

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

Organización CSA Ltda

PCT

SOLICITUD

DVN
NOV

PATENTE DE INVENCION

07-109300

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO « VACUNA DE TOXOIDE DE C.
PERFRINGENS ALFA »

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

SOLICITANTE SCHERING-PLOUGH LTD.

DOMICILIO LUCERNA, SUIZA

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDOÑEZ.
T.P. 20.281

22. BOGOTÁ, D. C., OCTUBRE 17, 2007

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-109300- -00000-0000

Fecha: 2007-10-17 16:21:52 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Evo: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 152

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

18 Nov 2007

SOLICITUD DE :

1

☒

Patente de Invención

☒

Capítulo I.

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: SCHERING-PLOUGH LTD.

Dirección: Weyrstrasse 20, P.O. Box, Ch-6000 Lucerne 6, Suiza

Nacionalidad o Domicilio: Lucerna, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 de
Usaquén

TP 20.281

4

VENTOR (ES)
(72)

Nombre: JAYAPPA, Huchappa y O'CONNELL, Kevin

Dirección: 6323 South 104th Street, Omaha, Nebraska 68127, Estados Unidos de América y 6207 South 159th Street, Omaha, Nebraska 68135, Estados Unidos de América, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

5 PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/014669

Publicación Internacional No. WO/2006/113772

Fecha 17-ABR-06

Fecha 26-OCT-06

6

Título (54)

VACUNA DE TOXOIDE DE C. PERFRINGENS ALFA

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/08, A61P 31/04

8

Prioridad

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

18-ABR-05

(31) Número de Solicitud

60/672,289

SI

☒

NO

☐

9

Comprobante de pago No. 07-76776

Fecha 21-SEP-07

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros: Extractos, Reporte de búsqueda y notificación de presentación de documento de prioridad.

11

FIGURA CARACTERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

00000019

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 76,776
FECHA : SEPTIEMBRE 21 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-109300- -00000-0000

Fecha: 2007-10-17 16:21:52 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 152

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	69421918	21/09/2007	46,018,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

CON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

00004

AH06333

4/6
(Original para PRESENTACIÓN)

SOLICITUD PCT

VIII-2-1	Declaración: Derecho a solicitar y obtener una patente Declaración en cuanto el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, de solicitar y obtener una patente (Reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii)), en un caso en el que la declaración bajo la Regla 4.17(iv) no sea apropiada; Nombre (APELLIDO, Nombre)	Con relación a esta solicitud internacional SCHERING-PLOUGH LTD. tiene derecho a solicitar y obtener una patente en virtud de lo siguiente:
VIII-2-1(iv)		una cesión de JAYAPPA, Huchappa a SCHERING-PLOUGH LTD., fechada abril 11, 2006
VIII-2-1(IV)		una cesión de O'CONNELL, Kevin a SCHERING-PLOUGH LTD., fechada abril 11, 2006

=====

PCT/US2006/014669

5/6
(Original para PRESENTACIÓN)

AH06333

SOLICITUD PCT

VIII-3-1	Declaración: Derecho a invocar prioridad Declaración en cuanto el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, de invocar prioridad de la solicitud más temprana especificada abajo, en la que el solicitante no fue quien presentó la solicitud más temprana o en la que el nombre del solicitante ha cambiado desde la presentación de la solicitud más temprana (Reglas 4.17(iii) y 51bis.1(a)(iii)) Nombre	Con relación a esta solicitud internacional SCHERING-PLOUGH LTD. tiene derecho a invocar prioridad sobre la solicitud anterior No. 60/672.289 en virtud de lo siguiente:
VIII-3-1(iv)		una cesión de JAYAPPA, Huchappa a SCHERING-PLOUGH LTD., fechada abril 11, 2006
VIII-2-1(IV)		una cesión de O'CONNELL, Kevin a SCHERING-PLOUGH LTD., fechada abril 11, 2006

PCT/US2006/014669
AH06333

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

00005

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)). In a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application SCHERING-PLOUGH LTD. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i) v)		an assignment from JAYAPPA, Huchappa to SCHERING-PLOUGH LTD., dated 11 April 2006 (11.04.2006)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from O'CONNELL, Kevin to SCHERING-PLOUGH LTD., dated 11 April 2006 (11.04.2006)

PCT REQUEST
AH06333

5/6

00003

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application SCHERING-PLOUGH LTD. is entitled to claim priority of earlier application No. 60/672,289 by virtue of the following:
VIII-3-1(i) v)		an assignment from JAYAPPA, Huchappa to SCHERING-PLOUGH LTD., dated 11 April 2006 (11.04.2006)
VIII-3-1(i) v)		an assignment from O'CONNELL, Kevin to SCHERING-PLOUGH LTD., dated 11 April 2006 (11.04.2006)

VACUNA DE TOXOIDE DE C. PERFRINGENS ALFA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con vacunas que comprenden toxoides *alfa* de Tipo C: *perfringens*, sus fragmentos antigénicos, fragmentos antigénicos inactivados de toxinas *alfa*, y cualquiera de sus combinaciones. La presente invención además se relaciona con métodos para el uso de estas vacunas en la protección de animales contra enfermedades clostridiales. La presente invención se relaciona también con métodos para la elaboración de estas vacunas.

ANTECEDENTES

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) es una bacteria anaerobia que se encuentra naturalmente en el suelo, en materia orgánica en descomposición, y como parte de la flora intestinal normal de animales, entre ellos, los seres humanos. *C. perfringens* también es el agente etiológico de numerosas enfermedades clostridiales halladas en animales domésticos de valor económico. *C. perfringens* produce una cantidad de toxinas que causan efectos patógenos en animales, entre ellas: la toxina *alfa*, la toxina *beta*, la toxina *beta* 2, la toxina *epsilon*, la toxina *theta*, la toxina *mu*, la toxina *delta*, la toxina *iota*, la toxina *kappa* y la toxina *lambda*. Aun más, *C. perfringens* codifica otras sustancias biológicamente activas que pueden provocar efectos patológicos, entre ellas: hialuronidasa, fosfatasa ácida, proteasa, colagenasa, sulfatasa y neuraminidasa.

Las diferentes cepas de *C. perfringens* se designan como los biotipos A a E, de acuerdo con el espectro de toxinas que produce la bacteria particular (Justin y col., *Biochemistry*, 41: 6253-6262 (2002); McDonel, *Pharmacology of Bacterial*

Toxins; F. Dorner y J. Drews (eds.), Pergamon Press, Oxford (1986)). En un principio, dicha tipificación se basó en ensayos de neutralización serológicos en ratones o cobayos. Más recientemente, los métodos de tipificación moleculares emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) apuntada a secuencias genéticas que codifican una de las numerosas toxinas de *C. perfringens*.

La clostridiosis intestinal en caballos se ha correlacionado con altas concentraciones de *C. perfringens* Tipo A en el intestino. Los caballos afectados sufren de abundante diarrea líquida, y tienen un alto índice de mortalidad. *C. perfringens* Tipo A también se ha ligado a enfermedades intestinales en cerdos lechales y cebones, con síntomas tales como enteritis necrosante leve y atrofia vellosa (Songer, *Clin. Micro. Rev.*, 9 (2): 216-234 (1996)).

Las enfermedades clostridiales causadas por *C. perfringens* se caracterizan por la muerte súbita en aves bien carnosas, con lesiones fibrinonecróticas confluentes ("toalla rusa" (toalla de fibras gruesas, sin cortar)) en el intestino delgado (formas intestinales), y/o hepatitis asociada a *C. perfringens* con colangiohepatitis, o necrosis fibrinoide en el hígado. Las aves afectadas sufren un curso rápido de depresión, diarrea y deshidratación. La mortalidad varía entre el 2% y el 50%. La patología hepática conduce al desecho de aves en la matanza.

La enteritis necrótica (EN) es un ejemplo de enfermedad intestinal clostridial causada por *C. perfringens*, que tiene a significativas consecuencias económicas en las aves de corral. En especial, la enfermedad es común en pollos parrilleros criados en suelo, de 2 a 10 semanas de edad, si bien se ha informado también la enfermedad en pavos y gallinas ponedoras huevos enjauladas. La enteritis necrótica en general se manifiesta en aves de corral, ya sea como una enfermedad secundaria, ya sea en una situación en la cual la microflora intestinal normal es

alterada de manera de permitir la proliferación anormal de *C. perfringens* patógenas. La incidencia de enteritis necrótica subclínica se desconoce, ya que las lesiones solo pueden observarse a través del examen *post-mortem*. Sin embargo, los informes de la alterada conversión de alimentos y los reducidos pesos corporales se han atribuido a la enfermedad subclínica (Lovland y Kadhusdal, *Avian Path.*, 30: 73-81 (2001)).

Los factores de riesgo que conducen a la enteritis necrótica, tanto en brotes naturales como en modelos experimentales, incluyen: (a) coccidiosis; (b) migración de larvas parasitarias; (c) alimentaciones con alto contenido de harina de pescado o trigo; y (d) enfermedades inmunosupresoras. Además, la enteritis necrótica puede reproducirse experimentalmente mediante: (i) la provisión de alimentos para animales contaminados con *C. perfringens*; (ii) la administración, a los animales, de cultivos vegetales por vía oral o en los cultivos; o (iii) la administración intraduodenal de caldos de cultivo de toxinas brutas libres de bacterias, a los animales.

C. perfringens Tipos A y C son los dos biotipos que causan enteritis necrótica en aves de corral; la toxina más común detectada es la toxina *alfa* (Wages y Opengart, "Necrotic Enteritis", pp. 781-785, en: *Disease of Poultry*, 11ª ed. (eds. Saif y col.), Iowa State Press, Ames, IA (2003)). De hecho, más del 90% de los aislados de *C. perfringens* obtenidos de cuarenta y dos aves infectadas con el Tipo A produjeron una toxina *alfa* mortal, junto con sialidasa y las toxinas *theta* y *mu* (Daube y col., *AJVR*, 54: 496-501 (1996)). Además, la enterotoxina producida por *C. perfringens* Tipo A se ha identificado en pollos con enteritis necrótica, y puede cumplir una función en la enfermedad intestinal (Niilo, *Can. J. Comp. Med.*, 42: 357-363 (1978)).

Recientemente, se ha informado que *C. perfringens* Tipo A o Tipo C pueden codificar el gen *cpb2* (Gilbert y col., *Gene*, 203: 56-73 (1997)) y expresar su producto,

la toxina *beta* 2. Se ha observado una fuerte correlación entre la expresión de la toxina *beta* 2 y la enteritis neonatal en ganado porcino (Bueschel y col., *Vet. Micro.*, 94: 121-129 (2003)). La toxina *beta* 2 además se ha involucrado como un factor patógeno en la enteritis de caballos y vacas. Bueschel y col., mencionados con anterioridad, además informaron que el 37,2% de los tres mil veinte aislados de *C. perfringens* que obtuvieron codificaban la toxina *beta* 2, y de los aislados de *C. perfringens* Tipo A examinados, el 35,1% codificaban la toxina *beta* 2. Se halló que la muestra limitada (n = 5) de aislados de campo de *C. perfringens* Tipo A de aves era $\approx$ 35% positiva para el genotipo *cpb2*, y 40% de estos también expresaban la toxina *beta* 2. Además, empleando PCR, Engstrom y col. (*Vet. Micro.*, 94: 225-235 (2003)) hallaron que el 12% de los aislados de *C. perfringens* de pollos con hepatitis además eran positivos para *cpb2*. La enterotoxina de *C. perfringens* Tipo A también demostró ser patógena en pollos, y causar la acumulación de fluido en un modelo de anilla intestinal ligada (Niilo, *Appl. Micro.*, 28: 889-891 (1974)).

Los esfuerzos actuales para controlar *C. perfringens* se basan en medidas sanitarias y en la colocación de antibióticos en la alimentación de los animales. El componente clostridial de la enfermedad responde bien a los antibióticos, y en general, es suprimido por los aditivos antibióticos del alimento y los fármacos anticoccidiales, ionóforos. Sin embargo, los antibióticos son costosos, y son sujeto de crecientes preocupaciones en relación con el favorecimiento de la resistencia bacteriana.

La vacunación además se ha tornado una importante medida de control en animales domésticos, ya que el curso de muchas enfermedades asociadas con *C. perfringens* es rápido, y a menudo, mortal. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nro. 4 292 307 define una vacuna multivalente "universal", preparada a partir

de toxoides de *C. perfringens* Tipo A, Tipo B y Tipo D, que además incluye toxoides de *Cl. oedematiens* y toxoide de *Cl. septicum*. Adicionalmente, en el mercado pueden obtenerse vacunas que a menudo son multivalentes y consisten en células inactivadas, toxinas, o combinaciones de estas dos (ver Songer, *Clin. Micro. Rev.*, 9 (2): 216-234 (1996)).

La vacunación del ganado hembra además puede provocar la protección pasiva de su posterior descendencia. La protección pasiva de neonatos mamíferos contra infecciones patológicas de *Clostridium* 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, e informaron la protección inducida por vía materna, de los corderos jóvenes contra la toxina *épsilon* de *C. perfringens*. La inmunidad pasiva de mamíferos jóvenes típicamente dura 2 a 3 semanas (Songer, *Clin. Micro. Rev.*, 9 (2): 216-234 (1996)).

Como contraste a los mamíferos lechales, la inmunidad pasiva en aves tiene varias desventajas obvias; la más notable de ellas es la completa falta de los anticuerpos maternos obtenidos de la leche. Si bien la inmunidad pasiva es tan solo una posible explicación de la correlación observada, Heier y col. (*Avian Diseases*, 45: 724-732 (2001)), de hecho, informaron que la supervivencia de pollos fue significativamente más alta en bandadas de pollos parrilleros de Noruega con valoraciones más altas de anticuerpos maternos naturales específicos contra la toxina *alfa* de *C. perfringens*, en comparación con aquellas bandadas que tenían bajas valoraciones. Además, Lovland y col. (*Avian Pathology*, 33 (1): 83-92 (2004)) informaron resultados consecuentes con la baja protección pasiva de la descendencia de gallinas que habían sido inoculadas con vacunas a base de

toxoides de *C. perfringens* Tipo A o Tipo C, en comparación con la descendencia de las gallinas no vacunadas.

Hasta la fecha, no parecía posible lograr una importante protección comercial contra *C. perfringens*, a menos que se presentaran en el inóculo los anticuerpos maternos para la mayoría de los componentes patológicos, o para todos ellos, de las bacterias *C. perfringens*. Por ejemplo, la vacunación del animal madre con un producto que no contiene enterotoxina solo ofrece protección parcial para lechones, y el anticuerpo de toxina antiépsilon en las cabras madres protege contra la muerte de toxemia, pero no contra la enterocolitis (Songer, *Clin. Micro. Rev.*, 9 (2): 216-234 (1996)).

De hecho, a pesar del registro de una importante cantidad de información con respecto a los varios biotipos de *C. perfringens* y sus correspondientes toxinas y sustancias bioactivas nocivas, las enfermedades clostridiales en animales productores de alimentos continúa siendo un significativo problema económico para los campesinos. Por lo tanto, se necesitan medios adicionales para la protección del ganado contra los efectos patológicos de *C. perfringens*. Más en particular, continúa la necesidad de una vacuna segura y eficaz contra *C. perfringens* en aves de corral. Aun más, se necesita una vacuna simple contra *C. perfringens* que pueda ser administrada a las hembras, en especial, a las hembras fértiles o preñadas, que proteja en forma pasiva a su descendencia.

