea el único toxoide necesario en una vacuna para la enteritis necrótica. Además, ya que generalmente la producción más alta de toxina *alfa* es en las cepas del tipo A, las cepas de *C. perfringens* de tipo A son particularmente útiles como fuente de toxina *alfa* de *C. perfringens*. Sin embargo, también pueden usarse otros tipos de *C. perfringens* satisfactoriamente, especialmente cuando se ha usado modificación genética para aumentar el nivel de producción de toxina *alfa* en estos otros tipos.

65 Como se usan en el presente documento, los siguientes términos tendrán las definiciones que se exponen a continuación: como se usa en el presente documento un "antígeno protector" es un antígeno que da como resultado la producción de anticuerpos específicos que transmiten protección frente a la infección y/o la enfermedad al animal

vacunado con que el antígeno y/o a su progenie. Una vacuna que contiene un antígeno protector de este tipo se denomina "inmunológicamente eficaz".

Como se usa en el presente documento, la expresión "toxoides *alfa*" se refiere a cualquier toxina *alfa* inactiva, (por ejemplo, una toxina *alfa* inactiva de longitud completa), pero no pretende limitar de ninguna manera los medios particulares de inactivación de una toxina *alfa* para producir ese toxoide *alfa*. Dicha metodología de inactivación incluye: (i) métodos químicos que modifican la proteína intacta, por ejemplo, tratamiento con formaldehído o glutaraldehído; (ii) procedimientos físicos, tales como el calentamiento; (iii) métodos enzimáticos que alteran la proteína; (iv) métodos recombinantes y/o combinaciones de todos o cualesquiera de los anteriores.

Como se usa en el presente documento, un "sobrenadante de toxoides *alfa*" de *C. perfringens* es una solución que comprende toxina *alfa* de *C. perfringens* inactivada, de la que se han retirado al menos la mayor parte de las células que producían la toxina (es decir, retirándose más del 70 % de las células y, en una realización particular, retirándose más del 90 % de las células). En una realización particular, la toxina *alfa* de *C. perfringens* inactivada habría sido secretada en el medio de cultivo por células de *C. perfringens* que se habían añadido y/o cultivado/desarrollado en ese medio de cultivo, y después se inactivó. En otra realización, la toxina *alfa* de *C. perfringens* inactivada incluye la toxina *alfa* de *C. perfringens* asociada a las células, que se había liberado a través de lisis celular y después se inactivó. No se pretende limitar de ninguna manera el medio de preparación del "sobrenadante de toxoides *alfa*" a ningún método particular de retirada de las células o los residuos celulares de la solución, e incluye la centrifugación, la cromatografía en columna, la ultrafiltración, etc.

Como se usa en el presente documento, una "solución sin células" es una en la que se han retirado más del 90 % de las células de un cultivo. No se pretende limitar de ninguna manera el medio de preparación de la solución "sin células" a ningún método particular de retirada de las células o residuos celulares de la solución, e incluye la centrifugación, la cromatografía en columna, la ultrafiltración, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "un solo tipo de *C. perfringens*" se refiere a un tipo de *C. perfringens*, por ejemplo, el tipo A o el tipo B o el tipo C, etc., en lugar de múltiples tipos, por ejemplo, el tipo A y el tipo B y el tipo C. Por tanto, una célula, sobrenadante, composición, preparación, vacuna, etc. que comprende un toxoide *alfa* de "un solo tipo de *C. perfringens*" es una célula, sobrenadante, composición, preparación, vacuna, etc., que contiene toxoide *alfa* solamente de ese tipo de *C. perfringens* específico y no contiene toxoide *alfa* de ningún otro tipo de *C. perfringens*. Por otra parte, dichas células, sobrenadantes, composiciones, preparaciones, vacunas, etc., pueden contener otros componentes de toxoide no *alfa*, incluyendo otros toxoides de *C. perfringens*, y/o adyuvantes, y/o estimulantes inmunitarios, etc.

Como se usa en el presente documento, una "unidad de antitoxina" o "U.A." de anticuerpo anti-toxina *alfa* por ml de antisuero se usa indistintamente de unidades de "ensayo de neutralización de anti-toxina *alfa*" o unidades "TNT" (del inglés *anti-alpha Toxin Neutralizing Test*) y se define por la capacidad de los sueros para neutralizar los efectos tóxicos de la toxina *alfa* en un bioensayo en ratón. En este ensayo, una cantidad conocida de la toxina *alfa* establecida por las normas internacionales [Farmacopea de la UE 5.0.: 01/2005:0088, págs. 803-804] se mezcla con diluciones en serie de sueros de animales vacunados. La mezcla se incuba una hora a temperatura ambiente y después se inyecta por vía intravenosa en ratones. Los ratones sobrevivirán si la toxina es completamente neutralizada por los sueros, de lo contrario mueren. Las unidades o título de antitoxina se determinan como el recíproco de la dilución de suero más alta que neutraliza la toxina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "potencia de combinación total" se abrevia como "TCP" y se define como se describe por Batty [*Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology*, Capítulo 8, Volumen 5A (1971), ed. JR Norris y DW Ribbons]. En este ensayo, un volumen específico del sobrenadante de toxoide *alfa* se pone en contacto con una cantidad conocida de unidades de antitoxina. Después de proporcionar un período de incubación adecuado para permitir que la antitoxina y el toxoide *alfa* se unan, por ejemplo, una hora a temperatura ambiente, se añade una cantidad conocida de la toxina *alfa*. Después, a la antitoxina libre restante se le proporciona un período de tiempo adecuado para unirse con la toxina *alfa*, por ejemplo, una hora a temperatura ambiente. Después, la cantidad de toxina *alfa* libre se determina mediante la adición de un sustrato a la solución para medir la actividad enzimática de la toxina *alfa*. Los sustratos adecuados incluyen los glóbulos rojos (en particular, los glóbulos rojos de oveja) y la lecitina. Después, el toxoide *alfa* puede cuantificarse a través de un cálculo basado en la cantidad de actividad enzimática determinada. Cuanto mayor es la cantidad de toxoide *alfa* presente en la solución de ensayo, mayor es la cantidad de actividad enzimática medida en el ensayo.

Los términos "tipo" y "biotipo" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren al fenotipo particular de un *C. perfringens* basado en la expresión de diversos genes de toxina. El *Clostridium perfringens* se divide en tipos basados en la producción de las cuatro toxinas principales, *alfa*, *beta*, *epsilon* y *iota*. El *C. perfringens* de tipo A produce la toxina *alfa*; el tipo B produce las toxinas *alfa*, *beta* y *epsilon*; el tipo C produce las toxinas *alfa* y *beta*, el tipo D produce las toxinas *alfa* y *epsilon*, el tipo E produce las toxinas *alfa* e *iota*. Se han descrito nada menos que 17 exotoxinas de *C. perfringens*. Un biotipo de *C. perfringens* es una clasificación basada en la producción de algunas o todas las toxinas y/o enzimas clostridiales adicionales. Por ejemplo, un patotipo enterotoxigénico de *C. perfringens* de tipo A puede producir toxinas *teta* y *mu* además de la toxina *alfa*.

Como se usa en el presente documento, una vacuna multivalente es una vacuna que comprende dos o más antígenos diferentes. En una realización particular de este tipo, la vacuna multivalente estimula el sistema inmunitario del receptor frente a dos o más patógenos diferentes.

5 Las expresiones "adyuvante" y "estimulante inmunitario" se usan indistintamente en el presente documento y se definen como una o más sustancias que provocan la estimulación del sistema inmunitario. En este contexto, un adyuvante se usa para potenciar una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos de la vacuna. Un adyuvante puede administrarse al animal de destino antes, en combinación con o después de la administración de la vacuna. Los adyuvantes de la presente invención pueden obtenerse de cualquiera de una serie de fuentes, incluyendo de
10 fuentes naturales, fuentes recombinantes, y/o sintetizarse químicamente, etc. Los ejemplos de compuestos químicos utilizados como adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, compuestos de aluminio, aceites metabolizables y no metabolizables, polímeros de bloque, ISCOM (complejos inmunoestimulantes), vitaminas y minerales (incluyendo pero no limitados a: vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12), Quil a (saponinas) y CARBOPOL®. Los ejemplos adicionales de adyuvantes, que a veces se han denominado específicamente estimulantes inmunitarios,
15 incluyen, componentes de la pared celular de bacterias y hongos (por ejemplo, lipopolisacáridos, lipoproteínas, glicoproteínas, muramilpéptidos, *beta*-1,3/1,6-glucanos), diversos hidratos de carbono complejos derivados de plantas (por ejemplo, glucanos, acemanano), diversas proteínas y péptidos derivados de animales (por ejemplo, hormonas, citocinas, factores co-estimulantes) y ácidos nucleicos novedosos derivados de virus y otras fuentes (por ejemplo, ARN de doble cadena, CpG). Además, cualquier número de combinaciones de las sustancias mencionadas
20 anteriormente puede proporcionar un efecto adyuvante y por tanto, puede formar un adyuvante de la presente invención.

Como se usa en el presente documento una "anti-toxina *alfa*" es un anticuerpo (monoclonal o policlonal) que se une a la toxina *alfa*. Los anticuerpos frente a una toxina *alfa* pueden medirse mediante un ensayo TNT como se ha
25 descrito anteriormente. Como alternativa, los anticuerpos pueden detectarse por su capacidad para bloquear el efecto hemolítico de la toxina *alfa*. En un ensayo de inhibición de la hemólisis, una cantidad conocida de toxina *alfa*, suficiente para catalizar la lisis completa de una preparación dada de glóbulos rojos de oveja, se mezcla con diluciones en serie de sueros y se incuba durante una hora a 36 ± 2 °C. Después, la mezcla se incuba con glóbulos rojos de oveja al 0,5 % durante tres horas a 36 ± 2 °C. Cuando el anticuerpo se une a la toxina *alfa*, la toxina es
30 incapaz de hemolizar los glóbulos rojos. El título se determina por el recíproco de la dilución de suero más alta que no da como resultado ninguna hemólisis. En un ensayo similar, la capacidad de los anticuerpos unidos a la toxina *alfa* para inhibir la actividad fosfolipasa se puede medir mediante la determinación de la dilución de antisueros más alta que bloquea la escisión enzimática de lecitina.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se usa indistintamente del término "proteína" y pretende abarcar adicionalmente a los péptidos. Por tanto, como se usa en el presente documento, un polipéptido es un polímero de dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Los polipéptidos de la presente invención incluyen proteínas de origen natural; proteínas recombinantes; proteínas sintetizadas químicamente; fragmentos de cualquiera de las proteínas de origen natural, recombinantes o sintetizadas químicamente; y
40 proteínas de fusión que comprenden cualquiera de las proteínas de origen natural, recombinantes, y/o sintetizadas químicamente, y/o cualquiera de sus fragmentos. Preferentemente, el término polipéptido se usa para representar un polímero que comprende veinte o más restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos, mientras que el término péptido se usa para representar un polímero que comprende de dos a veinte restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.
45

Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" como se usa en el presente documento es una secuencia de nucleótidos que se añade mediante métodos recombinantes a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la presente invención, por ejemplo, una toxina *alfa* de la presente invención, o que codifica un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento antigénico inactivo), para formar un ácido nucleico que no se forma de forma natural en la naturaleza. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar proteínas de fusión. Además, como se usa en el presente documento, no es necesario que una secuencia de nucleótidos heteróloga sea una única secuencia de nucleótidos contiguos, pero puede incluir múltiples secuencias de nucleótidos no contiguas que se han combinado con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención o una porción del mismo. Una secuencia de nucleótidos heteróloga puede comprender secuencias no codificantes, incluyendo sitios de restricción,
50 sitios reguladores, promotores y similares. En otra realización más, el nucleótido heterólogo puede funcionar como un medio para detectar una secuencia de nucleótidos de la presente invención. La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos heterólogas que cuando se combinan con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo, son necesarias y suficientes para codificar todas las proteínas de fusión de la presente invención.
55

Como se usa en el presente documento, una vacuna "consistente esencialmente en" o que "consiste esencialmente en" un toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens*, es una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz del toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens* para proteger frente a una enfermedad clostridial, pero que no contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de ningún otro antígeno conocido que se sepa que protege frente a una enfermedad clostridial tal como otro antígeno de *C. perfringens* o una toxina *alfa*, toxoide *alfa* o fragmentos de los mismos de un tipo alternativo de *C. perfringens*. Dichas vacunas pueden incluir adicionalmente
60

antígenos relacionados con otras enfermedades tales como antígenos virales del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, del reovirus y del virus de la enfermedad de Newcastle; antígenos bacterianos de *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*, y antígenos parasitarios tales como uno de *Eimeria*.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" cuando se usa en conjunto con un valor de dosificación particular significa que el valor de dosificación está dentro del veinte por ciento del valor indicado, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 0,5 ml puede comprender entre 0,4 ml y 0,6 ml.

Aislamiento de *C. perfringens* de tipo A

- 10 Pueden obtenerse aislados de *C. perfringens*, tales como *C. perfringens* de tipo A, a partir de muestras fecales y/o raspados intestinales de animales infectados. Las muestras/raspados pueden sembrarse en estrías en placas de agar sangre, incubarse anaeróticamente a 35 ± 1 °C durante 24-48 horas y las colonias que se asemejan al *C. perfringens* de tipo A se recogen individualmente. Para confirmar su identidad como aislado o aislados de *C. perfringens* de tipo A, las colonias seleccionadas pueden ensayarse para determinar las propiedades bioquímicas características de *C. perfringens* de tipo A, incluyendo la composición genética.

- 15 La presencia del gen de la toxina *alfa* en el aislado puede determinarse mediante el análisis genético, por ejemplo, mediante PCR. La expresión de la toxina *alfa* puede demostrarse por su actividad lecitinasa en un ensayo usando yema de huevo y/o mediante un ensayo de hemólisis empleando glóbulos rojos de oveja. En una realización particular, se usan aislados de *C. perfringens* que expresan un alto nivel de toxina *alfa* en la preparación de una vacuna de la presente invención. Un aislado o aislados de *C. perfringens* seleccionados pueden cultivarse anaeróticamente en caldo de nutrientes durante 4-24 horas. El cultivo puede inactivarse, por ejemplo, con formalina, concentrarse y mezclarse en una vacuna de este tipo.

Toxinas de *C. perfringens*

- 20 Toxina *alfa* – La toxina *alfa* es producida por todos los tipos de *C. perfringens*. La toxina *alfa* es una fosfolipasa C multifuncional que puede dividir lecitina, formando fosforilcolina y un diglicérido. Cuando se administra por vía intravenosa, la toxina *alfa* ha demostrado ser letal para los ratones. La toxina *alfa* también es notablemente hemolítica. Sin embargo, la susceptibilidad de los glóbulos rojos puede variar en gran medida dependiendo de la especie animal que se use como fuente de glóbulos rojos. La toxina *alfa* también provoca la agregación de plaquetas, la lisis de plaquetas, leucocitos y otras células del cuerpo, así como también provoca un aumento de la permeabilidad vascular.

- 25 Toxina *beta* – La toxina *beta* es producida por el *C. perfringens* de tipos B y C. La toxina *beta* es responsable de la inflamación del intestino y la pérdida mayor de mucosa, así como la inhibición del movimiento intestinal. La toxina *beta* es una proteína que tiene un peso molecular de 35 kDa y es mucho más susceptible a las enzimas proteolíticas tales como la tripsina, que las otras toxinas de *C. perfringens*. Se ha notificado que la toxina *beta* es letal para los animales, siendo los ratones los más sensibles y siendo los pollos los menos sensibles.

- 30 Toxina *beta* 2 - La toxina *beta* 2 es la descubierta más recientemente de las toxinas de *C. perfringens*. A pesar de sus nombres similares, las secuencias de aminoácidos de la toxina *beta* 2 y de la toxina *beta* no muestran ninguna homología. La bibliografía ha demostrado una fuerte asociación entre la toxina *beta* 2 y la enteritis necrótica en ciertos animales [Garmory et al., *Epidemiol. Infect.* 124:61-67 (2000), Herholz et al., *J. Clin. Morco*, Feb:358-361 (1999)]. La toxina *beta* 2 tiene un peso molecular de 28 kDa. Se ha descubierto la toxina *beta* 2 es letal para los ratones y citotóxica para ciertas estirpes celulares, induciendo el redondeo de las células y la lisis sin afectar al citoesqueleto de actina [Manteca et al., *Vet. Microbiol.* 86:191-202 (2002), Schotte et al., *J. Vet Med B* 51:423-416 (2004), Gilbert et al., *Gene* 203:65-73 (1997)].

- 35 Enterotoxina – La enterotoxina es producida normalmente por cepas de *C. perfringens* de tipo A. La presencia de enterotoxina se ha usado tradicionalmente para delinear las cepas asociadas a la enfermedad entérica de las que se asocian a la gangrena gaseosa tisular. Las cepas que provocan gangrena gaseosa normalmente no tienen enterotoxinas. La enterotoxina es una proteína sensible al calor que tiene un peso molecular de 34 kDa. La dosis letal para los ratones es de 10 microgramos. La interacción inicial de la enterotoxina es formar poros en la célula hospedadora, seguido de la permeabilidad alterada de la célula, la inhibición de la síntesis macromolecular, la desintegración del citoesqueleto y finalmente, la lisis [véase, Songer, *Clin. Micro. Rev.* 9(2):216-234 (1996)]. La enterotoxina efectúa la inversión del transporte neto en las células de los intestinos.

- 40 Toxina *epsilon* – La toxina *epsilon* es producida por el *C. perfringens* de tipos B y D. La toxina *epsilon* se secreta como una protoxina que es convertida por la tripsina endógena en una neurotoxina extremadamente potente. Cuando se administra por vía intravenosa, la toxina *epsilon* puede ser extremadamente letal para los ratones. La toxina *epsilon* tiene una alta afinidad por el tejido neural y tiene el efecto de provocar la permeabilidad vascular. La toxina *epsilon* también provoca la permeabilidad de la pared intestinal permitiendo que las moléculas grandes, incluso ella misma, entren en la sangre. Después, la toxina *epsilon* progresa a través del torrente sanguíneo al cerebro, donde altera el equilibrio osmótico. Esta alteración del equilibrio osmótico en el cerebro da como resultado

los signos neurológicos que se observan antes de la muerte del animal afectado.

Toxina *kappa* – La toxina *kappa* es una enzima que hidroliza colágeno producida por el *C. perfringens* de tipos A, D, E y algunos tipos de B y C. La toxina *kappa* tiene un peso molecular de 80 kDa y es letal para los ratones. La inyección intravenosa de toxina *kappa* a un ratón produce la muerte en el plazo de una hora debido a la intensa hemorragia de los pulmones.

Toxina *teta* - La mayoría de las cepas de *C. perfringens* produce toxina *teta*. La toxina *teta* es una proteína de 74 kDa responsable de las zonas transparentes de hemólisis que se ven alrededor de las colonias en las placas de agar sangre. La toxina *teta* purificada es extremadamente letal para los ratones, produciendo la muerte en cuestión de minutos. La toxina *teta* es inhibida por ciertos esteroides, siendo el colesterol el inhibidor más potente.

Inmunidad pasiva

La presente invención incluye una vacuna compuesta de una preparación segura e inmunológicamente eficaz de una cantidad mínima de un antígeno de la presente invención, por ejemplo, un toxoide *alfa*, para la vacunación de hembras no humanas, en particular de hembras fértiles y/o preñadas, que después pueden transferir el efecto de la vacuna a su recién nacido. Dicha transferencia de inmunidad de la madre a la progenie se denomina "inmunidad pasiva". La inmunidad pasiva puede conseguirse, entre otros, a través de la ingestión de calostros, como ocurre en los mamíferos, o de la absorción de anticuerpos en el torrente sanguíneo desde la yema del huevo, como ocurre en las aves de corral. Además, como se desvela en el presente documento, las aves de corral pueden consumir anticuerpos en el huevo, lo que da como resultado el aumento del nivel de anticuerpos sistémicos circulantes.

Como se demuestra en el presente documento, la transferencia pasiva de una cantidad específica de anti-toxina *alfa* al animal neonatal protege a los neonatos frente a una exposición virulenta de *Clostridium perfringens*. El grado de protección, como se desvela a continuación, fue completamente inesperado, ya que hasta ahora, se creía que el intestino tenía que estar bañado por anticuerpos con el fin de proteger de forma significativa frente a una exposición oral a *C. perfringens* de tipo A. De forma similar, es bastante sorprendente que exista una correlación entre la transferencia materna de anticuerpos de inmunidad mucosa a través de la ingestión de calostro en el mamífero neonatal y la absorción de los anticuerpos maternos en el huevo. Como se demuestra a continuación para los pollos, los anticuerpos anti-toxina *alfa* son absorbidos en el torrente sanguíneo en el huevo. Además, la presente invención desvela que la inducción de un título de anticuerpo anti-toxina *alfa* mínimo definido, específico, en el torrente sanguíneo de la gallina es suficiente para proteger la descendencia vacunada de esa gallina frente a una exposición a *C. perfringens* de tipo A realizada semanas después del nacimiento de la descendencia.

Inmunidad activa

La presente invención incluye la vacunación de polluelos de pollo (por ejemplo, polluelos de engorde) y/o pollos de pavo para proporcionar inmunidad activa frente a la enteritis necrótica, la dermatitis necrótica y la dermatitis gangrenosa. Los polluelos y/o los pollos de pavo se vacunan a edad temprana, aproximadamente el primer día de vida o un poco mayores (dentro de la primera semana de vida) con una sola o dos dosis de la vacuna. Las dosis de vacuna adecuadas para conseguir la inmunidad activa pueden variar de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 0,5 ml. En una realización particular, la dosis de la vacuna es de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 0,1 ml.

Cultivo celular

Clostridium perfringens secreta toxina *alfa* en el medio durante el crecimiento. Después de la inactivación y de retirar al menos la mayor parte de las células del medio de cultivo, la solución resultante se denomina un sobrenadante de toxoide *alfa*. Las células generalmente se retiran para minimizar los antígenos extraños en la vacuna que de otro modo podrían promover la reactividad y disminuir la respuesta inmunitaria. Sin embargo, también existe una cantidad finita de toxina *alfa* asociada a células. Por tanto, el antígeno de toxina *alfa* puede derivar de las células y/o del medio, ya sea en forma concentrada o no concentrada.

El *C. perfringens* puede cultivarse en cualquier recipiente apropiado, incluyendo matraces, frascos, jarras o fermentadores mecánicos. Las fermentaciones pueden ser controlarse durante el crecimiento de manera que el fermentador se recolecte cuando la producción de toxina *alfa* esté en su máximo. Los métodos típicos incluyen la cromatografía de afinidad, la electroforesis en gel (sistema PHAST, etc.), los inmunoensayos, los ensayos de actividad de hemolisina y lecitinas. El líquido de cultivo celular o el extracto celular pueden inactivarse con formaldehído (0,1-2,0 %) o una combinación de formaldehído y calor. Otros productos químicos que se usan normalmente para la desnaturalización de proteínas y que también pueden usarse incluyen, pero no se limitan a: glutaraldehído, fenol, diversos detergentes tales como Triton X-100, dodecil sulfato de sodio (SDS) y alcoholes. Los niveles de formaldehído residuales pueden controlarse durante la inactivación de manera que se mantenga un nivel óptimo sin sobre o subproducción de toxoide. Los métodos típicos para la medición de formaldehído libre se enumeran en la Farmacopea Europea (01/2005:20418) o el CFR 9 (113.100). Existen métodos similares disponibles para la medición de otros tipos de inactivadores de toxinas. En ciertos casos, la toxina *alfa* se transforma menos en

5 toxoide deliberadamente en este punto con el fin de minimizar la desnaturalización de los epítomos críticos para el desarrollo de antitoxinas y, después, se trata adicionalmente para la destoxificación en un punto posterior del proceso. También pueden usarse otros agentes químicos o biológicos adecuados capaces de inactivar la toxina, tales como glutaraldehído, fenol, diversos detergentes tales como Triton X-100, dodecil sulfato de sodio (SDS) y alcoholes.

10 El toxoide *alfa* resultante puede almacenarse durante un período de tiempo antes de cualquier procesamiento adicional, sin efectos perjudiciales. Normalmente, un almacenamiento óptimo es a 2-8 °C. Sin embargo, los toxoides clostridiales inactivados son extremadamente estables y también pueden almacenarse a una temperatura más alta. Para períodos de almacenamiento de más de 6 meses y a temperatura de más de 8 °C, puede ser aconsejable volver a ensayar la potencia del toxoide mediante un ensayo de potencia de combinación total (TCP) u otro ensayo inmunológico similar para determinar la estabilidad inmunogénica del toxoide.

15 Las células pueden retirarse del medio de cultivo inactivado mediante centrifugación y/o filtración para obtener el sobrenadante de toxoide. Retirar las células sirve para reducir la reactividad tisular que puede ser provocada por los componentes de la célula, mientras que, retirar los antígenos extraños de la preparación ayuda a la respuesta inmunitaria a centrarse en el componente toxoide de la vacuna.

20 El medio de cultivo inactivado puede concentrarse mediante cualquiera de una serie de medios, incluyendo la ultrafiltración (preferentemente usando membranas de ultrafiltración de no más de un límite de peso molecular de 30.000) o mediante liofilización. El proceso de concentración puede incluir la diafiltración frente a una solución acuosa (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) con el fin de retirar los contaminantes de bajo peso molecular de la preparación. El líquido concentrado puede volverse a tratar una o más veces, ya sea con formaldehído y/o calor hasta que un ensayo adecuado indique que el líquido está libre de toxicidad residual. Dichos ensayos incluyen un bioensayo en ratones, es decir, inyectar el líquido en ratones y observar su efecto sobre los ratones; o la medición de la actividad de la hemolisina o de la actividad de la lecitinasas, etc.

30 El pH de la solución puede tener que ajustarse antes de la mezcla para asegurar una unión óptima a los adyuvantes, la emulsión con aceites y/o la estabilidad de la solución. El punto isoeléctrico (pI) de la toxina *alfa* es de aproximadamente 5,5 [Smith et al., *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, (3ª Ed.) Charles Thomas Publishers, pág. 116 (1984)]. El ajuste del pH de la solución del toxoide alterará la carga neta de la proteína, lo que es ventajoso para la potenciación de la unión a ciertos adyuvantes, tales como los adyuvantes de aluminio. El pH también puede ajustarse a un nivel que aumente la estabilidad del toxoide *alfa* para su almacenamiento durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, las proteínas son más propensas a separarse por precipitación de la solución en su pI, pero por lo general son estables a 1 unidad de pH por encima o por debajo de este valor.

35 Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención

40 Puede usarse un ácido nucleico, tal como un ADNc, que codifique un polipéptido de la presente invención, para generar células hospedadoras bacterianas recombinantes que expresen una proteína y/o antígeno de la presente invención, por ejemplo, la toxina *alfa*. Dichas células hospedadoras recombinantes pueden inactivarse, es decir, convertirse en bacterinas y usarse en composiciones inmunogénicas tales como vacunas.

45 Además, la obtención y/o la construcción de un ácido nucleico que codifique un polipéptido de la presente invención, incluyendo los que codifiquen una toxina *alfa* de la presente invención, pueden facilitar la producción de la toxina *alfa* o el toxoide *alfa*. La toxina *alfa* o el toxoide *alfa* son útiles para la fabricación de ciertas vacunas de la presente invención.

50 En consecuencia, la presente invención incluye construcciones de ácido nucleico que permiten la expresión y el aislamiento de las proteínas de la presente invención. Las secuencias para dichos ácidos nucleicos y las proteínas recombinantes correspondientes de los antígenos que se usen en este aspecto de la presente invención son bien conocidos para el experto en la materia. Una pequeña muestra de los antígenos que pueden usarse en las vacunas de la presente invención, junto con su número de referencia de GenBank y un artículo científico que desvela sus secuencias de aminoácidos se proporcionan a continuación.

55 **EJEMPLOS DE ANTÍGENOS QUE PUEDEN USARSE EN VACUNAS**

FUENTE del antígeno	N.º DE REFERENCIA	ARTÍCULO
<u>C. PERFRINGENS</u>		
toxina <i>alfa</i>	CAA35186	Saint-Joanis et al., <i>Mol. Gen. Genet.</i> 219 (3): 453-460 (1989)
toxina <i>beta</i>	CAA58246	Steinthorsdottir et al., <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 130 (2-3): 273-278 (1995)
toxina <i>beta</i> 2	NP_150010	Shimizu et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 99 (2): 996-1001 (2002)
enterotoxina	BAE79112	Miyamoto et al., <i>J. Bacteriol.</i> 188 (4): 1585-1598 (2006)

toxina <i>epsilon</i>	AAA23236	Havard et al., <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 97: 77-82 (1992)
toxina <i>iota</i>	CAA51959	Perelle et al., <i>Infect. Immun.</i> 61 (12): 5147-5156 (1993)
toxina <i>kappa</i>	NP_561089	Shimizu et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 99 (2): 996-1001 (2002)
toxina <i>lambda</i>	CAA35187	Saint-Joanis et al., <i>Mol. Gen. Genet.</i> 219 (3): 453-460 (1989)
toxina <i>teta</i>	NP_561079	Shimizu et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 99 (2): 996-1001 (2002)
<u>C. DIFFICILE</u>		
toxina A	A37052	Wren et al., <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 70: 1-6 (1990)
toxina B	CAA43299	von Eichel-Streiber et al., <i>Mol. Gen. Genet.</i> 233: (1-2), 260-268 (1992)
<u>C. SEPTICUM</u>		
toxina <i>alfa</i>	AAB32892	Ballard et al., <i>Infect. Immun.</i> 63 (1): 340-344 (1995)
<u>C. NOVI</u>		
toxina <i>alfa</i>	AAB27213	Ball et al., <i>Infect. Immun.</i> 61 (7): 2912-2918 (1993)

Los ácidos nucleicos que codifican antígenos de proteínas que pueden usarse en las vacunas de la presente invención pueden contener, además, secuencias de nucleótidos heterólogas. Para expresar una proteína recombinante de la presente invención en una célula hospedadora, puede construirse un vector de expresión que comprenda el ADNc correspondiente. La presente invención, por tanto, incluye los vectores de expresión que contienen ácidos nucleicos que codifican proteínas recombinantes de la presente invención, incluyendo las variantes de los mismos.

Debido a la degeneración de las secuencias codificantes de nucleótidos, pueden usarse en la práctica de la presente invención otras secuencias de nucleótidos que codifiquen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención. Estas incluyen, pero no se limitan a, genes alélicos, genes homólogos de otras cepas y/o los que están alterados por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo resto de aminoácido dentro de la secuencia, produciendo de este modo un cambio silencioso. También se incluyen las células hospedadoras que comprenden los vectores de expresión de la presente invención. Una célula hospedadora empleada habitualmente, es una célula de *E.coli*.

Se han descrito métodos generales para la clonación de los ADNc y la expresión de sus proteínas recombinantes correspondientes [véase Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L.I. (2000)].

Además, puede usarse cualquier técnica para mutagénesis conocida en la técnica para modificar una toxina *alfa* nativa de la presente invención, incluyendo pero no limitada a, la mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* [Hutchinson et al., *J. Biol. Chem.*, 253:6551 (1978); Zoller y Smith, *DNA*, 3:479-488 (1984); Oliphant et al., *Gene*, 44:177 (1986); Hutchinson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:710 (1986); Wang y Malcolm, *Bio Techniques* 26:680-682 (1999)]. También pueden emplearse el uso de enlazadores TAB (Pharmacia), etc. y técnicas de PCR, para la mutagénesis dirigida al sitio [véase Higuchi, "Using PCR to Engineer DNA", en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Capítulo 6, págs. 61-70 (1989)].