La cita de cualquier referencia en esta solicitud no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia puede considerarse "arte previo" para la presente solicitud.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona vacunas contra *C. perfringens* que comprenden un toxoide de *C. perfringens alfa*, o un fragmento antigénico de un toxoide de *C. perfringens alfa*, o un fragmento antigénico inactivo de una toxina de *C. perfringens alfa*, o cualquier combinación de los anteriores, como un antígeno. La presente invención además provee vacunas que consisten esencialmente en un toxoide de *alfa C. perfringens* de Tipo único, o un fragmento antigénico de un toxoide de *alfa C. perfringens*, o un fragmento antigénico inactivo de una toxina *alfa* de *C. perfringens*, o cualquier combinación de los anteriores, como un antígeno.

Preferentemente, son suficientes una a dos dosis de 0,25-0,6 ml cada una de una vacuna de la presente invención, a fin de inducir por lo menos cuatro unidades antitoxina (A. U., por sus siglas en inglés) de anticuerpo antitoxina *alfa*, por ml de suero de un animal (por ejemplo, un pollo) vacunado con esta vacuna. En una realización de este tipo, la determinación de las unidades antitoxina (A. U.) de anticuerpo antitoxina *alfa* por ml de suero de un animal vacunado con la vacuna se efectúa seis a siete semanas después de la inmunización. En una realización particular, una sola dosis de la vacuna es suficiente para inducir por lo menos cuatro unidades antitoxina (A. U.) de anticuerpo antitoxina *alfa*, por ml de suero del animal vacunado, mientras que en una realización alternativa, son necesarias dos dosis de la vacuna. En una realización, el antígeno tiene 2 o más unidades de Potencia de Combinación Total (TCP, por sus siglas en inglés).

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 es originado de una célula de *C. perfringens* Tipo A, por ejemplo, un toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A. En otra realización, el

antígeno se origina de una célula de *C. perfringens* Tipo C, por ejemplo, un fragmento antigénico inactivo de una toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo C. Aun en otra realización, el antígeno se origina de *C. perfringens* Tipo B. Aun en otra realización, el antígeno se origina de *C. perfringens* Tipo D. En una realización más, el antígeno se origina de *C. perfringens* Tipo E. Incluso en otra realización, la vacuna comprende un antígeno que se origina de un subtipo de *C. perfringens*.

En una realización, una vacuna de la presente invención comprende un antígeno que es un antígeno de *C. perfringens* de un solo Tipo, con la condición de que se presente un solo Tipo de antígeno de *C. perfringens* en dicha vacuna. En una realización particular de esta clase, la *C. perfringens* es de Tipo A. En una realización relacionada, la *C. perfringens* es de Tipo C. En una realización, el antígeno es un toxoide *alfa*. En una realización particular de esta clase, el toxoide *alfa* está compuesto de un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*. En una realización específica, la vacuna comprende un sobrenadante de toxoide *alfa* de un solo Tipo de *C. perfringens*, Tipo A.

En una vacuna de la presente invención, el antígeno es un toxoide *alfa* de una toxina *alfa* codificada naturalmente por una célula de *C. perfringens*. En otra vacuna de la presente invención, el antígeno es un polipéptido recombinante, es decir, un polipéptido codificado por un gen que ha sido manipulado en forma genética. En una realización de esta clase, el polipéptido recombinante es un toxoide *alfa* en el cual se han eliminado o alterado genéticamente las regiones enzimáticas de la correspondiente toxina *alfa*, pero se han retenido uno o más epítomos antigénicos.

En una realización particular, el antígeno se encuentra en una preparación de células enteras. En otra realización, el antígeno se encuentra en una preparación libre de células. Aun en otra realización, el antígeno es un toxoide *alfa* en un

sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*. En una realización particular de esta clase, el sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* también es una preparación libre de células.

En otro aspecto de la presente invención, una vacuna también puede contener múltiples antígenos que pueden provocar la producción de anticuerpos de una variedad de especificidades, al ser administrados a un sujeto animal. No es necesario que todos estos anticuerpos sean protectores contra una enfermedad. En una realización particular de esta clase, dichos antígenos además son de *C. perfringens*.

Por lo tanto, una vacuna de la presente invención puede contener varios otros factores patógenos activos o inactivados, junto con un toxoide *alfa*. En consecuencia, de conformidad con la presente invención, el toxoide *alfa* puede combinarse con otras células clostridiales y no clostridiales, toxoides y extractos, como así también, con fragmentos antigénicos inactivos de toxina *alfa*.

Una de dichas vacunas multivalentes de la presente invención comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, o un fragmento antigénico de un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, o un fragmento antigénico inactivo de una toxina *alfa* de *C. perfringens*, o cualquier combinación de los anteriores, y además, comprende un antígeno viral, o un antígeno bacteriano, o un antígeno parasitario. En una realización particular de esta clase, la fuente viral del antígeno es el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa. En otra realización, la fuente viral del antígeno es el virus de la bronquitis infecciosa. Aun en otra realización, la fuente viral del antígeno es un reovirus. Aun en otra realización, la fuente viral del antígeno es el virus de la enfermedad de Newcastle. Incluso en otra realización, la fuente bacteriana del antígeno es *E. coli*. En una realización más, la fuente bacteriana del antígeno es *Salmonella*. Aun en otra

realización, la fuente bacteriana del antígeno es *Campylobacter*. En otra realización más, la fuente parasitaria del antígeno es de *Eimeria*. En una realización particular de esta clase, el antígeno empleado en la vacuna es una parte de un merozoito de *Eimeria*, un ovoquiste de *Eimeria* o una mezcla de los anteriores. En una realización relacionada, el huésped natural del parásito es un ave. En una realización particular de este tipo, el parásito es *Eimeria*, y el huésped natural del parásito es un pollo.

Una vacuna multivalente de la presente invención además 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 *épsilon* de *C. perfringens*, toxina *iota* de *C. perfringens*, toxina *kappa* de *C. perfringens*, toxina *lambda* de *C. perfringens*, toxina *theta* de *C. perfringens*, toxina de *C. sordellii* hemorrágica, 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 realización de la vacuna multivalente particular de la presente invención, la vacuna comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, o un fragmento antigénico de un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, o un fragmento antigénico inactivo de una toxina *alfa* de *C. perfringens*, o cualquier combinación de los anteriores, y además comprende uno o más antígenos virales del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, o del virus de la bronquitis infecciosa, o de reovirus, o del virus de la enfermedad de Newcastle; o antígenos bacterianos de *E. coli*, o *Salmonella*, o *Campylobacter*; o un antígeno parasitario de *Eimeria*.

En una realización alternativa, una vacuna multivalente de la presente invención consiste esencialmente en un toxoide *alfa* de *C. perfringens* de Tipo único, o un fragmento antigénico de un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, o un fragmento antigénico inactivo de una toxina *alfa* de *C. perfringens*, o cualquier combinación de

los anteriores. En una realización relacionada, la vacuna además contiene un antígeno viral, o un antígeno bacteriano, o un antígeno parasitario, como se proporciona en esta solicitud.

Una vacuna de la presente invención además puede comprender un adyuvante. Un adyuvante popular para uso en animales 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 oleosa al 70% y una fase acuosa al 30%. En otra realización, el adyuvante no es específicamente un adyuvante de hidróxido de aluminio. En una de dichas realizaciones, se administra a las aves de corral la vacuna que incluye un adyuvante que no es de hidróxido de aluminio. En una realización particular, una vacuna comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, un adyuvante y uno o más antígenos protectores, recombinantes o naturales, obtenidos de un virus, una bacteria o un extracto bacteriano.

En otro aspecto, la presente invención provee métodos para proporcionar inmunidad activa a un ave, mediante la inmunización del ave con una vacuna de la presente invención. En una realización particular, la dosificación de la vacuna para lograr dicha inmunidad activa es de alrededor de 0,05 a alrededor de 0,1 ml. En una realización, el ave es un pavo. En otra realización, el ave es un pollo. Aun en otra realización, el ave es un faisán. La presente invención además provee un método para la administración de una vacuna multivalente de la presente invención a un ave, a fin de protegerla contra múltiples enfermedades.

La presente invención provee también métodos para lograr la inmunidad pasiva en la descendencia de un animal hembra (por ejemplo, una hembra preñada), que comprenden la administración de una vacuna de la presente invención a la

hembra (por ejemplo, la madre), antes del nacimiento de la descendencia. En una realización, la hembra es un ave, y la vacuna se administra al ave hembra antes de poner los huevos que traerán la descendencia. De esta manera, se provee inmunidad pasiva a la descendencia. En una de dichas realizaciones, el ave es un pollo. En otra realización, el ave es un pavo. Aun en otra realización, el ave es un faisán.

En una realización particular, el método provee la inmunidad pasiva contra una enfermedad clostridial, a la descendencia del animal vacunado. En uno de dichos métodos, la enfermedad clostridial es una enfermedad intestinal clostridial. En un método particular de esta clase, la enfermedad intestinal clostridial es enteritis necrótica. En otro de dichos métodos, la enfermedad clostridial es colangiohepatitis. Aun en otra realización, el método provee inmunidad pasiva contra una enfermedad clostridial, a la descendencia del animal vacunado, como así también provee protección contra dermatitis gangrenosa, septicemia y/o hepatitis.

En una realización, el método para lograr la inmunidad pasiva en la descendencia de un animal hembra comprende la administración de una vacuna multivalente al animal hembra, a fin de proteger la descendencia contra múltiples enfermedades. En una realización particular de esta clase, el animal hembra es de la familia de las aves de corral, y la descendencia es protegida contra múltiples enfermedades de las aves de corral.

En una realización particular, la dosificación para lograr la inmunidad pasiva en la descendencia de un animal hembra es de alrededor de 0,25 ml por dosis de la vacuna. En otra realización, la dosificación es de alrededor de 0,4 ml por dosis de la vacuna. Aun en otra realización, la dosificación es de alrededor de 0,6 ml por dosis

de la vacuna. En una realización ejemplificada a continuación, la dosificación es de alrededor de 0,5 ml por dosis de la vacuna.

La presente invención además provee un proceso para la elaboración de una vacuna de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de la presente invención. Un método de este tipo comprende el cultivo de una célula de *C. perfringens* en un medio de cultivo, a fin de producir una cantidad de células cultivadas que secretan una toxina *alfa* de *C. perfringens* en el medio celular. El toxoide *alfa* de *C. perfringens* entonces se produce mediante la inactivación de la toxina *alfa* secretada. La mayoría de las células cultivadas es eliminada del medio de cultivo, para formar un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*. En una realización particular del método, la concentración del sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* se ajusta de manera que es suficiente para inducir por lo menos cuatro unidades de antitoxina (A. U.) de anticuerpo antitoxina *alfa*, por ml de suero de un animal (por ejemplo, un pollo) que ha sido vacunado con una o dos dosis de 0,25-0,6 ml cada una de dicha vacuna. En una de dichas realizaciones, el proceso de concentración incluye la diafiltración contra una solución regulada, a fin de eliminar los contaminantes de bajo peso molecular.

El proceso para la elaboración de una vacuna de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de la presente invención además puede comprender la mezcla del sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* con un adyuvante. En una de dichas realizaciones, el sobrenadante de toxoide de *C. perfringens* *alfa* se mezcla en una emulsión de agua en aceite. En una realización particular de esta clase, la emulsión de agua en aceite se prepara con una fase oleosa al 70% y una fase acuosa al 30%.

Las células de *C. perfringens* empleadas en el proceso pueden ser de un solo Tipo de célula de *C. perfringens*. En una realización particular de esta clase, el Tipo

de célula de *C. perfringens* único es una célula de *C. perfringens* Tipo A. En una realización alternativa, el Tipo de célula de *C. perfringens* único es una célula de *C. perfringens* Tipo C.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán mejor apreciados por referencia a la siguiente Descripción Detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona vacunas de características únicas contra *C. perfringens*, que son seguras y eficaces 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 produce tanto la inmunización del animal hembra, como el desarrollo de anticuerpos que pueden ser transferidos en forma pasiva a su posterior descendencia. En una realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad mínima específica de un toxoide *alfa* de un Tipo único de *C. perfringens*, eficaz contra infecciones nocivas de *C. perfringens*. En una realización particular, la vacuna comprende una combinación segura e inmunológicamente eficaz de un toxoide *alfa* de la presente invención y un adyuvante aceptable para uso farmacéutico.

Las vacunas de la presente invención pueden utilizarse a fin de proteger contra cualquier afección o enfermedad donde esté implicada *C. perfringens*. Dichas enfermedades incluyen enfermedades clostridiales. En una realización de este tipo, la enfermedad clostridial es una enfermedad intestinal clostridial. Por lo tanto, en una realización particular, la presente invención proporciona vacunas eficaces para la prevención de la enfermedad intestinal clostridial en aves de corral conocida como enteritis necrótica. Además pueden prevenirse otros síndromes y enfermedades con las vacunas de la presente invención, entre ellos, sin limitación, hepatitis relacionada con clostridios, colangiohepatitis y dermatitis gangrenosa.

La presente invención revela el hecho de que una vacuna que comprende una cantidad mínima específica de toxoide *alfa* (esto es, que tiene TCP mínima específica) obtenido de un Tipo de *C. perfringens* único protege la descendencia del sujeto animal hembra vacunado, contra enfermedades clostridiales tales como

enteritis necrótica, sin consideración de la expresión de cualquier toxina letal adicional por una *C. perfringens* de estímulo. La presente invención además describe una vacuna que produce una respuesta mínima específica antitoxina *alfa* del animal hembra vacunado, que también protege la descendencia de dicho sujeto animal hembra vacunado contra enfermedades clostridiales, sin consideración de la expresión de cualquier toxina letal adicional por una *C. perfringens* natural. Las vacunas de la presente invención además pueden administrarse con un adyuvante aceptable.

Como se ejemplifica más adelante, la vacunación de gallinas con una vacuna derivada de un aislado de *C. perfringens* Tipo A inactivado que expresaba una toxina *alfa*, pero no una correspondiente toxina *beta* 2, condujo inesperadamente a la inmunización pasiva de los pollos de la descendencia, de tres semanas de edad, contra un estímulo de una cepa de *C. perfringens* que expresaba tanto la toxina *alfa* como la toxina *beta* 2. Hasta la fecha, no ha habido evidencia de dicha protección cruzada contra estas dos toxinas distintas. Por lo tanto, la presente invención proporciona vacunas relativamente simples, capaces de estimular una cantidad mínima específica de antitoxinas *alfa*, y en consecuencia, proteger contra enfermedades clostridiales, por ejemplo, enteritis necrótica, sin consideración de la expresión de cualquier otra toxina por la cepa de estímulo de *C. perfringens*.

De hecho, a pesar de la cantidad de toxinas y otras proteínas biológicamente activas producidas por *C. perfringens* que han demostrado tener efectos patógenos en animales, y de las múltiples citas de la literatura acerca de las contribuciones de estas varias toxinas y otras proteínas a la patología de la enteritis necrótica, las vacunas de características únicas descritas en esta solicitud proporcionan tanto una

respuesta inmunológica sustancial para *C. perfringens* en gallinas parrilleras vacunadas, como la inmunidad pasiva a su posterior descendencia.