Polipéptidos de la presente invención

La presente invención incluye polipéptidos aislados y/o recombinantes, incluyendo, las toxinas *alfa* y los toxoides *alfa* de la presente invención, variantes de cepas de los mismos y proteínas de fusión de los mismos. Además, también están incluidos en la presente invención los polipéptidos que contienen secuencias alteradas en las que residuos de aminoácidos funcionalmente equivalentes son sustituidos por los de secuencia de aminoácido de tipo silvestre dando como resultado una sustitución conservadora de aminoácidos.

Por ejemplo, uno o más de estos restos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden sustituirse por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido.

Por ejemplo, los aminoácidos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, aspar agine y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen lisina y arginina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Los intercambios de aminoácidos conservados particularmente preferidos son:

- a) Lys por Arg o viceversa de manera que pueda mantenerse una carga positiva;
 b) Glu por Asp o viceversa de manera que pueda mantenerse una carga negativa;
 c) Ser por Thr o viceversa de manera que pueda mantenerse un -OH libre;
 d) Gin por Asn o viceversa de manera que pueda mantenerse un NH₂ libre; y
 e) Ile por Leu o por Val o viceversa como aminoácidos hidrófobos aproximadamente equivalentes.

Todos los polipéptidos de la presente invención pueden ser parte de una proteína de fusión. En una realización específica, un polipéptido de fusión se expresa en una célula procariota. Dicha proteína de fusión puede usarse por ejemplo, para potenciar la antigenicidad de un antígeno para reducir o eliminar su toxicidad sin negar su antigenicidad, o para aislar un antígeno de la presente invención. El aislamiento de la proteína de fusión en el último caso puede facilitarse mediante el uso de una columna de afinidad que es específica para la proteína/péptido fusionado al antígeno. Dichas proteínas de fusión incluyen: una proteína de fusión de glutatión-S-transferasa (GST), una proteína de fusión de proteína de unión a maltosa (MBP), una proteína de fusión marcada con FLAG o una proteína de fusión marcada con poli-histidina. También pueden ser parte de una proteína de fusión secuencias de unión específicas, tales como un enlazador Ser-Gly.

De hecho, la expresión de un polipéptido de fusión puede facilitar la expresión estable y/o permitir la purificación basada en las propiedades del compañero de fusión. Por tanto, la purificación de los polipéptidos recombinantes de la presente invención puede simplificarse a través del uso de proteínas de fusión que tienen marcadores de afinidad. Por ejemplo, la GST une un conjugado de glutatión a una matriz de soporte sólido, la MBP se une a una matriz de maltosa y los quelatos de poli-histidina a una matriz de soporte de quelación de Ni [véase Hochuli et al., *Biotechnology* 6:1321-1325 (1998)].

La proteína de fusión puede eluirse de la matriz específica con tampones apropiados o mediante el tratamiento con una proteasa que sea específica para un sitio de escisión que se ha modificado por ingeniería genética entre una toxina *alfa*, por ejemplo, y su pareja de fusión. Como alternativa, una toxina *alfa* puede combinarse con una proteína marcadora tal como la proteína fluorescente verde [Waldo et al., *Nature Biotech.* 17:691-695 (1999); Patente de los EE.UU. N.º 5.625.048 y documento WO 97/26333].

Como alternativa o además, pueden utilizarse otras etapas de cromatografía en columna (por ejemplo, la filtración en gel, el intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, etc.) para purificar los polipéptidos naturales o recombinantes de la presente invención (véase a continuación). En muchos casos, dichas etapas de cromatografía en columna emplean la cromatografía líquida de alto rendimiento o métodos análogos en lugar de procedimientos más clásicos basados en la gravedad.

Además, los polipéptidos de la presente invención, incluyendo las toxinas *alfa* pueden sintetizarse químicamente [véase, por ejemplo, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman & Co., Nueva York, Nueva York, págs. 382, Grant, ed. (1992)].

Procedimientos generales de purificación de polipéptidos

En general, las etapas iniciales para la purificación de un polipéptido de la presente invención pueden incluir la disolución de proteínas por adición de sal o la precipitación de proteínas por adición de sal, por ejemplo, en fraccionamientos de sulfato de amonio; fraccionamientos de exclusión de disolvente, por ejemplo, una precipitación en etanol. Además, puede usarse ultracentrifugación de alta velocidad ya sea sola o junto con otras técnicas de extracción.

En general, las buenas etapas secundarias de aislamiento o purificación incluyen la absorción en fase sólida usando gel de fosfato de calcio, hidroxapatita o la unión en fase sólida. La unión en fase sólida puede realizarse a través de un enlace iónico, ya sea con un intercambiador aniónico, tal como dietilaminoetil (DEAE) o dietil[2-hidroxipropil]aminoetil (QAE) SEPHADEX o celulosa; o con un intercambiador catiónico tal como carboximetil (CM) o sulfopropil (SP) SEPHADEX o celulosa. Los medios alternativos de unión en fase sólida incluyen el aprovechamiento de las interacciones hidrófobas, por ejemplo, el uso de un soporte sólido tal como fenilSepharose y un tampón de alta concentración de sal; inmuno-unión por unión de afinidad, usando, por ejemplo, un anticuerpo-toxina *alfa* unido a un soporte activado. Otros soportes de fase sólida incluyen los que contienen colorantes específicos o lectinas etc.

Una técnica de soporte en fase sólida adicional que a menudo se usa al final del procedimiento de purificación se basa en la exclusión por tamaño, tal como los geles SEPHADEX y SEPHAROSE. Como alternativa, puede emplearse una técnica de membrana a presión o centrífuga, usando filtros de membrana de exclusión por tamaño. Con frecuencia, estas dos metodologías se utilizan en tándem.

Las separaciones de soporte en fase sólida generalmente se realizan por lotes con centrifugación a baja velocidad o mediante cromatografía en columna. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), incluyendo las técnicas relacionados como la FPLC, es actualmente el medio más común para realizar la cromatografía líquida. También pueden realizarse técnicas de exclusión por tamaños con la ayuda de la centrifugación a baja velocidad. Además, pueden emplearse técnicas de penetración por tamaño tales como las técnicas electroforéticas en gel. Estas

técnicas se realizan generalmente en tubos, planchas o mediante electroforesis capilar.

Casi todas las etapas que implican la purificación de polipéptidos emplean una solución tamponada. A menos que se especifique lo contrario, generalmente se usan concentraciones 25-100 mM de sales tampón. Los tampones de baja concentración generalmente implican concentraciones 5-25 mM. Los tampones de alta concentración en general implican concentraciones del agente tampón de entre concentraciones 0,1-2,0 M. Los tampones típicos pueden adquirirse en la mayoría de los catálogos bioquímicos e incluyen los tampones clásicos tales como Tris, pirofosfato, monofosfato y difosfato y los tampones Good tales como Mes, Hepes, Mops, Tricina y Ches [Good et al., *Biochemistry*, 5:467 (1966); Good e Izawa, *Meth. Enzymol.*, 24B:53 (1972); y Fergunson y Good, *Anal. Biochem.*, 104:300 (1980)].

Los materiales para realizar todas estas técnicas están disponibles en diversas fuentes comerciales tales como Sigma Chemical Company en San Luis, Misuri.

15 Componentes de la vacuna

Toxoide alfa de *C. perfringens*: En realizaciones particulares, es ventajoso que la vacuna animal contenga la cantidad mínima de toxoide *alfa* requerida para la protección frente a la enteritis necrótica. Se determinó que ese nivel era de 2 unidades de potencia de combinación total (TCP) por dosis en las condiciones particulares que se ejemplifican a continuación. Las unidades de TCP se establecen sobre la base de normas internacionales [Batty, *Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology*, Capítulo 8, Volumen 5A (1971) ed. JR Norris y DW Ribbons] y las vacunas de la presente invención pueden mezclarse fácilmente para que tengan la potencia deseada. Pueden usarse menos de 2 unidades de TCP, incluso en estas condiciones, si la vacuna comprende adicionalmente estimulantes inmunitarios. En cualquier caso, es preferible que la vacuna induzca 4 o más unidades de antitoxina por ml de sueros animales.

Cuantificación del toxoide alfa: Generalmente es deseable para cuantificar el toxoide *alfa* asegurar que los niveles óptimos estén incluidos en la vacuna. Un método convencional de cuantificación de toxoides emplea el ensayo de potencia de combinación total (TCP). En este ensayo, un volumen específico del sobrenadante de toxoide *alfa* se pone en contacto con una cantidad conocida de unidades de antitoxina. Después de proporcionar un período de incubación adecuado para permitir que la antitoxina y toxoide *alfa* se unan, por ejemplo, 0,5-2 horas, se añade una cantidad conocida de la toxina *alfa*. Después, se proporciona a la antitoxina libre restante un período adecuado para unirse a la toxina *alfa*. Después, la cantidad de toxina *alfa* libre se determina mediante la adición a la solución de un sustrato para la actividad fosfolipasa C de la toxina *alfa*. Los sustratos adecuados incluyen los glóbulos rojos (en particular, los glóbulos rojos de oveja) y la lecitina. Después, puede cuantificarse el toxoide *alfa*, a través de un cálculo basado en la cantidad de actividad fosfolipasa C. Cuanto mayor es la cantidad de toxoide *alfa* presente en la solución de ensayo, mayor es la cantidad de actividad fosfolipasa C medida en el ensayo. Como alternativa, la determinación puede hacerse sin la medición de la actividad fosfolipasa C, por ejemplo, puede usarse cualquier análisis de unión competitiva de anticuerpos, incluyendo la incorporación de una etapa de cromatografía, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o el análisis de unión competitiva mediante un instrumento Biacore o similares.

Antígenos adicionales: Las enfermedades clostridiales con frecuencia se producen como infecciones mixtas y, por tanto, la adición de otros toxoides clostridiales pueden reducir adicionalmente la patología y los signos clínicos. Los ejemplos no limitantes de otros toxoides clostridiales de organismos que se sabe que provocan enteritis gástrica, incluyendo los del *C. perfringens*, que pueden añadirse a una vacuna de la presente invención para aumentar la potencia frente a las infecciones mixtas incluyen: la toxina *beta*, la toxina *beta* 2, la toxina *teta*, la toxina *epsilon*, la enterotoxina, la toxina *kappa*, la toxina *lambda* y la toxina *iota* de *C. perfringens*; la toxina hemorrágica (TH) y la toxina letal (TL) de *C. sordellii*, las toxinas A y B de *C. difficile*; la toxina *alfa* de *C. septicum*; y las toxinas *alfa* (A) y *beta* (B) de *C. novyi*.

También pueden incluirse antígenos de otras bacterias, virus, hongos o parásitos en las vacunas de la presente invención. Dichos antígenos incluyen otras toxinas o toxoides, bacterias y/o extractos de bacterias; hongos y/o extractos de hongos; virus y/o proteínas virales; y/o parásitos o proteínas de parásitos. Los antígenos virales, bacterianos y parasitarios apropiados de las fuentes proporcionadas en el presente documento son bien conocidos en la técnica.

Son ejemplos no limitantes de organismos bacterianos: *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, Clamidia, *Erisipela spp.*, *Pasteurella*, *Bordetella* y *Ornithobacterium*.

Son ejemplos no limitantes de toxinas relacionadas: el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas, que se sabe que potencia la respuesta inmunológica de las vacunas y, por tanto, mejora la producción de antitoxinas frente la toxina *alfa* de *C. perfringens* y a las micotoxinas.

Son ejemplos no limitantes de virus apropiados: Coronavirus, Rotavirus, Astrovirus, virus similar al Enterovirus, Torovirus, Adenovirus, Reovirus, Birnavirus, Herpesvirus, Paramixovirus, Picornavirus, virus de la enfermedad de

Marek, virus de la enteritis hemorrágica y virus de la enfermedad de Newcastle.

Son ejemplos no limitantes de parásitos: Coccidios, las especies de *Eimeria* por ejemplo y Criptosporidios, [véase, documento US 2004/0018215A1].

5

Adyuvantes

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

10

15

20

Otros adyuvantes adecuados, que a veces se han denominado estimulantes inmunitarios, incluyen, pero no se limitan a: citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, sobrenadantes de cultivos celulares de linfocitos, monocitos, células de los órganos linfoides, preparaciones de células y/o extractos de plantas, bacterias o parásitos (preparaciones de *Staphylococcus aureus* o lipopolisacárido) o mitógenos.

25

Generalmente, un adyuvante se administra al mismo tiempo que un antígeno de la presente invención. Sin embargo, los adyuvantes pueden también, o como alternativa, administrarse en un período de dos semanas antes de la vacunación y/o durante un período de tiempo después de la vacunación, es decir, mientras que el antígeno, por ejemplo, un toxoide *alfa*, persista en los tejidos.

30

Preparación de vacunas

También se proporcionan procesos para la fabricación de las vacunas de la presente invención. En una realización, la vacuna comprende mezclar una combinación segura e inmunológicamente eficaz de un antígeno de la presente invención, por ejemplo, un sobrenadante de toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens*, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. La cantidad de toxoide *alfa* puede cuantificarse para contener al menos 2 unidades de potencia de combinación total (TCP) por dosis de la vacuna. El sobrenadante de toxoide *alfa* puede concentrarse para minimizar el tamaño de la dosis requerida para obtener al menos 4,0 unidades de antitoxina (U.A.) por ml de antisueros de un animal vacunado. La adición de otros agentes de modulación inmunitaria farmacéuticamente aceptables puede reducir el requisito de TCP para que caiga por debajo de 2 unidades por dosis, mientras que la vacunación aún dé como resultado el requisito de 4,0 U.A. de anticuerpo anti-toxina *alfa* por ml de antisueros de los animales vacunados. En ciertas realizaciones, el toxoide *alfa* de *C. perfringens* se purifica adicionalmente a partir de los sobrenadantes de toxoide *alfa* mediante técnicas tales como, pero no limitadas a, la concentración/ultrafiltración, la cromatografía y la centrifugación.

35

40

45

Administración de las vacunas

Las vacunas pueden administrarse en forma de un líquido, emulsión, polvo seco y/o en una niebla a través de cualquier vía parenteral, por vía intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, mediante escarificación, por vía subcutánea, intramuscular, o inocularse por una vía mucosa, por ejemplo, por vía oral, por vía intranasal, en forma de un aerosol, mediante un colirio, mediante la administración en el huevo, o implantarse en forma de un polvo secado por congelación.

50

Sujetos animales

La expresión "sujeto animal" se refiere a una especie animal capaz de ser infectado por una bacteria patógena y en una realización particular incluye a los seres humanos. Los sujetos animales apropiados también incluyen los silvestres, los animales de granja (por ejemplo, los criados para carne, leche, mantequilla, huevos, piel, cuero, plumas y/o lana), las bestias de carga, los animales de investigación, los animales de compañía, así como los criados para/en parques zoológicos, hábitats silvestres y/o circos.

60

En una realización particular, un sujeto animal de la invención es un animal de "producción de alimentos". Para los fines de la presente invención, se entiende que la expresión animal de "producción de alimentos" incluye todos los animales criados para su consumo (por ejemplo, pavos, pollos de engorde) o para artículos de consumo (por ejemplo, vacas lecheras, gallinas ponedoras y similares) por los seres humanos y/u otros animales. Una lista no limitante de dichos animales incluye aves, tales como aves de corral, es decir, pollos, pavos, gansos, patos, avestruces, etc., bovinos (por ejemplo, vacas, vacas lecheras, búfalo), ovinos (por ejemplo, cabras u ovejas),

65

porcinos (por ejemplo, cerdos, jabalíes o puercos) y equinos (por ejemplo, caballos). etc.

En otra realización, el sujeto animal es un animal de compañía. Para los fines de la presente invención, se entiende que la expresión animal "de compañía" incluye gatos domésticos (felinos), perros (caninos), especies de conejos, caballos (equinos), roedores (por ejemplo, cobayas, ardillas, ratas, ratones, jerbos y hámsteres), primates (por ejemplo, monos) y aves, tales como los pichones, las palomas, los loros, los guacamayos, los canarios y similares.

También se considera que otros animales se beneficien de las vacunas de la invención, incluyendo los marsupiales (tales como los canguros), los reptiles (tales como las tortugas de granja), las aves de caza, los cisnes, los ratites y otros animales domésticos económicamente importantes.

Los siguientes ejemplos están destinados a la ejemplificación de la presente invención solamente y no debe interpretarse que limiten el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

EJEMPLO 1

EFICACIA DE LA VACUNA EN LAS GALLINAS DE ENGORDE VACUNADAS POR VÍA SUBCUTÁNEA

Sumario

La vacunación de gallinas de engorde por una vía subcutánea con una vacuna que comprende un toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens* (tipo A) da como resultado (i) una respuesta inmunogénica en las gallinas de engorde vacunadas, (ii) anticuerpo *anti-toxoide alfa* significativo en los huevos de las gallinas de engorde vacunadas y (iii) protección pasiva de la descendencia nacida posteriormente de las gallinas de engorde vacunadas.

Materiales

Toxoide *alfa* de *C. Perfringens* de tipo A: el toxoide *alfa* de *C. Perfringens* de tipo A se prepara de la siguiente manera: un cultivo de *C. perfringens* tipo A se hace crecer en condiciones anaeróbicas en un fermentador a gran escala (5000 l) a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 2$. Durante la fermentación se añade hidróxido de sodio con el fin de mantener un pH de $7,8 \pm 2$. También se añade un carbohidrato (dextrina) durante la fermentación (hasta el 1 % p/v) para promover el crecimiento. El cultivo se deja crecer durante 3-6 horas. Al final del período de crecimiento, se añade una solución de formaldehído al fermentador a un nivel final que no exceda del 0,5 %. Las células se retiran mediante centrifugación y el sobrenadante resultante se filtra con un filtro de profundidad que tiene tamaños de poro en el intervalo de $0,25\text{-}2,0\text{ }\mu\text{m}$. La temperatura se mantiene a $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante este proceso. Después, el sobrenadante del cultivo inactivado se diafiltra y se concentra de 10 a 30 veces usando ultrafiltración con filtros no mayores que el límite de peso molecular de 20.000. El sobrenadante concentrado se almacena a $2\text{-}8\text{ °C}$ para la futura mezcla en vacunas. Antes de la mezcla, el sobrenadante concentrado se ensaya para determinar la potencia mediante el uso del ensayo de potencia de combinación (TCP) descrito anteriormente. La potencia de cada lote de toxoide se asigna en unidades de TCP por ml.

Vacuna: El sobrenadante que comprende el toxoide *alfa* de *C. Perfringens* de tipo A inactivado se mezcla en forma de una emulsión agua-en-aceite que contiene 4 unidades de potencia de combinación (TCP) por ml. La emulsión se prepara con una fase de aceite del 70 % y una fase acuosa del 30 %.

La fase oleosa se prepara de la siguiente manera:

Aceite mineral	89,20 %
Span 80	10,00 %
Alcohol bencílico	0,75 %
Trietanolamina	0,05 %

La fase acuosa se prepara de la siguiente manera:

Toxoide de <i>C. perfringens</i> de tipo A + solución salina	88 %
Tween 80 al 33 %/solución salina	12 %

Se añade lentamente un total de un 30 % de fase acuosa al 70 % de la fase oleosa y se emulsionaron con un homogeneizador Silverson. (También pueden usarse otros homogeneizadores similares). El tiempo de homogeneización depende del volumen de la emulsión y se determina por la viscosidad, el tamaño de partícula y la estabilidad de la emulsión durante al menos tres días a 37 °C . Se añade gentamicina a la fase acuosa para proporcionar una concentración final de hasta $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ de volumen en serie. Se añade timerosol a la fase acuosa para proporcionar una concentración final de hasta el 0,01 % del volumen en serie.

Vacunación: Las pollas se vacunan por vía subcutánea con 0,5 ml por dosis de la vacuna mezclada. La primera dosis de vacuna se administra a las 14 semanas de edad y la segunda dosis se administra a las 20 semanas de edad. Se vacunan veinte pollas de engorde con la vacuna mezclada descrita anteriormente que contiene 1 TCP por dosis. Se vacuna un segundo grupo de veinte pollas con la vacuna mezclada descrita anteriormente que contiene 2 TCP por dosis. Un tercer grupo de veinte pollas se usa como control y no se vacuna. Se mezclan un total de 2-3 gallos con cada grupo de pollas para producir huevos fertilizados.