Si bien la presente invención es completamente independiente de cualquier teoría o modelo, los resultados proporcionados en esta solicitud son consecuentes con el postulado de que la toxina de *C. perfringens alfa* es el componente antigénico, tanto necesario como suficiente, para la protección contra la enteritis necrótica. Si bien las toxinas *beta*, *beta 2* y enterotoxinas pueden ser decisivas para la patología de la enteritis necrótica, los resultados provistos en esta solicitud son consecuentes con la teoría de que el toxoide *alfa* es el único toxoide necesario en una vacuna para la enteritis necrótica. Además, debido a que la producción de la toxina *alfa* en general es la más alta en las cepas de Tipo A, las cepas de *C. perfringens* Tipo A son particularmente útiles como fuente de toxina de *C. perfringens alfa*. Sin embargo, pueden utilizarse también con éxito otros Tipos de *C. perfringens*, en especial, cuando se ha empleado la modificación genética para incrementar el nivel de producción de toxina *alfa* en estos otros Tipos.

Conforme a esta solicitud, los siguientes términos tendrán las definiciones que se exponen a continuación.

Conforme a esta invención, un "antígeno protector" es un antígeno que logra la producción de anticuerpos específicos que imparten protección contra la infección o la enfermedad, al animal vacunado con dicho antígeno, o a su descendencia. Una vacuna que contiene dicho antígeno protector se denomina "inmunológicamente eficaz".

Conforme a esta invención, el término "fragmento antigénico", con respecto a una proteína particular, es un fragmento de dicha proteína que es antigénico. Por ejemplo, un fragmento antigénico de una toxina *alfa* o un toxoide *alfa* es un

fragmento de la toxina *alfa* o del toxoide *alfa* que es antigénico. Como se emplea aquí, un fragmento antigénico de una toxina *alfa* o de un toxoide *alfa* puede ser cualquier fragmento de la toxina *alfa* o del toxoide *alfa*, respectivamente, entre ellos, fragmentos grandes que les falta tan poco como un solo aminoácido de la proteína de longitud completa. En una realización particular, un fragmento antigénico de una toxina *alfa* o de un toxoide *alfa* contiene entre 6 y 120 residuos de aminoácidos. Además, un fragmento antigénico de una toxina *alfa* determinada puede obtenerse mediante una fuente biotecnológica, de una proteína aislada de fuentes naturales, o a través de la síntesis química. Aun más, un fragmento antigénico puede obtenerse luego de la digestión proteolítica de una toxina *alfa*, un toxoide *alfa*, o un fragmento de los anteriores; a través de la expresión biotecnológica; o alternativamente, puede generarse *de novo*, por ejemplo, mediante la síntesis peptídica.

Conforme a esta solicitud, un "fragmento antigénico inactivo" de una toxina de *C. perfringens alfa* es un fragmento antigénico de una toxina de *C. perfringens alfa* que retiene por lo menos un epítipo antigénico, pero que no posee suficientes actividades catalíticas de la toxina *alfa* como para que sea nociva. Dichos fragmentos antigénicos inactivos pueden usarse solos, o alternativamente, pueden incorporarse en proteínas de fusión.

Conforme a esta invención, el término "toxide *alfa*" se refiere a cualquier toxina *alfa* inactiva (por ejemplo, una toxina *alfa* de longitud completa inactiva), si bien no se tiene la intención de limitar de manera alguna los medios particulares para la inactivación de una toxina *alfa*, a fin de producir dicho toxide *alfa*. Dicha metodología de inactivación incluye: (1) métodos químicos que modifican la proteína intacta, por ejemplo, el tratamiento con formaldehído o glutaraldehído; (2) métodos físicos, tales como el calentamiento; (3) métodos enzimáticos que alteran la proteína,

tales como una proteasa que disocia la toxina en fragmentos; (4) métodos biotecnológicos, tales como el diseño genético del gen de toxina *alfa* para eliminar o alterar regiones enzimáticas de la proteína, y retener uno o más epítopos antigénicos (ver, por ejemplo, US 5 817 317, cuyos contenidos se incorporan en la presente solicitud a modo de referencia, en su totalidad); o combinaciones de cualesquiera de los anteriores, o de todos ellos.

De acuerdo con esta invención, un "sobrenadante de toxoide *alfa*" de *C. perfringens* es una solución que comprende toxina *alfa* de *C. perfringens* inactivada, donde por lo menos la mayoría de las células que producen la toxina se han eliminado (es decir, se elimina más del 70% de las células, y en una realización particular, se elimina más del 90% de las células). En una realización particular, la toxina *alfa* de *C. perfringens* inactivada ha sido secretada en el medio de cultivo por células de *C. perfringens* agregadas a dicho medio de cultivo, o cultivadas y desarrolladas en dicho medio de cultivo, y luego, ha sido inactivada. En otra realización, la toxina *alfa* de *C. perfringens* inactivada incluye la toxina *alfa* de *C. perfringens* asociada con las células, que ha sido liberada a través de la lisis celular, y luego inactivada. No se tiene intención alguna de limitar los medios para la preparación del "sobrenadante de toxoide *alfa*" a ningún método particular para la eliminación de las células o los restos celulares de la solución; estos medios incluyen la centrifugación, la cromatografía de columna, la ultrafiltración, etc.

Conforme a esta invención, una solución "libre de células" es aquella donde más del 90% de las células de un cultivo se han eliminado. No se tiene intención alguna de limitar los medios para la preparación de la solución "libre de células", a ningún método particular para la eliminación de las células o los restos celulares de

la solución; dichos métodos incluyen la centrifugación, la cromatografía de columna, la ultrafiltración, etc.

Conforme a esta invención, el término "Tipo de *C. perfringens* único" se refiere a un solo Tipo de *C. perfringens*, por ejemplo, Tipo A, Tipo B, Tipo C, etc., en oposición a múltiples Tipos, por ejemplo, Tipo A y Tipo B y Tipo C, etc. Por lo tanto, una célula, un sobrenadante, una composición, preparación, vacuna, etc. que comprendan un toxoide *alfa* de un "Tipo de *C. perfringens* único" es una célula, un sobrenadante, una composición, preparación, vacuna, etc. que contiene toxoide *alfa* solo de ese Tipo de *C. perfringens* específico, y no contiene toxoide *alfa* de cualquier otro Tipo de *C. perfringens*. Por otro lado, dichas células, dichos sobrenadantes, dichas composiciones, preparaciones, vacunas, etc. pueden contener otros componentes toxoides que no son *alfa*, entre ellos, otros toxoides de *C. perfringens*, y adyuvantes, estimulantes inmunológicos, etc.

De acuerdo con esta invención, una "unidad antitoxina", o "A. U.", de anticuerpo antitoxina *alfa* por ml de suero se usa de modo indistinto con la expresión "unidades de Ensayo de Neutralización Antitoxina *alfa*", o unidades "TNT", y se define por la capacidad del suero para neutralizar los efectos tóxicos de la toxina *alfa* en un bioensayo de ratón. En este ensayo, una cantidad conocida de toxina *alfa* establecida por los estándares internacionales (*EU Pharmacopoeia* 5.0: 01/2005: 0088, pp. 803-804) se mezcla con diluciones en serie de suero de animales vacunados. La mezcla se incuba una hora a temperatura ambiente y luego se inyecta en ratones por vía endovenosa. Los ratones sobrevivirán si la toxina es neutralizada por completo por el suero; de lo contrario, morirán. Las unidades antitoxina o la valoración se determinan como el número recíproco de la dilución más alta de suero que neutralizó la toxina.

Conforme a esta invención, el término "Potencia de Combinación Total" se abrevia "TCP", y se define según lo describe Batty (*Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology*, Capítulo 8, Vol. 5A (1971), ed. J. R. Norris y D. W. Ribbons). En este ensayo, un volumen específico del sobrenadante de toxoide *alfa* se pone en contacto con una cantidad conocida de unidades antitoxina. Después de proporcionar un período adecuado de incubación para permitir la unión de la antitoxina y el toxoide *alfa*, por ejemplo, una hora a temperatura ambiente, se agrega una cantidad conocida de la toxina *alfa*. Entonces se permite un período adecuado para que la antitoxina libre restante se una con la toxina *alfa*, por ejemplo, una hora a temperatura ambiente. Luego se determina la cantidad de toxina *alfa* libre, agregando un sustrato a la solución a fin de medir la actividad enzimática de la toxina *alfa*. Los sustratos apropiados comprenden glóbulos rojos (en particular, glóbulos rojos de ovejas) y lecitina. El toxoide *alfa* entonces puede cuantificarse a través del cálculo sobre la base de la cantidad de actividad enzimática establecida. Cuanto mayor es la cantidad de toxoide *alfa* presente en la solución de ensayo, mayor es la cantidad de actividad enzimática determinada en el ensayo.

Los términos "Tipo" y "biotipo" se usan de manera indistinta en esta solicitud, y se refieren al fenotipo particular de una *C. perfringens*, sobre la base de la expresión de varios genes de toxinas. *Clostridium perfringens* se divide en tipos basados en la producción de las cuatro toxinas principales: *alfa*, *beta*, *épsilon* e *iota*. *C. perfringens* Tipo A produce la toxina *alfa*; el Tipo B produce las toxinas *alfa*, *beta* y *épsilon*; el Tipo C produce las toxinas *alfa* y *beta*; el Tipo D produce las toxinas *alfa* y *épsilon*; el Tipo E produce las toxinas *alfa* e *iota*. Se han descrito tantas como 17 exotoxinas de *C. perfringens*. Un biotipo de *C. perfringens* es una clasificación sobre la base de la producción de algunas de las toxinas clostridiales adicionales o enzimas, o de

todas ellas. Por ejemplo, un patotipo enterotoxigénico de *C. perfringens* Tipo A puede producir toxinas *theta* y *mu*, además de la toxina *alfa*.

Conforme a esta solicitud, una vacuna multivalente es una vacuna que comprende dos o más antígenos diferentes. En una realización particular de esta clase, la vacuna multivalente estimula el sistema inmunológico del receptor contra dos o más patógenos diferentes.

Los términos “adyuvante” y “estimulante inmunológico” se usan de manera indistinta en esta solicitud, y se definen como uno o más ingredientes que provocan la estimulación del sistema inmunológico. En este contexto, un adyuvante se usa para mejorar la respuesta inmunológica a uno o más antígenos de vacuna. Un adyuvante puede administrarse al animal blanco antes de la administración de la vacuna, en combinación con la vacuna, o después de dicha administración. Los adyuvantes de la presente invención pueden obtenerse de cualquiera de una variedad de fuentes, entre ellas, fuentes naturales, fuentes biotecnológicas; o pueden sintetizarse en forma química, etc. Ejemplos de compuestos químicos utilizados como adyuvantes incluyen, sin limitación, compuestos de aluminio, aceites metabolizables y no metabolizables, polímeros en bloque, ISCOM (complejos estimulantes inmunológicos, por sus siglas en inglés), vitaminas y minerales (entre ellos, sin limitación: vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12), Quil A (saponinas) y CARBOPOL®. Ejemplos adicionales de adyuvantes, que en ciertas ocasiones han sido referidos específicamente como estimulantes inmunológicos, incluyen: componentes de la pared celular bacteriana y fúngica (por ejemplo, lipopolisacáridos, lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos de muramilo, *beta*-1,3/1,6-glucanos); varios carbohidratos complejos derivados de plantas (por ejemplo, glicanos, acemanano); varios péptidos y proteínas derivados de animales (por

ejemplo, hormonas, citoquinas, factores coestimulantes); y nuevos ácidos nucleicos derivados de virus y otras fuentes (por ejemplo, ARN de doble filamento, CpG). Además, cualquier número de combinaciones de los ingredientes mencionados puede proporcionar un efecto adyuvante, y por lo tanto, pueden formar un adyuvante de la presente invención.

Conforme a esta invención, una "antitoxina *alfa*" es un anticuerpo (monoclonal o policlonal) que se une a la toxina *alfa*. Los anticuerpos para una toxina *alfa* pueden medirse por medio de un ensayo TNT, como se describe con anterioridad. Alternativamente, los anticuerpos pueden detectarse por su capacidad para bloquear el efecto hemolítico de la toxina *alfa*. En un ensayo de inhibición de hemólisis, una cantidad conocida de toxina *alfa*, suficiente para catalizar la lisis completa de una preparación determinada de glóbulos rojos de oveja, se mezcla con diluciones en serie de suero, y se incuba durante una hora a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. La mezcla luego se incuba con glóbulos rojos de oveja al 0,5% durante tres horas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Cuando el anticuerpo se une a la toxina *alfa*, la toxina es incapaz de hemolisar los glóbulos rojos. La valoración se determina por medio del número recíproco de la dilución más alta de suero que no provoca la hemólisis. En un ensayo similar, puede medirse la capacidad de los anticuerpos ligados a la toxina *alfa* para inhibir la actividad de la fosfolipasa, mediante la determinación de la dilución más alta de antisuero que bloquea la disociación enzimática de lecitina.

Conforme a esta invención, el término "polipéptido" se usa de modo indistinto con el término "proteína", y además, tiene la intención de comprender péptidos. Por lo tanto, como se usa en esta solicitud, un polipéptido es un polímero de dos o más aminoácidos unidos por uniones peptídicas. Los polipéptidos de la presente invención incluyen proteínas naturales; proteínas recombinadas; proteínas

sintetizadas en forma química; fragmentos de cualquiera de las proteínas naturales, recombinadas o sintetizadas químicamente; y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de las proteínas naturales, recombinadas o sintetizadas en forma química, y cualquiera de sus fragmentos. Preferentemente, el término "polipéptido" se usa para representar un polímero que comprende veinte o más residuos de aminoácidos, unidos por medio de uniones peptídicas, mientras que el término "péptido" se usa para representar un polímero que comprende dos a veinte residuos de aminoácidos, unidos por medio de uniones peptídicas.

Una "secuencia de nucleótidos heteróloga", conforme a esta invención, es una secuencia de nucleótidos que se agrega, por métodos de ingeniería genética, 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 uno de sus fragmentos (por ejemplo, un fragmento antigénico inactivo), a fin de formar un ácido nucleico que no se forma en la naturaleza. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar proteínas de fusión. Además, conforme a esta invención, no es necesario que una secuencia de nucleótidos heteróloga sea una secuencia de nucleótidos contiguos única, sino que puede incluir múltiples secuencias de nucleótidos no contiguos, que se han combinado con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención, o una de sus porciones. Una secuencia de nucleótidos heteróloga puede comprender secuencias no codificadoras que incluyen sitios de restricción, sitios reguladores, promotores y similares. Aun en otra realización, el nucleótido heterólogo puede funcionar como un medio para detectar una secuencia de nucleótidos de la presente invención. Esta invención proporciona secuencias de nucleótidos heterólogas que, cuando se combinan con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de la invención, o uno de sus fragmentos, son

necesarias y suficientes para codificar todas las proteínas de fusión de la presente invención.

Conforme a esta invención, una vacuna "que consiste esencialmente en" o "que comprende esencialmente" un toxoide *alfa* de *C. perfringens* de Tipo único, o fragmento antigénico del toxoide *alfa* de *C. perfringens*, o fragmento antigénico inactivo de la correspondiente toxina *alfa*, es una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz del toxoide *alfa* de *C. perfringens* de Tipo único, o fragmento antigénico del toxoide *alfa* de *C. perfringens*, o fragmento antigénico inactivo de la correspondiente toxina *alfa*, a fin de proteger contra una enfermedad clostridial; pero que no contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquier otro antígeno que se sabe protege contra una enfermedad clostridial, tal como otro antígeno de *C. perfringens*, o una toxina *alfa* de *C. perfringens* de Tipo alternativo, un toxoide *alfa*, o su fragmento. Dichas vacunas además pueden incluir antígenos relacionados con otras enfermedades, tales como antígenos virales del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, reovirus y virus de la enfermedad de Newcastle; antígenos bacterianos de *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*, y un antígeno parasitario, tal como un antígeno de *Eimeria*.

De acuerdo con esta invención, el término "aproximadamente" o "alrededor de", utilizado en conjunto con un valor de dosificación particular, significa que el valor de dosificación se encuentra dentro del veinte por ciento del valor indicado; por ejemplo, una dosificación de alrededor de 0,5 ml puede comprender entre 0,4 ml y 0,6 ml.

Aislamiento de *C. perfringens* Tipo A

Los aislados de *C. perfringens*, tales como *C. perfringens* Tipo A, pueden obtenerse de muestras de materia fecal o de raspados intestinales de animales infectados. Las muestras o el raspado pueden salpicarse sobre placas de ágar de sangre, incubarse en forma anaerobia a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 horas, y luego, pueden recogerse individualmente las colonias que se asemejan a *C. perfringens* Tipo A. Con el fin de confirmar la identidad como aislados de *C. perfringens* Tipo A, las colonias seleccionadas pueden evaluarse adicionalmente para determinar las propiedades bioquímicas características de *C. perfringens* Tipo A, entre ellas, la conformación genética.

La presencia del gen de toxina *alfa* en el aislado puede establecerse mediante el análisis genético, por ejemplo, por PCR. La expresión de la toxina *alfa* puede demostrarse por su actividad de lecitinasa en un ensayo usando yema de huevo, o mediante un ensayo de hemólisis empleando glóbulos rojos de oveja. En una realización particular, los aislados de *C. perfringens* que expresan un alto nivel de toxina *alfa* se usan en la preparación de una vacuna de la presente invención. Un aislado, o aislados de *C. perfringens* seleccionados pueden cultivarse en forma anaerobia en caldo de cultivo nutritivo, durante 4 a 24 horas. El cultivo puede inactivarse, por ejemplo, con formalina, concentrarse y combinarse para formar dicha vacuna.

Toxinas de *C. perfringens*

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, para formar fosforilcolina y un diglicérido. Cuando se administra por vía endovenosa, se ha demostrado que la toxina *alfa* es mortal en ratones. Además, la toxina *alfa* es

marcadamente hemolítica. Sin embargo, la susceptibilidad de los glóbulos rojos puede variar en gran medida, según la especie de animal utilizada como la fuente de glóbulos rojos. La toxina *alfa* también produce la agregación de plaquetas, la lisis de plaquetas, leucocitos y otros cuerpos celulares, y además, causa un incremento en la permeabilidad vascular.

Toxina *beta*. La toxina *beta* es producida por *C. perfringens* Tipos B y C. La toxina *beta* es responsable de la inflamación del intestino y de la pérdida de gran cantidad de mucosa, así como también, de 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 tripsina, que las otras toxinas de *C. perfringens*. Se ha informado que la toxina *beta* es mortal en animales; los ratones son los más sensibles, y los pollos son los menos sensibles.

Toxina *beta* 2. La toxina *beta* 2 es la más reciente de las toxinas de *C. perfringens* descubiertas. A pesar de sus nombres similares, las secuencias de aminoácidos de la toxina *beta* 2 y de la toxina *beta* no muestran homología. La literatura ha demostrado una fuerte asociación entre la toxina *beta* 2 y la enteritis necrótica en ciertos animales (Garmory y col., *Epidemiol. Infect.*, 124: 61-67 (2000); Herholz y col., *J. Clin. Microb.*, feb.: 358-361 (1999)). La toxina *beta* 2 tiene un peso molecular de 28 kDa. Se ha hallado que la toxina *beta* 2 es mortal en ratones, y citotóxica para ciertos estirpes celulares, ya que induce el redondeo de las células y la lisis, sin afectar el citoesqueleto de actina (Manteca y col., *Vet. Microb.*, 86: 191-202 (2002); Schoette y col., *J. Vet. Med. B.*, 51: 423-416 (2004); Gilbert y col., *Gene*, 203: 65-73 (1997)).

Enterotoxina. La enterotoxina típicamente es producida por cepas de *C. perfringens* Tipo A. La presencia de la enterotoxina tradicionalmente se ha utilizado

para distinguir cepas asociadas con enfermedades intestinales, de aquellas asociadas con gangrena gaseosa de tejido. Las cepas que provocan gangrena gaseosa típicamente no tienen enterotoxina. La enterotoxina es una proteína sensible al calor que tiene un peso molecular de 34 kDa. La dosis mortal para ratones es de alrededor de 10 microgramos. La interacción inicial de la enterotoxina es para formar poros en la célula huésped; siguen luego la alterada permeabilidad de la célula, la inhibición de la síntesis macromolecular, la desintegración citoesquelética, y finalmente, la lisis (ver Songer, *Clin. Micro. Rev.*, 9 (2): 216-234 (1996)). La enterotoxina efectúa la inversa del transporte neto en las células del intestino.

Toxina *épsilon*. La toxina *épsilon* es producida por *C. perfringens* Tipos B y D. La toxina *épsilon* es secretada como una protoxina, que es convertida por tripsina endógena en una neurotoxina extremadamente potente. Cuando se administra por vía endovenosa, la toxina *épsilon* puede ser extremadamente mortal en ratones. La toxina *épsilon* tiene una alta afinidad para tejido neural, y posee el efecto de provocar permeabilidad vascular. Además, la toxina *épsilon* provoca permeabilidad de la pared intestinal, para permitir que moléculas grandes, incluso la misma toxina, entren en el torrente sanguíneo. La toxina *épsilon* entonces avanza a través del torrente sanguíneo hacia el cerebro, donde interrumpe el equilibrio osmótico. Esta interrupción del equilibrio osmótico en el cerebro provoca los signos neurológicos observados antes de la muerte del animal afectado.

Toxina *kappa*. La toxina *kappa* es una enzima hidrolizante de colágeno producida por *C. perfringens* Tipos A, D, E y algunos Tipos de B y C. La toxina *kappa* tiene un peso molecular de 80 kDa, y es mortal en ratones. La inyección endovenosa

de toxina *kappa* en ratones produce la muerte dentro de la hora, debido a la intensa hemorragia de los pulmones.

Toxina *theta*. La mayoría de las cepas de *C. perfringens* producen toxina *theta*. La toxina *theta* es una proteína de 74 kDa, responsable de las zonas claras de hemólisis observadas alrededor de las colonias en placas de ágar de sangre. La toxina *theta* purificada es extremadamente mortal en ratones, y produce la muerte en cuestión de minutos. La toxina *theta* es inhibida por ciertos esteroides, de los cuales el más potente inhibidor es el colesterol.

Inmunidad pasiva

La presente invención comprende una vacuna compuesta por 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, hembras fértiles o preñadas, que luego pueden transferir el efecto de la vacuna a su descendencia. Dicha transferencia de inmunidad de madre a su descendencia se denomina "inmunidad pasiva". La inmunidad pasiva puede llevarse a cabo, *inter alia*, mediante la ingestión del calostro, como ocurre en mamíferos, o la absorción de anticuerpo en el torrente sanguíneo desde la yema de huevo, como ocurre en las aves de corral. Además, como se describe en esta solicitud, las aves de corral pueden consumir anticuerpos *in ovo*, lo que produce la elevación del nivel de anticuerpos generales en circulación.

Como queda demostrado en esta solicitud, la transferencia pasiva de una cantidad específica de antitoxina *alfa* al animal neonato protege los neonatos contra un estímulo virulento de *Clostridium perfringens*. El alcance de la protección, como se describe a continuación, fue completamente inesperado, ya que hasta la fecha, se

creía que el intestino debía ser bañado con anticuerpos a fin de proteger de manera significativa contra un estímulo de *C. perfringens* Tipo A oral. Asimismo, es muy sorprendente la presencia de una correlación entre la transferencia de anticuerpos maternos de inmunidad mucosal a través de la ingestión del calostro en el mamífero neonato, y la absorción de anticuerpo materno en el huevo. Como se demuestra a continuación para los pollos, los anticuerpos antitoxina *alfa* son absorbidos en el torrente sanguíneo *in ovo*. Además, la presente invención describe que la inducción de una valoración de anticuerpo antitoxina alfa mínima definida en el torrente sanguíneo de la gallina es suficiente para proteger la descendencia vacunada de esa gallina contra un desafío de *C. perfringens* Tipo A efectuado semanas después del nacimiento de dicha descendencia.

Inmunidad activa

La presente invención abarca la vacunación de crías de pollo (por ejemplo, pollos parrilleros) o pavos, a fin de proporcionar inmunidad activa contra la enteritis necrótica, dermatitis necrótica y dermatitis gangrenosa. Los pollos y las aves se vacunan en los primeros días de vida, alrededor del primer día o poco tiempo después (dentro de la primera semana de vida), con una sola dosis o dos dosis de la vacuna. Las dosificaciones de vacuna apropiadas para lograr la inmunidad activa pueden variar desde alrededor de 0,05 ml hasta alrededor de 0,5 ml. En una realización particular, la dosificación de la vacuna es de alrededor de 0,05 ml a alrededor de 0,1 ml.

Cultivo de células

Clostridium perfringens secreta toxina *alfa* en el medio durante el crecimiento. Luego de la inactivación y la eliminación de por lo menos la mayoría de las células del medio de crecimiento, la solución resultante se denomina sobrenadante de toxoide *alfa*. Las células en general se eliminan a fin de minimizar los antígenos extraños en la vacuna que podrían promover de otro modo la reactividad, y disminuir la respuesta inmunológica. Sin embargo, también hay una cantidad limitada de toxina *alfa* asociada a las células. Por lo tanto, el antígeno de toxina *alfa* puede derivarse de las células o del medio, en forma concentrada o no concentrada.

C. perfringens puede cultivarse en cualquier recipiente apropiado, por ejemplo, frascos, botellas, jarros o fermentadores mecánicos. Las fermentaciones pueden controlarse durante el crecimiento, de manera de cosechar el fermentador cuando la producción de toxina *alfa* se encuentra en su pico. Los métodos típicos incluyen la cromatografía de afinidad, electroforesis de gel (sistema PHAST, etc.), inmunoensayos, ensayos de actividad de lecitinasa y hemolisina. El extracto celular o fluido de cultivo celular puede ser inactivado con formaldehído (0,1-2,0%), o con una combinación de formaldehído y calor. Otros agentes químicos que se usan habitualmente para la desnaturalización de proteína y que pueden ser útiles incluyen, sin limitación: glutaraldehído, fenol, varios detergentes tales como Triton X-100, dodecilsulfato de sodio (SDS) y alcoholes. Los niveles residuales de formaldehído pueden controlarse durante la inactivación de manera de mantener un nivel óptimo, sin exceder o disminuir presencia de toxoide. Los métodos típicos para la medición de formaldehído libre se citan en la *European Pharmacopoeia* (01/2005: 20418), o en 9 CFR (113.100). Pueden obtenerse métodos similares para medir otros tipos de inactivantes de toxinas. En ciertos casos, se disminuye deliberadamente la presencia de toxoide en la toxina *alfa* en este punto, a fin de minimizar la desnaturalización de

epítomos críticos para el desarrollo de antitoxinas, y luego, la toxina es tratada adicionalmente para la detoxificación en un punto posterior del proceso. Pueden emplearse también otros agentes químicos o biológicos adecuados, capaces de inactivar la toxina, tales como glutaraldehído, fenol, varios detergentes tales como Triton X-100, dodecilsulfato de sodio (SDS) y alcoholes.

El toxoide *alfa* resultante puede almacenarse durante un período de tiempo antes de cualquier procesamiento adicional, sin efectos nocivos. Típicamente, el almacenamiento óptimo es a entre 2 y 8°C. Sin embargo, los toxoides clostridiales inactivados son extremadamente estables, y también pueden almacenarse a temperaturas más altas. Para períodos de almacenamiento de más de 6 meses y a más de 8°C de temperatura, es aconsejable evaluar nuevamente la potencia del toxoide por medio de un ensayo de Potencia de Combinación Total (TCP), u otro ensayo inmunológico similar, a fin de determinar la estabilidad inmunógena del toxoide.

Las células pueden eliminarse del medio de cultivo inactivado mediante centrifugación o filtración, a fin de obtener el sobrenadante de toxoide. La eliminación de las células sirve para reducir la reactividad de tejido que pueda ser causada por los componentes celulares, mientras que la eliminación de los antígenos extraños de la preparación ayuda a que la respuesta inmunológica se centre en el componente toxoide de la vacuna.

El medio de cultivo inactivado puede concentrarse mediante cualquiera de una cantidad de medios, entre ellos, ultrafiltración (preferentemente, usando membranas de ultrafiltración de no más de 30000 de corte de peso molecular), o mediante liofilización. El proceso de concentración puede comprender la diafiltración contra una solución acuosa (por ejemplo, solución salina regulada con fosfato), a fin de

eliminar los contaminantes de bajo peso molecular de la preparación. El fluido concentrado puede tratarse nuevamente una o más veces con formaldehído o calor, hasta que un ensayo adecuado indique que el fluido está libre de toxicidad residual. Dichos ensayos incluyen un bioensayo de ratón, esto es, la inyección del fluido en ratones y la observación de su efecto en ratones; o la medición de la actividad de hemolisina o la actividad de lecitinasa, etc.

Es probable que el pH de la solución deba ajustarse antes de la combinación, a fin de garantizar la óptima unión a los adyuvantes, la emulsión con aceites o la estabilidad de la solución. El punto isoeléctrico (pI) de la toxina *alfa* es aproximadamente 5,5 (Smith y col., *The Pathogenic Anaerobic Bacteria* (3ra. Ed.), Charles Thomas Publishers, p. 116 (1984)). El ajuste del pH de la solución de toxoide alterará la carga neta en la proteína, lo que es conveniente para el realce de la unión a ciertos adyuvantes, tales como adyuvantes de aluminio. El pH también puede ajustarse a un nivel que incremente la estabilidad del toxoide *alfa* para el almacenamiento durante un período prolongado. Por ejemplo, es más probable que las proteínas se precipiten de la solución a su pI, si bien habitualmente son estables a 1 unidad de pH por encima o por debajo de este valor.

Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención

Un ácido nucleico, tal como un ADNc, que codifica un polipéptido de la presente invención puede emplearse a fin de generar células huéspedes bacterianas recombinadas que expresan una proteína o un antígeno de la presente invención, por ejemplo, la toxina *alfa*. Dichas células huéspedes recombinadas pueden inactivarse, esto es, pueden convertirse en vacunas bacterianas, y utilizarse en composiciones inmunógenas tales como vacunas.