Inmunidad pasiva

10 Se recogen huevos de gallinas vacunadas y de control de 32, 52, 65 semanas de edad. Los polluelos de la progenie que eclosiona de estos huevos se usa para evaluar la protección pasiva como se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1
NÚMERO DE POLLUELOS DE LA PROGENIE USADOS EN CADA PUNTO TEMPORAL

Edad de las Gallinas	Polluelos de la progenie en el grupo vacunado	Polluelos de la progenie en el grupo de control de la exposición
32 semanas	9	9
52 semanas	30	20
65 semanas	14	18

15 Los polluelos son alimentados con una dieta no medicada rica en proteínas durante las dos primeras semanas y después se cambian a la alimentación normal durante el resto del ensayo. Cada ave se expone por vía oral a una cepa virulenta de *C. perfringens* de tipo A que expresa tanto la toxina *alfa* como la toxina *beta* 2. La dosis de exposición contiene de $6,3 \times 10^7$ a $6,3 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por ml, en una dosis de 3 ml. Las aves se exponen durante 3 días consecutivos a partir de los 18 o 19 días de edad. Dos días después del último día de la exposición a las aves se sacrifican y después se examinan para determinar las lesiones de enteritis necrótica. Los resultados de eficacia para los polluelos de la progenie se enumeran en las Tablas 2-4, que representa el estado de vacunación de la madre del polluelo individual y el grado de sus lesiones de enteritis necrótica, en su caso, de acuerdo con la escala de clasificación que se proporciona a continuación. La Tabla 2 representa los polluelos de la progenie de las gallinas de 32 semanas de edad, la Tabla 3 representa los polluelos de la progenie de las gallinas de 52 semanas de edad y la Tabla 4 representa los polluelos de la progenie de las gallinas de 65 semanas de edad. La Tabla 5 muestra la mediana de la puntuación para los polluelos de la progenie de gallinas que fueron vacunadas con 2 TCP por dosis. Como se muestra, la progenie de las gallinas vacunadas está protegida significativamente frente a la exposición bacteriana administrada con respecto a la progenie de gallinas sin vacunar.

30 Escala de clasificación de las lesiones de enteritis necrótica (EN)

0 = No hay lesiones macroscópicas de enteritis necrótica en el intestino delgado; el intestino tiene la elasticidad normal (se enrolla de nuevo sobre sí mismo después de haber sido abierto).

35 1 = Pared intestinal delgada y flácida (el intestino permanece plano cuando se abre y no se enrolla de nuevo a su posición normal); moco en exceso o engrosado que cubre la membrana mucosa o leve enrojecimiento focal o multifocal de la mucosa o congestión de los vasos de la serosa.

40 2 = Una única o pocas áreas multifocales de enrojecimiento e inflamación de la pared intestinal; una única o pocas áreas multifocales de ulceración o necrosis de la mucosa intestinal.

3 = Áreas multifocales extensas de necrosis y ulceración de la mucosa intestinal ± hemorragia significativa o capa de fibrina o restos necróticos sobre la superficie de la mucosa (aspecto de toalla turca).

45 4 = Animales muertos con lesiones macroscópicas de enteritis necrótica puntuados con 2 o superior.

TABLA 2
PUNTUACIONES DE LESIONES DE ENTERITIS NECRÓTICA EN POLLUELOS DE LA PROGENIE INDIVIDUALES DE GALLINAS DE 32 SEMANAS DE EDAD

Controles no vacunados no expuestos	Controles de exposición no vacunados	Vacuna con 1 TCP por dosis	Vacuna con 2 TCP por dosis
0	1	4	1
0	2	1	0
0	1	2	0
0	1	1	1
	2	1	0
	3	3	1
	3	0	1
	1	4	1
	4	1	4

		3	
		1	
		1	
		1	
Media = 0	2,0	1,8	1,0
Mediana = 0	2,0	1,0	1,0

TABLA 3
PUNTUACIONES DE LESIONES DE ENTERITIS NECRÓTICA EN POLLUELOS DE LA PROGENIE INDIVIDUALES DE GALLINAS DE 52 SEMANAS DE EDAD

Controles no vacunados no expuestos	Controles de exposición no vacunados	Vacuna con 2 TCP por dosis
	4	0
0	3	1
0	3	1
0	1	1
0	1	0
	2	1
	1	2
	1	1
	1	1
	2	0
	2	0
	2	0
	1	0
	1	1
	2	2
	2	0
	1	1
	2	0
	1	0
	1	0
		0
		2
		1
		0
		1
		0
		1
		0
		2
		0
Media = 0	1,7	0,6
Mediana = 0	1,5	0,5

TABLA 4
PUNTUACIONES DE LESIONES DE ENTERITIS NECRÓTICA EN POLLUELOS DE LA PROGENIE INDIVIDUALES DE GALLINAS DE 65 SEMANAS DE EDAD

Controles no vacunados no expuestos	Controles de exposición no vacunados	Vacuna con 2 TCP por dosis
	4	0
0	0	0
0	0	0
0	2	2
	0	2
	0	0
	3	0
	3	3
	2	0
	0	2
	3	0
	2	0
	0	0
	0	0
	0	0

	2	
	3	
	3	
Media = 0	1,5	0,6
Mediana = 0	2,0	0,0

TABLA 5
MEDIANA DE LA PUNTUACIÓN EN POLLUELOS DE LA PROGENIE DE GALLINAS VACUNADAS CON UNA DOSIS DE 2 TCP

GRUPOS DE TRATAMIENTO	MEDIANA DE LA PUNTUACIÓN DE LESIONES DE ENTERITIS NECRÓTICA DE LA PROGENIES DE LAS GALLINAS		
	32 SEMANAS DE EDAD	52 SEMANAS DE EDAD	65 SEMANAS DE EDAD
Grupo vacunado	1	0,5	0
Grupo de control	2	1,5	2

Títulos de anticuerpos

- 5 *Suero:* Se recogen muestras de sangre de las gallinas a las 33 y 78 semanas de edad. Se permite que la sangre coagule durante 2-4 horas a temperatura ambiente y después se obtienen los sueros tras la centrifugación. Los sueros se almacenan a -10 °C o menos hasta que se ensayan para determinar el título de anticuerpos. El título de anticuerpos para la toxina *alfa* de *C. perfringens* se evalúa mediante un ensayo de inhibición de la hemólisis usando diluciones en serie y glóbulos rojos de oveja de la siguiente manera: se realizan diluciones en serie (factor de dilución 2) en una placa de microtitulación de fondo en V para cada muestra ensayada. Se añade una cantidad conocida de toxina *alfa* a cada pocillo que contiene una dilución de la muestra. Después, las placas se incuban durante una hora a 36 ± 2 °C para permitir que los anticuerpos obtenidos a partir de los sueros formen complejos con la toxina *alfa*. Después de esta incubación, se añade una solución al 0,5 % de glóbulos rojos de oveja a los pocillos y las placas se incuban durante tres horas a 36 ± 2 °C para permitir que la toxina *alfa* que no formó complejo lise los glóbulos rojos. Después, las placas se comprueban para determinar la ausencia de hemólisis. El recíproco de la dilución más alta de la muestra de ensayo que no muestra ninguna hemólisis se considera el punto final. Los títulos de anticuerpos se muestran en las Tablas 6-8.
- 10
- 15
- 20 *Yemas de huevo:* Las yemas de huevo se procesan para determinar el título de anticuerpos. En resumen, la yema se separa y se mezcla con tampón de extracción comercial (Sistema EGGstract Promega®, n.º de catálogo de Promega G1531 y G2610, Madison, Wisconsin). Después de la extracción, se obtiene un sedimento de IgY, que después se vuelve a suspender en el volumen original de la yema con solución salina tamponada con fosfato. Se agrupa el extracto de yema de huevo de al menos 5 huevos y se ensaya para determinar el título de anticuerpos mediante un ensayo de inhibición de la hemólisis (IH) como se ha descrito para los sueros anteriormente. Las yemas de huevos recogidos de ponedoras a las 40, 52 y 65 semanas de edad se evalúan para determinar el título de anticuerpo de esta manera. Los títulos de anticuerpos de las yemas de huevo se muestran en la Tabla 9.
- 25

TABLA 6
TÍTULO DE ANTICUERPOS DE SUERO DE GALLINA INDIVIDUAL PARA LA TOXINA ALFA DE C. PERFRINGENS DE TIPO A, A LAS 33 SEMANAS DE EDAD

Gallinas vacunadas (2 TCP/Dosis)	Gallinas de control*
1024	1
8192	2
256	1
1024	2
1024	2
256	2
256	2
1024	2
512	1
64	1
Media geométrica = 588	Media geométrica ≤ 2

* Los valores < 2 se consideraron como 1 con el fin de calcular la media geométrica

TABLA 7

TÍTULO DE ANTICUERPOS DE SUERO DE GALLINA INDIVIDUAL PARA LA TOXINA ALFA DE *C. PERFRINGENS* DE TIPO A, A LAS 78 SEMANAS DE EDAD

Gallinas vacunadas (2 TCP/Dosis)	Gallinas de control*
512	2
32	2
128	2
512	2
128	1
16	1
1024	1
512	2
8192	2
128	4
64	2
512	8
64	16
1024	
256	
128	
Media geométrica = 588	Media geométrica ≤ 2

* Los valores < 2 se consideraron como 1 con el fin de calcular la media geométrica

TABLA 8

MEDIA GEOMÉTRICA DEL TÍTULO DE INHIBICIÓN DE HEMÓLISIS EN SUEROS DE GALLINAS EN DIVERSOS PUNTOS TEMPORALES

GRUPOS DE TRATAMIENTO	TÍTULO EN SUERO (EDAD A LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA)	
	33 SEMANAS	78 SEMANAS
<u>GRUPO VACUNADO (2 TCP/DOSIS)</u>	588	235
<u>GRUPO DE CONTROL</u>	≤ 2	2

5

TABLA 9

TÍTULO DE INHIBICIÓN DE HEMÓLISIS EN YEMAS DE HUEVOS DE GALLINAS RECOLECTADAS EN DIVERSOS PUNTOS TEMPORALES

GRUPOS DE TRATAMIENTO	TÍTULO EN YEMA DE HUEVO (EDAD A LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA)		
	40 SEMANAS	52 SEMANAS	65 SEMANAS
<u>GRUPO VACUNADO</u>	515	2048	64
<u>GRUPO DE CONTROL</u>	≤ 2	2	≤ 2

EJEMPLO 2

10 EFICACIA DE LA VACUNA EN LAS GALLINAS DE ENGORDE VACUNADAS POR UNA VÍA INTRAMUSCULAR RUTA

Sumario

15 La vacunación de gallinas de engorde por una vía intramuscular usando una vacuna que comprende un toxoide *alfa* de un solo tipo de *C. perfringens* (tipo A) también da como resultado (i) una respuesta inmunogénica en las gallinas de engorde vacunadas, (ii) anticuerpo *anti-toxoide alfa* significativo en los huevos de las gallinas de engorde vacunadas y (iii) protección pasiva para la descendencia nacida posteriormente de las gallinas de engorde vacunadas.

20 Inmunidad pasiva

25 Se vacunan por vía intramuscular un total de 14 pollas de engorde con dos dosis de 0,5 ml de la vacuna del Ejemplo 1 anterior, que contiene 2 TCP. Se usa como control un grupo adicional de 40 pollas. Se mezclan tres gallos con cada grupo de pollas, como se ha descrito anteriormente. La primera dosis de la vacuna se administra a las 10 semanas de edad y la segunda dosis se administra a las 23 semanas de edad. Los huevos se recogen de las gallinas a las 32 semanas de edad y se eclosionan para determinar la protección pasiva de los polluelos de la progenie después de una exposición a *C. perfringens* experimental.

5 La Tabla 10 muestra la incidencia de enteritis necrótica y la mediana de la puntuación para sus lesiones correspondientes según se determina mediante la escala de clasificación del Ejemplo 1 anterior, para los polluelos de la progenie de gallinas vacunadas y de control. La Tabla 11 muestra esa mediana de la puntuación para las lesiones de enteritis necrótica para los polluelos de la progenie individuales. La Tabla 12 enumera los títulos de anticuerpos frente a la toxina *alfa* de *C. perfringens* de tipo A de los polluelos de la progenie individuales, mientras que los títulos de anticuerpos para las yemas de los huevos recogidas de las gallinas vacunadas y de control a las 32 semanas de edad se proporcionan en la Tabla 13.

TABLA 10

INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD Y LA LESION DE ENTERITIS NECRÓTICA

GRUPOS DE TRATAMIENTO	Número de aves	% de incidencia	Mediana de la puntuación	Puntuación media
<u>GRUPO VACUNADO</u>	8	0 (0/8)	0	0
<u>GRUPO DE CONTROL</u>	29	76 (22/29)	2	1,7

10

TABLA 11

PUNTUACIONES DE LESIONES DE ENTERITIS NECRÓTICA EN POLLUELOS DE LA PROGENIE INDIVIDUALES DE GALLINAS DE 32 SEMANAS DE EDAD

Controles no vacunados no expuestos	Controles de exposición no vacunados	Vacuna con 2 TCP por dosis
0	1	0
0	2	0
0	1	0
0	0	0
0	0	0
0	1	0
	3	0
	0	0
	1	
	0	
	2	
	2	
	1	
	3	
	3	
	3	
	2	
	2	
	3	
	1	
	3	
	0	
	2	
	0	
	0	
	3	
	2	
	4	
	4	
Media = 0	1,7	0,0
Mediana = 0	2,0	0,0

TABLA 12

TÍTULO DE ANTICUERPOS EN SUERO DE GALLINAS INDIVIDUALES A LAS 35 SEMANAS DE EDAD¹

GALLINAS VACUNADAS	GALLINAS DE CONTROL ²
(2 TCP/dosis)	
128	1
512	1
65536	1
4096	1
1024	1
512	1
2048	1
1024	1
512	2
256	1
1024	1
128	1
256	1
256	1
1024	1
1024	2
64	32
681	2
	2
	1
	2
	1
	1
	2
	2
	2
	1
	2
	32
	1
	2
	1
	1
	2
	1
	1
	1
	1
	<2

Media geométrica = 681

¹ Anticuerpos frente a toxina *alfa* de *C. perfringens* tipo A medidos mediante el ensayo de inhibición de hemólisis descrito en el Ejemplo 1 anterior. ² Los valores < 2 se consideraron como 1 con el fin de calcular la media geométrica.

TABLA 13

TÍTULO DE ANTICUERPOS EN YEMAS DE HUEVOS RECOLECTADAS DE GALLINAS A LAS 32 SEMANAS DE EDAD

GRUPOS DE TRATAMIENTO	TÍTULO DE INHIBICIÓN DE HEMÓLISIS
<u>GRUPO VACUNADO</u>	512
<u>GRUPO DE CONTROL</u>	< 2

5

EJEMPLO 3

SEROLOGÍA EN POLLAS LEGHORN BLANCAS SPF VACUNADAS POR VÍA SUBCUTÁNEA

10

Títulos de anticuerpos

Se evalúan títulos de anticuerpos en pollas Leghorn blancas SPF (libres de patógenos específicos, por sus siglas en inglés) que se vacunan por vía subcutánea con la vacuna del Ejemplo 1 anterior, que contiene 1, 2 o 3 TCP. Las pollas se vacunan a las 15 semanas de edad con 0,5 ml de la vacuna y se administra una dosis de refuerzo 4

semanas después de la vacunación inicial. Se recogen muestras de sangre 6 semanas después de la vacunación de refuerzo. El suero de cada ave individual se evalúa para determinar el título de anticuerpos mediante el ensayo de inhibición de hemólisis como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

5

TABLA 14

TÍTULO DE ANTICUERPOS DE SUERO DE POLLA INDIVIDUAL PARA LA TOXINA ALFA DE <i>C. PERFRINGENS</i> DE TIPO A							
1 TCP/DOSIS		2 TCP/DOSIS		3 TCP/DOSIS		CONTROLES	
Id. del ave	Título	Id. del ave	Título	Id. del ave	Título	Id. del ave	Título
923	4096	932	1024	922	1024	921	4
924	1024	938	8192	927	64	928	<2
925	4	940	512	931	2048	929	2
926	2048	942	1024	935	4096	933	2
930	512	943	2048	945	1024	937	2
941	1024	948	2048	947	2048	946	2
953	32	949	2048	952	1024	957	2
954	2	950	2048	956	128	966	<2
955	32	951	512	959	512		
962	512	958	512	960	64		
965	4096	961	512	963	2048		
967	512	964	2048	968	2048		
Media geométrica	242		1290		724		≤ 2

* Los títulos de < 2 se consideran como 1 para determinar la media geométrica del título

El título de anticuerpos en los huevos recogidos a las 25 semanas de edad de las ponedoras Leghorn blancas se evalúa para determinar el título de inhibición de hemólisis. Los resultados se tabulan en la Tabla 15.

10

TABLA 15

TÍTULO DE ANTICUERPOS DE LA YEMA DE HUEVO AGRUPADA PARA LA TOXINA ALFA DE <i>C. PERFRINGENS</i> DE TIPO A		
GRUPO	VACUNA	TÍTULO DE ANTICUERPO
1	1 TCP	512
2	2 TCP	512
3	3 TCP	512
4	Controles	< 2

DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE NEUTRALIZACIÓN DE TOXINA (TNT) EN SUEROS AGRUPADOS DE GALLINAS LEGHORN BLANCAS

15 Se evalúa el título de antitoxina para la toxina *alfa* de *C. perfringens* de tipo A en el suero agrupado de las gallinas usando ratones. Los sueros agrupados se ensayan para determinar el título de antitoxina usando un método según se describe en el Código de Regulaciones Federales, Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal del Departamento de Agricultura de los EE.UU. Los métodos utilizados para medir la antitoxina fueron similares al 9 CFR §113.111 (c) actual, excepto por que se usan la toxina *alfa* y los reactivos de la antitoxina en lugar de la toxina *beta* y la antitoxina. Los siguientes reactivos de ensayo se usan para determinar el título de antitoxina:

- 20
- 1) Antitoxina *alfa* de *C. perfringens* de tipo A: IRP 426 (obtenida del Centro de Productos Biológicos Veterinarios, USDA)
 - 25 2) Toxina *alfa* de *C. perfringens* de tipo A: IRP 446 (obtenida del Centro de Productos Biológicos Veterinarios, USDA).

En resumen, se combinan la antitoxina o los sueros patrón diluidos con una cantidad conocida de toxina *alfa* patrón. Después, se detecta la presencia de toxina si neutralizar, mediante la inyección de la mezcla en ratones. Después, se evalúa la comparación con los efectos de cantidades conocidas de antitoxina *alfa* patrón sobre la actividad de la toxina, mediante la determinación de la dilución de sueros patrón o de ensayo que protege a los ratones de la muerte en un bioensayo. Los títulos de la antitoxina en la agrupación de sueros de pollas Leghorn blancas son como se muestran en la Tabla 16 a continuación.

5

TABLA 16

TÍTULO DE NEUTRALIZACIÓN DE TOXINA (TNT) EN POLLAS VACUNADAS Y DE CONTROL			
GRUPO	VACUNA	TÍTULO DE ANTITOXINA EN SUERO	
		Pre-vacunación	Post-vacunación
1	1 TCP	<1	≥ 2 Y <4
2	2 TCP	<1	≥ 4
3	3 TCP	<1	≥ 4
4	Controles	<1	<1

10 **EJEMPLO 4**

SEROLOGÍA EN POLLAS LEGHORN BLANCAS SPF VACUNADAS POR UNA VÍA INTRAMUSCULAR

Se evalúan los títulos de anticuerpos en pollas Leghorn blancas SPF (libres de patógenos específicos, por sus siglas en inglés) que se vacunan dos veces por vía intramuscular con la vacuna del Ejemplo 1 anterior, que contiene 1, 2 o 3 TCP. Las pollas se vacunan a las diez semanas de edad con 0,5 ml de la vacuna y se proporciona una dosis de refuerzo cuatro semanas después de la vacunación inicial. Se recogen muestras de sangre siete semanas después de la vacunación de refuerzo. Los sueros de pollas individuales se evalúan para determinar el título de anticuerpos mediante un ensayo de inhibición de hemólisis como se ha descrito en el Ejemplo 1 anteriormente y se tabula en las Tablas 17 y 18 a continuación.

15

20

TABLA 17

TÍTULO DE ANTICUERPOS DE SUERO DE POLLA INDIVIDUAL PARA LA TOXINA ALFA DE C. PERFRINGENS DE TIPO A							
1 TCP		2 TCP		3 TCP		Controles	
Id. del ave	Título	Id. del ave	Título	Id. del ave	Título	Id. del ave	*Título
951	256	631	1024	646	4096	661	< 2
952	128	632	2048	647	4096	662	< 2
953	1024	633	2048	648	2048	663	8
954	128	634	256	649	2048	664	< 2
955	2048	635	128	650	4096	665	8
956	512	636	2048	651	2048	666	4
957	1024	637	512	652	2048	667	< 2
958	256	638	2048	653	1024	668	< 2
960	512	639	1024	654	4096	669	< 2
961	2048	640	2048	655	4096	670	< 2
962	1024	641	2048	656	4096	671	< 2
964	1024	642	1024	657	4096	672	< 2
965	256	643	1024	658	1024	673	16
		644	512	660	1024	674	16
		645	2048	966	4096	675	16

Media geométrica	540		1024		2580		3
* Los títulos de < 2 se consideran como 1 para determinar la media geométrica del título							

Se evalúa el título de neutralización de toxina (TNT) en sueros agrupados de gallinas usando el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior y los resultados se proporcionan en la Tabla 18 a continuación.