Además, la obtención y la construcción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, los que codifican una toxina *alfa* de la presente invención, o un fragmento antigénico inactivo de esta, pueden facilitar la producción de la toxina *alfa*, de toxoide *alfa* o sus fragmentos. La toxina *alfa*, el toxoide *alfa* o fragmentos antigénicos de estos son útiles para la elaboración de ciertas vacunas de la presente invención.

En consecuencia, la presente invención comprende construcciones de ácido nucleico que permiten la expresión y el aislamiento de las proteínas o los fragmentos antigénicos de la presente invención. Las secuencias para dichos ácidos nucleicos y correspondientes proteínas recombinadas de los antígenos por ser utilizados en este aspecto de la presente invención son bien conocidas por los expertos en la materia. A continuación se proporciona una pequeña muestra de los antígenos que pueden usarse en las vacunas de la presente invención, junto con su número de acceso GenBank y un artículo científico que describe sus secuencias de aminoácidos.

EJEMPLOS DE ANTÍGENOS QUE PUEDEN USARSE EN LAS VACUNAS

<u>FUENTE</u> <u>Antígeno</u>	<u>ACCESO</u> <u>Nro.</u>	<u>ARTÍCULO</u>
<u>C. PERFRINGENS</u>		
toxina alfa	CAA35186	Saint-Joanis <i>et al.</i> , <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 219 (3): 453-460 (1989).
toxina beta	CAA58246	Steinthorsdottir <i>et al.</i> , <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 130 (2-3): 273-278 (1995).
toxina beta 2	NP_150010	Shimizu <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 99 (2): 996-1001 (2002).
enterotoxina	BAE79112	Miyamoto <i>et al.</i> , <i>J. Bacteriol.</i> , 188 (4): 1585-1598 (2006).
toxina epsilon	AAA23236	Havard <i>et al.</i> , <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 97: 77-82 (1992).
toxina iota	CAA51959	Perelle <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> , 61 (12): 5147-5156 (1993).
toxina kappa	NP_561089	Shimizu <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 99 (2): 996-1001 (2002).
toxina lambda	CAA35187	Saint-Joanis <i>et al.</i> , <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 219 (3): 453-460 (1989).
toxina theta	NP_561079	Shimizu <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 99 (2): 996-1001 (2002).
<u>C. DIFFICILE</u>		
toxina A	A37052	Wren <i>et al.</i> , <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 70: 1-6 (1990).
toxina B	CAA43299	von Eichel-Streiber <i>et al.</i> , <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 233: (1-2), 260-268 (1992).
<u>C. SEPTICUM</u>		
toxina alfa	AAB32892	Ballard <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> , 63 (1): 340-344 (1995).
<u>C. NOVI</u>		
toxina alfa	AAB27213	Balt <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> , 61 (7): 2912-2918 (1993).

¹ Las secuencias proporcionadas en estos artículos se incorporan en la presente solicitud a modo de referencia.

Los ácidos nucleicos codificadores de antígenos de proteínas que pueden usarse en las vacunas de la presente invención además pueden contener secuencias de nucleótidos heterólogas. A fin de expresar una proteína recombinada de la presente invención en una célula huésped, puede construirse un vector de expresión que comprende el correspondiente ADNc. La presente invención, por lo tanto, incluye vectores de expresión que contienen ácidos nucleicos que codifican proteínas recombinadas de la presente invención, incluso sus variantes.

Debido a la degeneración de las secuencias codificadoras de nucleótidos, en la práctica de la presente invención pueden usarse otras secuencias de nucleótidos que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención. Estas incluyen, sin limitación, genes alélicos, genes homólogos de otras cepas, y aquellas alteradas mediante la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo residuo de aminoácido dentro de la secuencia, para producir de ese modo un cambio silente. Se incluyen también las células huéspedes que comprenden los vectores de expresión de la presente invención. Una célula huésped empleada con frecuencia es una célula de *E. coli*.

Se han descrito los métodos generales para la clonación de ADNc y la expresión de sus correspondientes proteínas recombinadas (ver Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, 3ra. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L. I. (2000)).

Además, puede emplearse cualquier técnica para mutagénesis conocida en la materia, a fin de modificar una toxina *alfa* natural de la presente invención, entre ellas, sin limitación, la mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* (Hutchinson y col., *J. Biol. Chem.*, 253: 6551 (1978); Zoller y Smith, *DNA*, 3: 479-488 (1984); Oliphant y col., *Gene*, 44: 177 (1986); Hutchinson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83: 710 (1986); Wang y Malcolm, *BioTechniques*, 26: 680-682 (1999), cuyos contenidos se incorporan en la presente solicitud a modo de referencia, en su totalidad). Pueden emplearse también conectores TAB@ (Pharmacia), etc. y técnicas de PCR para la mutagénesis dirigida a sitio (ver Higuchi, "Using PCR to Engineer DNA", en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Capítulo 6, pp. 61-70 (1989)).

Polipéptidos de la presente invención

La presente invención comprende polipéptidos aislados o recombinados, entre ellos, las toxinas *alfa* y los toxoides *alfa* de la presente invención, sus cepas variantes, sus fragmentos antigénicos inactivos y sus proteínas de fusión. Además, se incluyen también en la presente invención los polipéptidos que contienen secuencias alteradas donde los residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos natural son sustituidos con residuos de aminoácidos funcionalmente equivalentes, para lograr una sustitución de aminoácido conservadora.

Por ejemplo, uno o más de estos residuos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden ser sustituidos con otro aminoácido de polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, para lograr una alteración silente. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de 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, asparagina y glutamina. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina y lisina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Los cambios 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;
- (e) Gln por Asn o viceversa, de manera que pueda mantenerse un NH_2 libre; y
- (f) Ile por Leu o por Val o viceversa, como aminoácidos hidrófobos aproximadamente equivalentes.

Todos los polipéptidos de la presente invención, incluso los fragmentos antigénicos, pueden ser parte de una proteína de fusión. En una realización específica, un polipéptido de fusión se expresa en una célula procariótica. Dicha proteína de fusión puede usarse, por ejemplo, para mejorar la antigenicidad de un antígeno o de uno de sus fragmentos; para disminuir 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 usando una columna de afinidad específica para la proteína/el péptido fusionado al antígeno. Dichas proteínas de fusión incluyen: una proteína de fusión de glutathione-S-transferasa (GST); una proteína de fusión de maltosa-proteína de unión (MBP); una proteína de fusión con marca FLAG; o una proteína de fusión con marca de

polihistidina. Las secuencias conectoras específicas tales como un conector Ser-Gly también pueden ser parte de dicha proteína de fusión.

De hecho, la expresión de un polipéptido de fusión puede facilitar la expresión estable, o permitir la purificación sobre la base de las propiedades del compañero de fusión. En consecuencia, la purificación de los polipéptidos recombinados de la presente invención puede simplificarse utilizando proteínas de fusión que tengan Marcas de afinidad. Por ejemplo, GST une glutatona conjugada a una matriz de soporte sólido; MBP se une a una matriz de maltosa; y polihistidina se quela a una matriz de soporte de quelación Ni (ver Hochuli y col., *Biotechnology*, 6: 1321-1325 (1998)).

La proteína de fusión puede eluirse de la matriz específica con reguladores apropiados, o mediante el tratamiento con una proteasa específica para un sitio de disociación que se ha diseñado genéticamente entre una toxina *alfa*, por ejemplo, y su compañero de fusión. Alternativamente, una toxina *alfa* puede combinarse con una proteína marcadora, tal como la proteína fluorescente verde (Waldo y col., *Nature Biotech.*, 17: 691-695 (1999); Patente de los Estados Unidos Nro. 5 625 048; y WO 97/26333, cuyos contenidos se incorporan en la presente solicitud a modo de referencia, en su totalidad).

Además, o alternativamente, pueden usarse otras etapas de cromatografía de columna (por ejemplo, filtración de gel, intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc.), a fin de purificar los polipéptidos naturales o recombinados de la presente invención (ver a continuación). En muchos casos, dichas etapas de cromatografía de columna emplean la cromatografía líquida de alto rendimiento o métodos análogos, en lugar de los procedimientos más clásicos sobre la base de la gravedad.

Aun más, los polipéptidos de la presente invención, incluso las toxinas *alfa* y sus fragmentos antigénicos inactivos, pueden sintetizarse en forma química (ver, por ejemplo, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman & Co., New York, N. Y., p. 382, Grant, ed. (1992)).

Procedimientos generales para la purificación de polipéptidos

En general, las etapas iniciales para la purificación de un polipéptido de la presente invención pueden comprender el salado o desalado, por ejemplo, en fraccionaciones de sulfato de amonio; fraccionaciones de exclusión de solvente, por ejemplo, una precipitación de etanol. Además, puede emplearse la ultracentrifugación de alta velocidad, sola o en conjunto con otras técnicas de extracción.

Habitualmente, las etapas para el buen aislamiento secundario o la purificación comprenden la absorción de fase sólida usando gel de fosfato de calcio, hidroxiapatita, o la unión de fase sólida. La unión de fase sólida puede efectuarse mediante el enlace iónico, con un intercambiador aniónico, tal como dietilaminoetilo (DEAE), o dietil [2-hidroxipropil] aminoetilo (QAE), SEPHADEX o celulosa; o con un intercambiador catiónico, tal como carboximetilo (CM) o sulfopropilo (SP), SEPHADEX o celulosa. Otros medios alternativos de unión de fase sólida abarcan la explotación de interacciones hidrófobas, por ejemplo, el uso de un soporte sólido tal como fenilSephrose y un regulador de alta salinidad; inmunounión de unión de afinidad, usando, por ejemplo, un anticuerpo de toxina *alfa* ligado a un soporte activado. Otros soportes de fase sólida comprenden aquellos que contienen tintes específicos o lectinas, etc.

Otra técnica de soporte de fase sólida utilizada a menudo al final del procedimiento de purificación se basa en la exclusión por tamaño, tal como con los geles de SEPHAROSA y SEPHADEX. Alternativamente, puede emplearse una técnica de membrana presurizada o centrifuga, usando filtros de membrana de exclusión por tamaño. Con frecuencia, estos dos métodos se usan en serie.

Las separaciones de soporte de fase sólida en general se realizan en lotes, con centrifugación a baja velocidad, o mediante la cromatografía de columna. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), que comprende técnicas relacionadas tales como FPLC, es actualmente el medio más común para efectuar la cromatografía líquida. Pueden además llevarse a cabo técnicas de exclusión por tamaño con la ayuda de la centrifugación a baja velocidad. Aun más, pueden emplearse técnicas de penetración por tamaños, tales como las técnicas de electroforesis de gel. Estas técnicas en general se efectúan en tubos, placas, o mediante electroforesis capilar.

Casi todas las etapas que suponen la purificación de polipéptidos emplean una solución regulada. A menos que se especifique lo contrario, se usan en general concentraciones de 25 a 100 mM de sales reguladoras. Los reguladores de baja concentración habitualmente tienen concentraciones de 5 a 25 mM, mientras que los reguladores de alta concentración tienen a menudo concentraciones del agente regulador de entre 0,1 y 2,0 M. Los reguladores típicos pueden obtenerse de la mayoría de los catálogos bioquímicos, e incluyen los reguladores clásicos tales como Tris, pirofosfato, monofosfato y difosfato, y los reguladores de Good, tales como Mes, Hepes, Mops, Tricine y Ches (Good y col., *Biochemistry*, 5: 467 (1966); Good e Izawa, *Meth. Enzymol.*, 24B: 53 (1972); y Ferguson y Good, *Anal. Biochem.*, 104: 300 (1980)).

Los materiales para efectuar todas estas técnicas pueden obtenerse de una variedad de fuentes comerciales, tales como Sigma Chemical Company, en St. Louis, Missouri.

Componentes de la vacuna

Toxoide alfa de *C. perfringens*. En realizaciones particulares, es conveniente que la vacuna para animales contenga la cantidad mínima del toxoide *alfa*, necesaria para la protección contra enteritis necrótica. Se determinó que este nivel era de 2 unidades de Potencia de Combinación Total (TCP) por dosis, en las condiciones particulares ejemplificadas a continuación. Las unidades TCP se establecen sobre la base de estándares internacionales (Batty, *Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology*, Capítulo 8, Vol. 5A (1971), ed. J. R. Norris y D. W. Ribbons), y las vacunas de la presente invención pueden combinarse sin dificultad para tener la potencia deseada. Pueden emplearse menos de 2 unidades TCP, aun en estas condiciones, si la vacuna además comprende estimulantes de la inmunidad. En cualquier caso, es preferible que la vacuna produzca 4 o más unidades antitoxina por ml de suero del animal.

Cuantificación de toxoide alfa. En general, es conveniente la cuantificación del toxoide *alfa*, a fin de garantizar la inclusión de niveles óptimos en la vacuna. Un método adecuado para la cuantificación de toxoides emplea el ensayo de Potencia de Combinación Total (TCP). En este ensayo, se pone en contacto un volumen específico del sobrenadante de toxoide *alfa* con una cantidad conocida de unidades de antitoxina. Después de proporcionar un periodo de incubación adecuado para permitir la unión de la antitoxina y el toxoide *alfa*, por ejemplo, 0,5 a 2 horas, se agrega una cantidad conocida de la toxina *alfa*. Entonces se proporciona un periodo adecuado para permitir la unión de la antitoxina libre restante con la toxina *alfa*. La cantidad de toxina *alfa* libre luego se determina agregando a la solución un sustrato para la actividad de fosfolipasa C de la toxina *alfa*. Los sustratos adecuados incluyen glóbulos rojos (en particular, glóbulos rojos de oveja) y lecitina. Entonces puede cuantificarse el toxoide *alfa* a través del cálculo, sobre la base de la cantidad de

actividad de fosfolipasa C. Cuanto mayor es la cantidad de toxoide *alfa* presente en la solución de ensayo, mayor es la cantidad de actividad de fosfolipasa C medida en el ensayo.

Alternativamente, la determinación puede llevarse a cabo sin la medición de la actividad de fosfolipasa C; por ejemplo, puede emplearse cualquier análisis de unión de anticuerpo competitivo, que comprende la incorporación de una etapa de cromatografía, un ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), o un análisis de unión competitiva por medio de un instrumento Biacore, o similares.

Antígenos adicionales. Las enfermedades clostridiales a menudo se manifiestan como infecciones mixtas, y por lo tanto, la adición de otros toxoides clostridiales puede reducir aun más la patología y los signos clínicos. Ejemplos, sin limitación, de otros toxoides clostridiales de organismos que se sabe provocan enteritis gástrica, incluso aquellos de *C. perfringens*, que pueden agregarse a una vacuna de la presente invención a fin de incrementar la potencia contra infecciones mixtas incluyen: toxina *beta*, toxina *beta* 2, toxina *theta*, toxina *épsilon*, enterotoxina, toxina *kappa*, toxina *lambda* y toxina *iota* de *C. perfringens*; toxina hemorrágica (HT, por sus siglas en inglés) y toxina letal (LT, por sus siglas en inglés) de *C. sordellii*; toxinas A y B de *C. difficile*; toxina *alfa* de *C. septicum*; y toxinas *alfa* (A) y *beta* (B) de *C. novyi*.

Pueden incluirse también antígenos de otras bacterias, otros virus, hongos o parásitos, en las vacunas de la presente invención. Dichos antígenos comprenden otras toxinas u otros toxoides, bacterias o extractos de bacterias; hongos o extractos de hongos; virus o proteínas virales; y parásitos o proteínas de parásitos. Los antígenos virales, bacterianos y parasitarios apropiados de las fuentes provistas en esta invención son bien conocidos en el arte.

Ejemplos, sin limitación, de organismos bacterianos son: *Escherichia coli*, género *Camplobacter*, género *Pasteurella*, género *Staphylococcus*, género *Streptococcus*, género *Enterococcus*, Chlamydia, género *Erysipelas*, *Pasteurella*, *Bordetella* y *Ornithobacterium*.

Ejemplos, sin limitación, de toxinas relacionadas son: lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, que según se sabe, mejora la respuesta inmunológica de las vacunas, y en consecuencia, mejora la producción de antitoxinas para la toxina *alfa* de *C. perfringens* y micotoxinas.

Ejemplos, sin limitación, de virus apropiados son: coronavirus, rotavirus, astrovirus, virus de tipo enterovirus, torovirus, adenovirus, reovirus, birnavirus, virus del herpes, paramixovirus, picornavirus, virus de la enfermedad de Mareks, virus de la enteritis hemorrágica y virus de la enfermedad de Newcastle.

Ejemplos, sin limitación, de parásitos son: coccidios, la especie *Eimeria*, por ejemplo, y criptosporidios (ver US 2004/0018215A1, cuyos contenidos se incorporan en la presente solicitud a modo de referencia, en su totalidad).

Adyuvantes

Los adyuvantes además son útiles para mejorar la respuesta inmunológica, o para incrementar la estabilidad de las preparaciones de vacuna. Los adyuvantes típicamente se describen como estimulantes no específicos del sistema inmunológico, aunque también pueden ser de utilidad para apuntar armas específicas del sistema inmunológico. Pueden agregarse a la vacuna uno o más compuestos que tengan esta actividad. Por lo tanto, las vacunas particulares de la presente invención comprenden además un adyuvante. Ejemplos de compuestos químicos que pueden emplearse como adyuvantes incluyen, sin limitación,

compuestos de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio); aceites metabolizables y no metabolizables; aceites minerales, entre ellos, derivados de oleatos de manuro (manita + anhídrido) en solución de aceite mineral (por ejemplo, MONTANIDE ISA 70, de Seppic SA, Francia); y aceites minerales livianos, tales como DRAKEOL 6VR; polímeros en bloque; ISCOM (complejos estimulantes del sistema inmunológico); vitaminas y minerales (entre ellos, sin limitación: vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12); y CARBOPOL®. Otros adyuvantes adecuados, que a veces se han referido como estimulantes inmunológicos, incluyen, sin limitación: citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas, sobrenadantes de cultivos celulares de linfocitos, monocitos, células de órganos linfoides, preparaciones celulares o extractos de plantas, bacterias o parásitos (*Staphylococcus aureus* o preparaciones de lipopolisacáridos) o mitógenos.

En general, se administra un adyuvante al mismo tiempo que un antígeno de la presente invención. Sin embargo, o alternativamente, los adyuvantes también pueden administrarse dentro de un período de dos semanas antes de la vacunación, o durante un período después de la vacunación, es decir, siempre que el antígeno, por ejemplo, un toxoide *alfa*, continúe en los tejidos.

Preparación de las vacunas

Se proveen además los procesos para la elaboración de las vacunas de la presente invención. En una realización, la vacuna comprende la mezcla de una combinación segura e inmunológicamente eficaz de un antígeno de la presente invención, por ejemplo, un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* de Tipo único, y un adyuvante aceptable para uso farmacéutico. La cantidad de toxoide *alfa* puede ser cuantificada a fin de contener por lo menos 2 unidades de Potencia de

Combinación Total (TCP) por dosis de la vacuna. El sobrenadante de toxoide *alfa* puede concentrarse con la finalidad de minimizar el tamaño de la dosis necesaria para obtener por lo menos 4,0 unidades antitoxina (A. U.) por ml de antisuero de un animal vacunado. La adición de otros agentes de modulación inmunológica aceptables para uso farmacéutico puede reducir las exigencias de TCP a menos de 2 unidades por dosis, siempre que la vacunación todavía logre las 4,0 A. U. necesarias de anticuerpo antitoxina *alfa*, por ml de antisuero del animal vacunado. En ciertas realizaciones, el toxoide *alfa* de *C. perfringens* es adicionalmente purificado desde los sobrenadantes de toxoide *alfa*, mediante técnicas tales como, sin limitación, concentración/ultrafiltración, cromatografía y centrifugación.

Administración de las vacunas

Las vacunas pueden administrarse como un líquido, una emulsión, un polvo seco, o en una neblina, a través de cualquier vía parenteral, vía endovenosa, vía intraperitoneal, vía intradérmica, mediante escarificación, vía subcutánea, vía intramuscular, o pueden ser inoculadas por medio de una vía mucosal, por ejemplo, la vía oral, vía intranasal, como un aerosol, mediante gotas oculares, mediante la administración *in ovo*, o mediante implante como un polvo liofilizado.

Sujetos animales

El término "sujeto animal" se refiere a una especie animal capaz de ser infectado por una bacteria patógena, y en una realización particular, incluye seres humanos. Los sujetos animales apropiados abarcan aquellos animales salvajes, ganado (por ejemplo, criado para la obtención de carnes, leche, manteca, huevos, pieles, cuero, plumas o lana), animales de carga, animales de investigación,

animales de compañía, así como también, aquellos criados para zoológicos, o en zoológicos, hábitats salvajes o circos.

En una realización particular, un sujeto animal de la invención es un animal "productor de alimento". Para los propósitos de la presente invención, se entenderá que el término animal "productor de alimento" incluirá todos los animales criados para consumo (por ejemplo, pavos, pollos parrilleros) o para la obtención de productos consumibles (por ejemplo, vacas lecheras, gallinas para poner huevos y similares) por seres humanos u otros animales. Una lista, sin limitación, de dichos animales incluye aves tales como aves de corral, es decir, pollos, pavos, gansos, patos, avestruces, etc.; ganado bovino (por ejemplo, vacas, vacas lecheras, búfalo); ganado ovino (por ejemplo, ovejas y cabras); ganado porcino (por ejemplo, cerdos, cochinos o puercos); y ganado equino (por ejemplo, caballos), etc.

En otra realización, el sujeto animal es un animal de compañía. Para los propósitos de la presente invención, se entenderá que el término animal de "compañía" incluirá gatos hogareños (felinos), perros (caninos), especies de conejos, caballos (equinos), roedores (por ejemplo, cobayos, ardillas, ratas, ratones, gerbos y hámsters), primates (por ejemplo, monos) y aves, tales como pajaritos, palomas, loros, pericos, guacamayos, canarios y similares.

Se contempla además que otros animales se benefician con las vacunas de la invención, entre ellos, animales marsupiales (tales como canguros), reptiles (tales como tortugas de granja), aves de juego, cisnes, rátidas y otros animales domésticos de importancia económica.

Los siguientes ejemplos se proponen solo con propósitos de ejemplificación de la presente invención, y no deben interpretarse como un límite al alcance de la invención de manera alguna.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

EFICACIA DE LA VACUNA EN GALLINAS PARRILLERAS VACUNADAS POR VÍA SUBCUTÁNEA

Síntesis

La vacunación de gallinas parrilleras por vía subcutánea, usando una vacuna que comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens* de Tipo único (Tipo A) logra: (1) una respuesta inmunógena en las gallinas parrilleras vacunadas; (2) significativo nivel de anticuerpos antitoxoide *alfa* en los huevos de las gallinas parrilleras vacunadas; y (3) la protección pasiva de la posterior descendencia de las gallinas vacunadas.

Materiales

Toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A. Se prepara toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A de la siguiente manera: se desarrolla cultivo de *C. perfringens* Tipo A en condiciones anaerobias en un fermentador de gran escala (5000 l), a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$. Durante la fermentación, se agrega hidróxido de sodio a fin de mantener un pH de $7,8 \pm 2$. Se agrega además carbohidrato (dextrina) durante la fermentación (hasta 1% p/v), para favorecer el crecimiento. El cultivo se deja desarrollar durante 3 a 6 horas. Al final del período de crecimiento, se agrega solución de formaldehído al fermentador, a un nivel final que no excede 0,5%. Las células se eliminan mediante centrifugación, y el sobrenadante resultante se filtra con un filtro de profundidad que tiene tamaños de poro en el rango de 0,25-2,0 μm . La temperatura se mantiene a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en este proceso. Luego el sobrenadante de cultivo inactivado se somete a diafiltración y se concentra 10-30 veces, usando

ultrafiltración con filtros de no más de 20 000 de corte de peso molecular. El sobrenadante concentrado se almacena a 2-8°C para la futura combinación en vacunas. Antes de la combinación, el sobrenadante concentrado se somete a un ensayo para evaluar la potencia, usando el ensayo de potencia de combinación (TCP) descrito anteriormente. La potencia de cada lote de toxoide se asigna en unidades TCP por ml.

Vacuna. El sobrenadante que comprende el toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A inactivado se combina como una emulsión de agua en aceite que contiene 4 Unidades de Potencia de Combinación (TCP) por ml. La emulsión se prepara con una fase oleosa al 70% y una fase acuosa al 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 como se describe a continuación:

Toxoides de <i>C. perfringens</i> Tipo A + solución salina	88%
Tween 80 33%/solución salina	12%

Se agrega un total de 30% de fase acuosa, lentamente, a la fase oleosa al 70%, y se emulsiona con un homogenizador Silverson (pueden emplearse también otros homogeneizadores en línea). El tiempo de la homogenización depende del volumen de la emulsión, y se determina por la viscosidad, el tamaño de partícula y la estabilidad de la emulsión durante por lo menos tres días a 37°C. Se agrega gentamicina a la fase acuosa, para proporcionar una concentración final de hasta 30 µg/ml de volumen en serie. Se agrega tiomersal a la fase acuosa, para proveer una concentración final de hasta 0,01% de volumen en serie.

Vacunación. Las gallinas de menos de un año (*pullets*) se vacunan por vía subcutánea con 0,5 ml por dosis de la vacuna combinada. 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 gallinas parrilleras con la vacuna combinada descrita anteriormente, que contiene 1 TCP por dosis. Un segundo grupo de veinte gallinas se vacuna con la vacuna combinada descrita con anterioridad, que contiene 2 TCP por dosis. Se usa un tercer grupo de veinte gallinas como control, que no se vacuna. Se introducen en cada grupo de gallinas un total de 2 a 3 gallos, a fin de producir huevos fertilizados.

Inmunidad pasiva

Se recogen los huevos de gallinas vacunadas y de control de 32; 52; y 65 semanas de edad. Los pollos de la descendencia que salen de estos huevos se usan a fin de evaluar la protección pasiva, como se cita en la Tabla 1.

Tabla 1

Cantidad de pollos de la descendencia usados en cada momento

<u>Edad de las gallinas</u>	<u>Pollos de la descendencia en el grupo vacunado</u>	<u>Pollos de la descendencia en el grupo de control de estímulo</u>
32 semanas	9	9
52 semanas	30	20
65 semanas	14	18

Se alimenta a los pollos con una dieta de alto contenido proteico, sin medicación, durante las primeras dos semanas, y luego se cambia la dieta a una alimentación normal durante el resto del ensayo. Cada ave se estimula por vía oral con una *C. perfringens* Tipo A virulenta que expresa tanto la toxina *alfa* como la toxina *beta* 2. La dosis de estímulo contiene $6,3 \times 10^7$ a $6,3 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por ml, en una dosis de 3 ml. Las aves se estimulan durante tres días consecutivos, comenzando a los 18 ó 19 días de edad. Dos días después del último día del estímulo, las aves son sacrificadas y luego examinadas para detectar lesiones de enteritis necrótica. Los resultados de eficacia para los pollos de la descendencia se citan en forma individual en las Tablas 2 a 4, y representan el estado de vacunación de la madre de los pollos individuales, y el alcance de sus lesiones de enteritis necrótica, si las hay, de acuerdo con la escala de clasificación que se proporciona a continuación. La Tabla 2 representa los pollos de la

descendencia de gallinas de 32 semanas de edad. La Tabla 3 representa los pollos de la descendencia de gallinas de 52 semanas de edad; y la Tabla 4 representa los pollos de la descendencia de gallinas de 65 semanas de edad. La Tabla 5 muestra la mediana de clasificación para los pollos de la descendencia de gallinas vacunadas con 2 TCP por dosis. Como se expone, la descendencia de las gallinas vacunadas está significativamente protegida contra el estímulo bacteriano administrado, en relación con la descendencia de las gallinas no vacunadas.

Escala de clasificación para lesiones de enteritis necrótica (EN)

0 = Sin grandes lesiones de enteritis necrótica en el intestino delgado; el intestino tiene elasticidad normal (se enrolla sobre sí mismo después de ser abierto).

1 = Pared intestinal delgada y flácida (el intestino permanece plano cuando se abre, y no se enrolla nuevamente a la posición normal); exceso de moco, o moco espesado, que cubre la membrana mucosa; o enrojecimiento leve focal o multifocal de la mucosa; o congestión de los vasos serosos.

2 = Área o pocas áreas multifocales de enrojecimiento e hinchazón de la pared intestinal; área o pocas áreas multifocales de ulceración o necrosis de la mucosa intestinal.

3 = Grandes áreas multifocales de necrosis y ulceración de la mucosa intestinal $\pm$ significativa hemorragia o capa de fibrina o restos necróticos en la superficie mucosal (apariencia de toalla rusa).

4 = Animal muerto con grandes lesiones de enteritis necrótica de clasificación 2 o superior.

Tabla 2
Clasificaciones de lesiones de enteritis necrótica en pollos individuales de la
descendencia de gallinas de 32 semanas de edad

<u>Controles no</u> <u>vacunados, sin</u> <u>estímulo</u>	<u>Controles no</u> <u>vacunados, con</u> <u>estímulo</u>	<u>Vacuna</u> <u>con 1 TCP</u> <u>por dosis</u>	<u>Vacuna</u> <u>con 2 TCP</u> <u>por dosis</u>
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
Clasificaciones de lesiones de enteritis necrótica en pollos individuales de
la descendencia de gallinas de 52 semanas de edad

<u>Controles no vacunados, sin estímulo</u>	<u>Controles no vacunados, con estímulo</u>	<u>Vacuna con 2 TCP por dosis</u>
0	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
		0
		2
		1
		0
		1
		0
		1
		0
		2
		0
Media = 0	1,7	0,6
Mediana = 0	1,5	0,5

00000

Tabla 4
Clasificaciones de lesiones de enteritis necrótica en pollos individuales de
la descendencia de gallinas de 65 semanas de edad

<u>Controles no</u> <u>vacunados, sin</u> <u>estímulo</u>	<u>Controles no</u> <u>vacunados, con</u> <u>estímulo</u>	<u>Vacuna con 2</u> <u>TCP por dosis</u>
0	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	
	2	
	3	
	3	
Media = 0	1,5	0,6
Mediana = 0	2,0	0,0

Tabla 5
Mediana de clasificación en pollos de la descendencia de gallinas
vacunadas con una dosis de 2 TCP

<u>GRUPOS DE TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIANA DE CLASIFICACIÓN DE LESIONES DE ENTERITIS NECRÓTICA DE LA DESCENDENCIA DE GALLINAS</u>		
	<u>32 SEMANAS DE EDAD</u>	<u>52 SEMANAS DE EDAD</u>	<u>65 SEMANAS DE EDAD</u>
Grupo de vacunación	1	0,5	0
Grupo de control	2	1,5	2

Valoraciones de anticuerpo

Suero: Se toman muestras de sangre de las gallinas a las 33 y 78 semanas de edad. Se deja coagular la sangre durante 2 a 4 horas a temperatura ambiente, y luego, se obtiene el suero después de la centrifugación. Se almacena el suero a -10°C o temperatura inferior, hasta el ensayo de valoración de anticuerpo. Se evalúa la valoración de anticuerpo para la toxina de *C. perfringens alfa* mediante un ensayo de inhibición de hemólisis usando diluciones en serie y glóbulos rojos de oveja, de la siguiente manera: se realizan diluciones en serie (de dos veces) en una placa de microvaloración de base en V, para cada muestra evaluada. Se agrega una cantidad conocida de toxina *alfa* a cada receptáculo que contiene una dilución de la muestra. Las placas luego se incuban durante una hora a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$, para permitir que los anticuerpos obtenidos del suero formen complejos con la toxina *alfa*. Después de esta incubación, se agrega a los receptáculos una solución al 0,5% de glóbulos rojos de oveja, y las placas se incuban durante tres horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para permitir la lisis de la toxina *alfa* que no formó complejos, con los glóbulos rojos. Luego las placas se controlan para verificar la ausencia de hemólisis. El número recíproco de la dilución más alta de la muestra de ensayo que no exhibe hemólisis se considera el punto final. Las valoraciones de anticuerpo se muestran en las Tablas 6 a 8.