5

TABLA 18

TÍTULO DE NEUTRALIZACIÓN DE TOXINA (TNT) EN POLLAS VACUNADAS Y DE CONTROL			
GRUPO	VACUNA	TÍTULO DE ANTITOXINA EN SUERO	
		Pre-vacunación	Post-vacunación
1	1 TCP	<1	≥ 4
2	2 TCP	<1	≥ 4
3	3 TCP	<1	≥ 4
4	Controles	<1	<1

Se evalúa el título de anticuerpos en los huevos recogidos a las 25 semanas de edad de estas ponedoras Leghorn blancas para determinar el título de inhibición de hemólisis como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 19.

10

TABLA 19

TÍTULO DE ANTICUERPOS DE LA YEMA DE HUEVO AGRUPADA PARA LA TOXINA ALFA DE <i>C. PERFRINGENS</i> DE TIPO A		
GRUPO	VACUNA	TÍTULO DE ANTICUERPO
1	1 TCP	512
2	2 TCP	256
3	3 TCP	512
4	Controles	< 2

EJEMPLO 5

15

COMPARACIÓN DE UNA VACUNA DE TOXOIDE ALFA DE *C. PERFRINGENS* MULTIVALENTE Y UNA MONOVALENTE EN CERDO

Sumario

20

Se describen métodos para proporcionar protección pasiva en cerdos neonatales mediante la vacunación de las cerdas/puercas jóvenes preñadas con las vacunas de toxoide alfa de *C. perfringens* de tipo A de la presente invención. Los resultados muestran una respuesta de anticuerpos en las cerdas que pueden transferirse a los lechones a través del calostro.

25

Materiales

Toxoide alfa de C. perfringens de tipo A: se preparó toxoide alfa de *C. perfringens* de tipo A como se ha descrito en el Ejemplo 1 anteriormente.

30

Vacuna: Una vacuna de la presente invención puede mezclarse con un toxoide alfa de *C. perfringens* de tipo A inactivado que contenga > 2 unidades de potencia de combinación total. La vacuna puede mezclarse con cualquier adyuvante desvelado en el presente documento, incluyendo la emulsión aceite-en-agua que contiene aceites minerales, aceites vegetales (aceite de cacahuete, aceite de soja), escualeno, escualano y otros aceites metabolizables. También pueden usarse otros adyuvantes tales como Seponin, CARBOPOL® y adyuvantes que contengan aluminio (hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) en la preparación de vacunas. La vacuna puede contener adicionalmente otros antígenos incluyendo *E. coli* (K88, K99, 987P, Tipo 1), toxoides de *C. perfringens* y/o toxoides de otras bacterias patógenas incluyendo el *Clostridium difficile*, el rotavirus y/o el *Cryptosporidium*.

35

Administración

Las vacunas se administran a puercas jóvenes/cerdas preñadas antes de parir ya sea por vía intramuscular o subcutánea con el fin de proporcionar protección pasiva en los cerdos neonatales a través de la ingestión de calostro.

Resultados

El estudio se realiza en cerdas de 32 semanas de edad comparando tres vacunas:

Vacuna n.º 1: mezclada con un adyuvante de hidróxido de aluminio que contiene 4 TCP de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de tipo A en una dosis de 2 ml.

Vacuna n.º 2: mezclada con 4 TCP de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de tipo A, *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P, *E. coli* de tipo 1 y toxoide *beta* de *C. perfringens* de tipo C en una dosis de 2 ml.

Vacuna n.º 3: preparada como una vacuna placebo que no contiene ningún toxoide *alfa* de *C. perfringens* de tipo A, pero que contiene *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P, *E. coli* de tipo 1 y toxoide *beta* de *C. perfringens* de tipo C en una dosis de 2 ml.

Se vacuna un grupo de diez cerdas por vía intramuscular con 2 ml de vacuna n.º 1. Se vacuna un segundo grupo de diez cerdas por vía intramuscular con 2 ml de vacuna n.º 2. El tercer grupo de siete cerdas se vacuna con 2 ml de vacuna n.º 3. Se proporciona una dosis de refuerzo de 2 ml 20 días después de la vacunación inicial. Las muestras de suero se recogen en el momento de la vacunación inicial (día 0), 20 días después de la vacunación de refuerzo (día 40) y 41 días después de la vacunación de refuerzo (día 61). Después, las muestras de suero se evalúan para determinar el título de anticuerpo para la toxina *alfa* mediante el ensayo de inhibición de hemólisis descrito en el Ejemplo 1 anterior. Los resultados para las tres vacunas se muestran individualmente en las Tablas 20-22, respectivamente.

TABLA 20

VACUNA MONOVALENTE DE TOXOIDE ALFA DE <i>C. PERFRINGENS</i> DE TIPO A			
Título de inhibición de hemólisis			
Cerda n.º	Día 0 (Pre-vac)	Día 40	Día 61
10268	32	256	256
10277	2	8	8
10278	16	32	32
10295	16	64	128
10307	16	64	128
10312	8	64	64
10316	2	16	16
10317	---	64	64
10324	64	128	256
10331	16	32	32
Media geométrica	12	49	60

TABLA 21

<u>VACUNA COMBINADA DE TOXOIDE ALFA DE <i>C. PERFRINGENS</i> DE TIPO A CON E. COLI- TOXOIDE BETA DE <i>C. PERFRINGENS</i> DE TIPO C</u>			
Título de inhibición de hemólisis			
Cerda n.º	Día 0 (Pre-vac)	Día 40	Día 61
10264	16	64	64
10266	32	128	128
10269	2	32	32
10276	2	256	256
10280	8	32	32
10282	4	32	32
10287	16	64	64
10290	16	256	256
10321	16	128	64
10330	4	64	64
Media geométrica	8	79	74

TABLA 22

<u>E. COLI- TOXOIDE BETA DE <i>C. PERFRINGENS</i> DE TIPO C</u>			
Título de inhibición de hemólisis			
Cerda n.º	Día 0 (Pre-vac)	Día 40	Día 61
Grupo 3	Día 0	Día 40	Día 61
10272	4	32	32
10292	16	32	32
10303	2	16	16
10305	2	32	32
10313	8	8	8
10318	4	16	16
10319	4	64	64
Media geométrica	4	24	24

5 EJEMPLO 6

DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE NEUTRALIZACIÓN DE TOXINA (TNT) EN SUEROS AGRUPADOS DE CERDAS VACUNADAS

- 10 Cuatro cerdas preñadas se dividen por igual en dos grupos de tratamiento. Un grupo se vacuna por vía intramuscular con 2,0 ml de vacuna que contiene 4 TCP en una dosis de 2 ml de la Vacuna n.º 1 del Ejemplo 5 anterior. El otro grupo es el de los controles que no se vacunan. Las cerdas se vacunan aproximadamente a las 6-7 semanas antes del parir y se proporciona una dosis de refuerzo tres semanas más tarde. Se recogen muestras de sangre antes de la vacunación y justo antes del parto. La Tabla 23 muestra la evaluación de las muestras de sueros para determinar el título de antitoxina para la toxina *alfa* usando un ensayo de neutralización de toxina (TNT) como se ha descrito en el Ejemplo 3 anteriormente.
- 15

TABLA 23

<u>TÍTULO DE TNT</u>			
<u>Grupo de tratamiento</u>	<u>Número de cerda</u>	<u>Pre-vacunación (TNT)</u>	<u>Post-vacunación de refuerzo (TNT)</u>
Vacunada	10614	<1	>4 <8
Vacunada	10616	<1	>4 <8
Control	10615	<2	<2
Control	10617	<1	<2

5 La presente invención no debe limitarse en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

10 Debe entenderse, además, que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para su descripción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna para un ave que comprende un antígeno toxoide alfa de *C. perfringens* de tipo A, en la que dicho antígeno tiene 2 o más unidades de Potencia de Combinación Total (TCP), a condición de que solo esté presente un antígeno toxoide alfa de un único tipo de *C. perfringens* en dicha vacuna y en donde la vacuna comprenda un adyuvante, el adyuvante no sea un hidróxido de aluminio y el adyuvante esté comprendido en una emulsión de agua-en-aceite junto con el antígeno.
- 10 2. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el antígeno está en una preparación sin células.
3. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el antígeno es un toxoide alfa en un sobrenadante de toxoide alfa de *C. perfringens* de tipo A.
- 15 4. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el antígeno es un polipéptido recombinante.
5. La vacuna de la reivindicación 2, en la que dicho toxoide alfa se purifica a partir del sobrenadante de toxoide alfa por ultrafiltración.
- 20 6. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 5, que es una vacuna multivalente que comprende además una o más de las siguientes toxinas: toxina beta de *C. perfringens*, toxina beta 2 de *C. perfringens*, enterotoxina de *C. perfringens*, toxina épsilon de *C. perfringens*, toxina iota de *C. perfringens*, toxina kappa de *C. perfringens*, toxina lambda de *C. perfringens*, toxina teta de *C. perfringens*, toxina hemorrágica de *C. sordellii*, toxina letal de *C. sordellii*, toxina A de *C. difficile*, toxina B de *C. difficile*, toxina alfa de *C. septicum*, toxina alfa de *C. novyi* y toxina beta de *C. novyi*.
- 25 7. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más antígenos adicionales; en la que el antígeno adicional es de una o más de las siguientes fuentes: virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, virus de la bronquitis infecciosa, reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Eimeria*.
- 30 8. La vacuna de las reivindicaciones 1-7 en la que la emulsión de agua-en-aceite se preparó con una fase oleosa del 70 % y una fase acuosa del 30 %.
- 35 9. Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, para su uso en un método para proporcionar inmunidad pasiva frente a una enfermedad clostridial a la progenie de un ave hembra, comprendiendo dicho método la administración de la vacuna al ave hembra antes de la puesta de los huevos que comprenden la progenie; en donde se proporciona a la progenie inmunidad pasiva.
- 40 10. La vacuna de la reivindicación 9 en donde el ave es un pollo o un pavo.
11. La vacuna de la reivindicación 10 en donde la enfermedad clostridial es una enfermedad entérica clostridial.
12. La vacuna de la reivindicación 11 en donde la enfermedad entérica clostridial es la enteritis necrótica.
- 45 13. Un método de fabricación de una vacuna de toxoide alfa de *C. perfringens* de tipo A que comprende:
 - a) cultivar una célula de *C. perfringens* en un medio de cultivo para producir una cierta cantidad de células cultivadas; en donde dicha cantidad de células cultivadas secretan una toxina alfa de *C. perfringens* de tipo A en el medio celular;
 - 50 b) inactivar la toxina alfa secretada para producir un toxoide alfa de *C. perfringens*;
 - c) retirar la mayor parte de la cantidad de células cultivadas del medio de cultivo para formar un sobrenadante de toxoide alfa de *C. perfringens*;
 - d) ajustar la concentración del sobrenadante de toxoide alfa de *C. perfringens* para que tenga 2 o más TCP; y
 - e) mezclar el sobrenadante de toxoide alfa de *C. perfringens* con una emulsión de agua-en-aceite.