Yemas de huevo: Se procesan las yemas de huevo a fin de determinar la valoración de anticuerpo. En síntesis, se separa la yema y se mezcla con regulador de extracción comercial (Promega EGGstract System®, Promega Catálogo Nro. G1531 y G2610, Madison, Wisconsin). Luego de la extracción, se obtiene una miniesfera IgY, que entonces se resuspende hasta el volumen original de la yema con solución salina regulada con fosfato. Se reúnen los extractos de yema de huevo de por lo menos 5 huevos, y se evalúan a fin de establecer la valoración de anticuerpo usando un ensayo de inhibición de

hemólisis (HI, por sus siglas en inglés), como se describe con anterioridad para el suero. De esta manera, las yemas de los huevos recogidos de puestas a 40; 52; y 65 semanas de edad se evalúan para la determinación de la valoración de anticuerpo. Las valoraciones de anticuerpo para las yemas de huevo se muestran en la Tabla 9.

Tabla 6
Valoración de anticuerpo para toxina alfa de *C. perfringens* Tipo A, de
suero de gallinas individuales a las 33 semanas de edad

<u>Gallinas vacunadas</u> <u>(2 TCP/Dosis)</u>	<u>Gallinas de</u> <u>control*</u>
1024	1
8192	2
256	1
1024	2
1024	2
256	2
256	2
1024	2
512	1
64	1
Media geo. = 588	Media geo. = 2

* Los valores <2 se consideraron 1, con propósitos de calcular la media geométrica.

00000

Tabla 7
Valoración de anticuerpo para toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A, de
suero de gallinas individuales a las 78 semanas de edad

<u>Gallinas vacunadas</u> <u>(2 TCP/Dosis)</u>	<u>Gallinas de</u> <u>control *</u>
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 geo. = 235	Media geo. = 2

* Los valores <2 se consideraron 1, con propósitos de calcular la media geométrica.

00007

Tabla 8

<u>Media geométrica de valoración de inhibición de hemólisis en suero de gallinas en varios momentos</u>		
<u>GRUPOS DE TRATAMIENTO</u>	<u>VALORACIÓN EN SUERO</u> <u>(EDAD EN LA TOMA DE LA MUESTRA)</u>	
	<u>33 SEMANAS</u>	<u>78 SEMANAS</u>
<u>GRUPO DE VACUNACIÓN</u> <u>(2 TCP/DOSIS)</u>	588	235
<u>GRUPO DE CONTROL</u>	=2	2

Tabla 9

Valoración de inhibición de hemólisis en yema de huevos de gallinas,
recogidos en varios momentos

<u>GRUPOS DE TRATAMIENTO</u>	<u>VALORACIÓN EN YEMA DE HUEVO</u> <u>(EDAD EN EL MOMENTO DE LA RECOLECCIÓN)</u>		
	<u>40 SEMANAS</u>	<u>52 SEMANAS</u>	<u>65 SEMANAS</u>
<u>GRUPO DE VACUNACIÓN</u>	515	2048	64
<u>GRUPO DE CONTROL</u>	=2	2	=2

EJEMPLO 2

EFICACIA DE LA VACUNA EN GALLINAS PARRILLERAS VACUNADAS POR VÍA INTRAMUSCULAR

Síntesis

La vacunación de gallinas parrilleras por vía intramuscular, usando una vacuna que comprende un toxoide *alfa* de *C. perfringens* de Tipo único (Tipo A) también logra: (1) una respuesta inmunógena en las gallinas parrilleras vacunadas; (2) significativo nivel de anticuerpos antitoxoide *alfa* en los huevos de las gallinas parrilleras vacunadas; y (3) la protección pasiva de la posterior descendencia de las gallinas vacunadas.

Inmunidad pasiva

Se vacuna un total de 14 gallinas menores que un año de edad, por vía intramuscular con dos dosis de 0,5 ml de la vacuna del Ejemplo 1 anterior, que contiene 2 TCP. Se usa un grupo adicional de 40 gallinas como controles. Se introducen tres gallos en cada grupo de gallinas, como se describe con anterioridad. La primera dosis de vacuna se administra a las 10 semanas de edad, y la segunda dosis se administra a las 23 semanas de edad. Se recogen los huevos de las gallinas a las 32 semanas de edad, y se rompen para determinar la protección pasiva en los pollos de la descendencia, luego de un estímulo experimental de *C. perfringens*.

La Tabla 10 muestra la incidencia de enteritis necrótica y la mediana de clasificación para sus correspondientes lesiones, según lo establecido por la escala de clasificación del Ejemplo 1 anterior, para los pollos de la descendencia de gallinas vacunadas y de control. La Tabla 11 muestra la mediana de clasificación para las lesiones de enteritis necrótica para los pollos de la descendencia individuales. La Tabla 12 cita las valoraciones de anticuerpos contra la toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A de los pollos individuales de la

descendencia, mientras que las valoraciones de anticuerpo para las yemas de huevo de los huevos recogidos de las gallinas vacunadas y de control a las 32 semanas de edad se proporciona en la Tabla 13.

Tabla 10
Incidencia de enfermedad y lesiones de enteritis necrótica

<u>GRUPOS DE TRATAMIENTO</u>	<u>Cantidad de aves</u>	<u>% Incidencia</u>	<u>Mediana de clasificación</u>	<u>Media de clasificación</u>
<u>GRUPO DE VACUNACIÓN</u>	8	0 (0/8)	0	0
<u>GRUPO DE CONTROL</u>	29	76 (22/29)	2	1,7

00000

Tabla 11
Clasificaciones de lesiones de enteritis necrótica en pollos de la
descendencia individuales de gallinas de 32 semanas de edad

<u>Controles no</u> <u>vacunados, sin</u> <u>estímulo</u>		<u>Controles no</u> <u>vacunados, con</u> <u>estímulo</u>		<u>Vacuna con 2 TCP</u> <u>por dosis</u>
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 =	0,0	1,7		0,0
Mediana =	0,0	2,0		0,0

Tabla 12
Valoración de anticuerpos en suero de gallinas individuales a las 35
semanas de edad²

GALLINAS VACUNADAS (2 TCP/Dosis)	GALLINAS DE CONTROL ²
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

² Los anticuerpos para la toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A se midieron por medio de un ensayo de inhibición de hemólisis descrito en el Ejemplo 1 anterior.

³ Los valores < 2 se consideraron 1 con el propósito de calcular la media geométrica.

00002

Media geo. = 681

1
2
1
1
1
= 2

Tabla 13
Valoración de anticuerpo en yema de huevo recogida de gallinas a las 32
semanas de edad

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

EJEMPLO 3
SEROLOGÍA EN GALLINAS DE MENOS DE UN AÑO DE EDAD
LEGHORN BLANCAS SPF (LIBRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS, POR
SUS SIGLAS EN INGLÉS) VACUNADAS POR VÍA SUBCUTÁNEA
Valoraciones de anticuerpos

Se evalúan las valoraciones de anticuerpos en gallinas de menos de un año de edad Leghorn blancas SPF, vacunadas por vía subcutánea con la vacuna del Ejemplo 1 anterior, que contiene 1; 2 ó 3 TCP. Las gallinas 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 toman muestras de sangre 6 semanas después de la vacunación de refuerzo. Se evalúa el suero de cada ave individual para establecer la valoración de anticuerpo por medio del

ensayo de inhibición de hemólisis, como se describe con anterioridad en el Ejemplo 1.

Tabla 14
Valoración de anticuerpo para toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A en suero
de gallinas de menos de un año de edad individuales

1 TCP/DOSIS		2 TCP/DOSIS		3 TCP/DOSIS		CONTROLES	
<u>Id. Ave</u>	<u>Valorac.</u>	<u>Id. Ave</u>	<u>Valorac.</u>	<u>Id. Ave</u>	<u>Valorac.</u>	<u>Id. Ave</u>	<u>Valorac.*</u>
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 geo.	242		1290		724		<2

*Las valoraciones de <2 se consideran 1 para determinar la valoración de la media geométrica.

Las valoraciones de anticuerpo en los huevos recogidos a las 25 semanas de edad de las puestas de gallinas Leghorn blancas se evalúan para establecer la valoración de inhibición de hemólisis. Los resultados se proporcionan en la Tabla 15.

00074

Tabla 15
Valoración de anticuerpo para la toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A de
yema de huevo reunida

<u>GRUPO</u>	<u>VACUNA</u>	<u>VALORACIÓN DE</u> <u>ANTICUERPO</u>
1	1 TCP	512
2	2 TCP	512
3	3 TCP	512
4	Controles	<2

DETERMINACIÓN DE VALORACIÓN DE NEUTRALIZACIÓN DE TOXINA
(TNT, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS) EN SUERO REUNIDO DE GALLINAS
LEGHORN BLANCAS

Se evalúa la valoración de antitoxina para la toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A en el suero reunido de las gallinas, usando ratones. Los sueros reunidos se evalúan para establecer la valoración antitoxina por medio de un método descrito en el *Code of Federal Regulations, Animal and Plant Health Inspection Service, Department of Agriculture*. Los métodos empleados para medir la antitoxina son similares al actual 9 CFR § 113.111 (c), excepto que se usan los reactivos toxina *alfa* y antitoxina, en lugar de toxina *beta* y antitoxina. Se usan los siguientes reactivos de ensayo para establecer la valoración antitoxina:

- 1) antitoxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A: IRP 426 (obtenida del Center for Veterinary Biologics, USDA).
- 2) toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A: IRP 446 (obtenida del Center for Veterinary Biologics, USDA).

En síntesis, se combinan suero o antitoxina estándares diluidos, con una cantidad conocida de toxina *alfa* estándar. Entonces se detecta la presencia de toxina no neutralizada, mediante la inyección de la mezcla en ratones. Luego se

evalúa la comparación con los efectos de cantidades conocidas de antitoxina *alfa* estándar sobre la actividad de toxina, estableciendo la dilución de suero estándar o de ensayo que protege los ratones contra la muerte en un bioensayo. La valoración antitoxina en el suero reunido de las gallinas menores que un año Leghorn blancas se muestra en la Tabla 16, a continuación.

Tabla 16
Valoración de neutralización de toxina (TNT) en gallinas menores que un
año vacunadas y de control

GRUPO	VACUNA	VALORACIÓN ANTITOXINA EN SUERO	
		Prevacunación	Posvacunación
1	1 TCP	<1	≥2 y <4
2	2 TCP	<1	≥4
3	3 TCP	<1	≥4
4	Controles	<1	<1

EJEMPLO 4
SEROLOGÍA EN GALLINAS DE MENOS DE UN AÑO DE EDAD
LEGHORN BLANCAS SPF VACUNADAS POR VÍA INTRAMUSCULAR
Valoraciones de anticuerpos

Se evalúan las valoraciones de anticuerpos en gallinas de menos de un año de edad Leghorn blancas SPF, vacunadas dos veces por vía intramuscular con la vacuna del Ejemplo 1 anterior, que contiene 1; 2 ó 3 TCP. Las gallinas se vacunan a las 10 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 toman muestras de sangre 7 semanas después de la vacunación de refuerzo. Se evalúa el suero de las gallinas individuales para establecer la valoración de anticuerpo por medio del ensayo de inhibición de hemólisis, como se describe con

00000

anterioridad en el Ejemplo 1, y los resultados se muestran en las Tablas 17 y 18 que siguen.

Tabla 17
Valoración de anticuerpo para toxina alfa de *C. perfringens* Tipo A en suero de gallinas de menos de un año de edad individuales

1 TCP		2 TCP		3 TCP		Controles	
Id. Ave	Valor.	Id. Ave	Valor.	Id. Ave	Valor.	Id. Ave	*Valoración
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 geo.	540		1024		2580		3

* Las valoraciones de <2 se consideran 1 para la determinación de la valoración de la media geométrica.

La valoración de neutralización de toxina (TNT) de los sueros reunidos se evalúa empleando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 3 anterior, y los resultados se proveen en la Tabla 18 que sigue.

Handwritten signature or mark.

Tabla 18
Valoración de neutralización de toxina (TNT) en gallinas de menos de un
año vacunadas y de control

<u>GRUPO</u>	<u>VACUNA</u>	<u>VALORACIÓN DE ANTITOXINA</u> <u>EN SUERO</u>	
		<u>Prevacunación</u>	<u>Posvacunación</u>
1	1 TCP	<1	≥4
2	2 TCP	<1	≥4
3	3 TCP	<1	≥4
4	Controles	<1	<1

La valoración de anticuerpo en los huevos recogidos a las 25 semanas de edad de estas gallinas que ponen huevos Leghorn blancas se evalúa para establecer la valoración de inhibición de hemólisis, como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Los resultados se resumen en la Tabla 19 a continuación.

Tabla 19
Valoración de anticuerpo para toxina *alfa* de *C. perfringens* Tipo A en yema
de huevo reunida

<u>GRUPO</u>	<u>VACUNA</u>	<u>VALORACIÓN DE</u> <u>ANTICUERPO</u>
1	1 TCP	512
2	2 TCP	256
3	3 TCP	512
4	Controles	<2

EJEMPLO 5
COMPARACIÓN DE UNA VACUNA MULTIVALENTE Y UNA
MONOVALENTE DE TOXOIDE ALFA DE C. PERFRINGENS EN GANADO
PORCINO

Síntesis

Se describen métodos para proporcionar la protección pasiva en cerdos neonatos, mediante la vacunación de puercas/cerdas preñadas con las vacunas de toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A de la presente invención. Los resultados muestran una respuesta de anticuerpo en puercas, que puede transferirse a los cochinitos a través del calostro.

Materiales

Toxoide alfa de C. perfringens Tipo A. Se prepara toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

Vacuna. Puede combinarse una vacuna de la presente invención con toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A inactivado que contiene >2 Unidades de Potencia de Combinación Total. La vacuna puede combinarse con cualquier adyuvante descrito en esta invención, entre ellos, una emulsión de aceite en agua que contiene minerales, aceites vegetales (aceite de maní, aceite de soja), escualeno, escualeno y otros aceites metabolizables. Se pueden usar también otros adyuvantes tales como Seponin, CARBOPOL® y adyuvantes que contienen aluminio (hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) en la preparación de vacuna. Además, la vacuna puede contener otros antígenos, entre ellos, *E. coli* (K88, K99, 987P, Tipo 1), toxoides de *C. perfringens* o toxoides de otras bacterias patógenas, por ejemplo, *Clostridium difficile*, rotavirus y/o criptosporidios.

Administración

Las vacunas se administran a las puercas/cerdas preñadas antes de parir, mediante la vía intramuscular o subcutánea, a fin de proporcionar la protección pasiva en los cerdos neonatos a través de la ingestión del calostro.

Resultados

El estudio se conduce en cerdos de 32 semanas de edad, para comparar tres vacunas:

Vacuna Nro. 1: combinada con un adyuvante de hidróxido de aluminio, que contiene 4 TCP de toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A en una dosis de 2 ml.

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

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

Un grupo de diez cerdos se vacuna por vía intramuscular con 2 ml de Vacuna Nro. 1. Un segundo grupo de diez cerdos se vacuna por vía intramuscular con 2 ml de Vacuna Nro. 2. El tercer grupo de siete cerdos se vacuna con 2 ml de Vacuna Nro. 3. Se administra una dosis de refuerzo de 2 ml 20 días después de las vacunaciones iniciales. Se recogen las muestras de suero 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). Las muestras de suero entonces se evalúan para establecer la valoración de anticuerpo para toxina *alfa* mediante el ensayo de inhibición de hemólisis que se describe en el Ejemplo 1 anterior. Los resultados para las tres vacunas se muestran de manera individual en las Tablas 20 a 22, respectivamente.

Tabla 20

Vacuna monovalente de toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A

Valoración de inhibición de hemólisis			
Cerdo Nro.	Día 0 (Prevac.)	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 geo.	12	49	60

Tabla 21

Vacuna de combinación de toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A con *E. coli* y toxoide *beta* de *C. perfringens* Tipo C

Valoración de inhibición de hemólisis			
Cerdo Nro.	Día 0 (Prevac.)	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 geo.	8	79	74

Tabla 22
E. coli y toxoide beta de *C. perfringens* Tipo C

Valoración de inhibición de hemólisis			
Cerdo Nro.	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 geo.	4	24	24

EJEMPLO 6
DETERMINACIÓN DE LA VALORACIÓN DE NEUTRALIZACIÓN DE TOXINA (TNT) EN SUERO REUNIDO DE CERDAS VACUNADAS

Se dividen cuatro cerdas preñadas en forma pareja 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 Vacuna Nro. 1 del Ejemplo 5 anterior. El otro grupo es el grupo de control, que no se vacuna. Las cerdas se vacunan aproximadamente 6 a 7 semanas antes de parir, y se administra una dosis de refuerzo tres semanas más tarde. Se toman muestras de sangre antes de la vacunación y en el momento antes de parir. La Tabla 23 expone la evaluación de las muestras de suero para la valoración de antitoxina para la toxina *alfa*, usando un ensayo de neutralización de toxina (TNT), como se describe en el Ejemplo 3 anterior.

Tabla 23
Valoración TNT

<u>Grupo de tratamiento</u>	<u>Cantidad de cerdas</u>	<u>Prevacunación (TNT)</u>	<u>Posvacunación de refuerzo (TNT)</u>
Vacunado	10614	<1	>4 <8
Vacunado	10616	<1	>4 <8
Control	10615	<2	<2
Control	10617	<1	<2

No debe limitarse el alcance de la presente invención a las realizaciones específicas descritas en esta solicitud. De hecho, serán evidentes para los expertos en la materia, a partir de la descripción precedente, varias modificaciones de la invención además de las aquí descritas. Dichas modificaciones tienen la intención de hallarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

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

En la presente solicitud se citan diversas publicaciones, cuyas descripciones se incorporan en la presente invención a modo de referencia, en su totalidad.

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una vacuna que comprende un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, un fragmento antigénico de un toxoide *alfa* de *C. perfringens*, un fragmento antigénico inactivo de una toxina *alfa* de *C. perfringens*, y cualquier combinación de los anteriores;

donde una a dos dosis de 0,25 a 0,6 ml cada una de la vacuna son suficientes para inducir por lo menos cuatro unidades de antitoxina (A. U.) de anticuerpo antitoxina *alfa*, por ml de antisuero de un pollo vacunado con la vacuna.

2. La vacuna de la reivindicación 1, donde el antígeno se encuentra en una preparación libre de células.

3. La vacuna de la reivindicación 1, donde el antígeno es un toxoide *alfa* en un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*.

4. La vacuna de la reivindicación 1, donde el antígeno es un polipéptido recombinante.

5. La vacuna de la reivindicación 1, donde dicho antígeno tiene 2 o más TCP.

6. La vacuna de la reivindicación 1, donde dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en un toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo A y un toxoide *alfa* de *C. perfringens* Tipo C.

7. La vacuna de la reivindicación 1, que además comprende un adyuvante.

8. La vacuna de la reivindicación 7, donde una emulsión de agua en aceite comprende el antígeno y adyuvante.

9. La vacuna de la reivindicación 8, donde la emulsión de agua en aceite se preparó con una fase oleosa al 70% y una fase acuosa al 30%.

10. La vacuna de la reivindicación 1, donde el antígeno es un toxoide *alfa* de Tipo *C. perfringens*; con la condición de que solo se presenta un toxoide *alfa* de Tipo *C. perfringens* único en dicha vacuna.

11. La vacuna de la reivindicación 10, donde dicho toxoide *alfa* está comprendido por un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*.

12. La vacuna de la reivindicación 1, que es una vacuna multivalente que además comprende una o más de las siguientes toxinas: 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 *theta* de *C. perfringens*, toxina *sordellii* de *C. hemorrágica*, 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*.

13. La vacuna de la reivindicación 12, donde la vacuna multivalente además comprende uno o más antígenos virales, uno o más antígenos bacterianos y uno o más antígenos parasitarios;

donde uno o más antígenos virales son de una o más de las siguientes fuentes: virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa, reovirus y virus de la enfermedad de Newcastle;

donde uno o más antígenos bacterianos son de una o más de las siguientes fuentes: *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*; y

donde los antígenos parasitarios son de *Eimeria*.

14. La vacuna de la reivindicación 1, que es una vacuna multivalente que además comprende uno o más antígenos adicionales;

donde los antígenos adicionales son de una o más de las siguiente fuentes: virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa, reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle; *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*; y *Eimeria*.

15. Una vacuna que consiste esencialmente en un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un toxoide *alfa* de Tipo *C. perfringens* único, un fragmento antigénico del toxoide *alfa*, un fragmento antigénico inactivo de una toxina *alfa* de *C. perfringens* de Tipo único; y cualquier combinación de los anteriores;

donde el toxoide *alfa* de Tipo *C. perfringens* único y el fragmento antigénico inactivo de la toxina *alfa* de Tipo *C. perfringens* único son del mismo Tipo; y

donde una a dos dosis de 0,25 a 0,6 ml cada una de la vacuna son suficientes para inducir por lo menos cuatro unidades de antitoxina (A. U.) de anticuerpo antitoxina *alfa*, por ml de antisuero de un pollo vacunado con la vacuna.

16. Un método para proporcionar la inmunidad pasiva contra múltiples enfermedades de aves de corral a la descendencia de un ave hembra, que comprende la administración de la vacuna de la reivindicación 13 a la hembra antes de poner los huevos que contienen la descendencia; donde se provee inmunidad pasiva contra múltiples enfermedades a la descendencia.

17. Un método para proporcionar la inmunidad pasiva contra una enfermedad clostridial a la descendencia de un ave hembra, donde dicho método comprende la administración de la vacuna de la reivindicación 1 a la hembra antes de poner los huevos que contienen la descendencia; donde se provee inmunidad pasiva a la descendencia.

18. El método de la reivindicación 17, donde el ave es un pollo o un pavo.
19. El método de la reivindicación 17, donde la enfermedad clostridial es una enfermedad intestinal clostridial.
20. El método de la reivindicación 19, donde la enfermedad intestinal clostridial es enteritis necrótica.
21. El método de la reivindicación 17, donde la enfermedad clostridial se selecciona del grupo que consiste en colangiohepatitis, dermatitis gangrenosa y celulitis.
22. Un método para la elaboración de una vacuna de toxoide *alfa* de *C. perfringens*, que comprende:
- (a) el cultivo de una célula de *C. perfringens* en un medio de cultivo, para producir una cantidad de células cultivadas; donde dicha cantidad de células cultivadas secreta una toxina *alfa* de *C. perfringens* en el medio celular;
 - (b) la inactivación de la toxina *alfa* secretada, para producir un toxoide *alfa* de *C. perfringens*;
 - (c) la eliminación de la mayoría de las células cultivadas del medio de cultivo, para formar un sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*; y
 - (d) el ajuste de la concentración del sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens*, de manera que es suficiente para inducir por lo menos cuatro unidades antitoxina (A. U.) de anticuerpo antitoxina *alfa*, por ml de antisuero de un ave que ha sido vacunada con una o dos dosis de 0,25 a 0,6 ml cada una de dicha vacuna.
23. El método de la reivindicación 22, que además comprende la mezcla del sobrenadante de toxoide *alfa* de *C. perfringens* con una emulsión de agua en aceite.

24. El método de la reivindicación 23, donde la emulsión de agua en aceite se prepara con una fase oleosa al 70% y una fase acuosa al 30%.

25. El método de la reivindicación 24, donde la célula de *C. perfringens* es una célula de *C. perfringens* de Tipo único.

26. El método de la reivindicación 25, donde dicha célula de *C. perfringens* de Tipo único se selecciona del grupo que consiste en una célula de *C. perfringens* Tipo A y una célula de *C. perfringens* Tipo C.

p.:SCHERING PLOUGH LTD.

RESUMEN

La presente invención describe vacunas que comprenden toxoides *alfa* de un Tipo *C. perfringens*, sus fragmentos antigénicos, fragmentos antigénicos inactivados de toxinas *alfa* de un Tipo de *C. perfringens*, o cualquiera de sus combinaciones. La presente invención además describe métodos para el uso de estas vacunas en la protección de animales contra enfermedades clostridiales. La presente invención describe también métodos para la elaboración de estas vacunas.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 October 2006 (26.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/113772 A1

- (51) International Patent Classification:
A61K 39/08 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2006/014669
- (22) International Filing Date: 17 April 2006 (17.04.2006)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/672,289 18 April 2005 (18.04.2005) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING-PLOUGH LTD. [CH/CH]; Weyrstrasse 20, P.O. Box, Ch-6000 Lucerne 6 (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): JAYAPPA, Huchappa [US/US]; 6323 South 104th Street, Omaha, Nebraska 68127 (US). O'CONNELL, Kevin [US/US]; 6207 South 159th Street, Omaha, Nebraska 68135 (US):
- (74) Agent: DAVIS, Michael, D.; Schering Corporation, 2000 Galloping Hill Road, Patent Department K-1-6 1990, Kenilworth, New Jersey 07033 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,

CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- Declarations under Rule 4.17:
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
 - as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

- Published:
- with international search report
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: C. PERFRINGENS ALPHA TOXOID VACCINE

(57) Abstract: The present invention describes vaccines that comprise C. perfringens Type alpha toxoids, antigenic fragments thereof, inactivated antigenic fragments of C. perfringens Type alpha toxins, or any combination thereof. The present invention further describes methods of using with these vaccines to protect animals against clostridial diseases. The present invention also describes methods of making these vaccines.

WO 2006/113772 A1

5

C. PERFRINGENS ALPHA TOXOID VACCINE

10

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is a non-provisional application that claims priority under 35 U.S.C. § 119(e) of provisional application U.S. Serial No. 60/672,289 filed April 18, 2005, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties.

15

FIELD OF THE INVENTION

20

The present invention relates to vaccines comprising *C. perfringens* Type *alpha* toxoids, antigenic fragments thereof, inactivated antigenic fragments of *alpha* toxins, and any combinations thereof. The present invention further relates to methods of using with these vaccines to protect animals against clostridial diseases. The present invention also relates to methods of making these vaccines.

BACKGROUND

25

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) is an anaerobic bacterium that is naturally found in soil, decaying organic matter, and as part of the normal gut flora of animals, including humans. *C. perfringens* is also the etiological agent for numerous clostridial diseases found in economically valuable domestic animals. *C. perfringens* produces a number of toxins that cause pathogenic effects in animals, including the *alpha* toxin, the *beta* toxin, the *beta* 2 toxin, the *epsilon* toxin, the *theta* toxin, the *mu* toxin, the *delta* toxin, the *iota* toxin, the *kappa* toxin, and the *lambda* toxin.

30

Moreover, *C. perfringens* encodes other biologically active substances that can cause pathological effects, including: hyaluronidase, acid phosphatase, protease, collagenase, sulfatase and neuraminidase.

35

Different strains of *C. perfringens* are designated as biotypes A through E, depending on the spectrum of toxins that the particular bacterium produces [Justin *et al.*, *Biochemistry* 41:6253-6262 (2002); McDonel,

5 *PHARMACOLOGY OF BACTERIAL TOXINS*; F Dorner and J Drews (eds.)
Pergamon Press, Oxford (1986)]. Initially, such typing was based on
serologic neutralization assays in mice or guinea pigs. More recently,
molecular typing methods employ polymerase chain reaction (PCR)
targeted to genetic sequences that encode one of the numerous toxins of
10 *C. perfringens*.

Intestinal clostridiosis in horses has been correlated with high
concentrations of *C. perfringens* Type A in the gut. Afflicted equine have a
profuse watery diarrhea and a high mortality rate. *C. perfringens* Type A
15 also has been linked to enteric disease in suckling and feeder pigs, with
the symptoms including mild necrotizing enteritis and villous atrophy
[Songer, *Clin. Micro. Rev*, 9(2):216-234 (1996)].

Clostridial diseases caused by *C. perfringens* are characterized by sudden
20 death in well-fleshed birds with confluent fibrinonecrotic lesions ("Turkish
towel") in the small intestine (enteric forms), and/or *C. perfringens*-
associated hepatitis with cholangiohepatitis, or fibrinoid necrosis in the
liver. Afflicted birds undergo a rapid course of depression, diarrhea, and
dehydration. Mortality ranges from 2% to 50%. Liver pathology leads to
25 carcass condemnations at slaughter.

Necrotic enteritis (NE) is an example of a clostridial enteric disease
caused by *C. perfringens* that leads to significant economic consequences
in poultry. The disease is especially common in floor-reared broiler
30 chickens from 2 to 10 weeks of age, though the disease also has been
reported in turkeys and caged laying hens. Necrotic enteritis generally
occurs in poultry either as a secondary disease, or in a situation in which
the normal intestinal microflora are altered so as to allow the abnormal
proliferation of pathogenic *C. perfringens*. The prevalence of subclinical
35 necrotic enteritis is unknown, since the lesions can only be observed
through post-mortem examination. However, reports of impaired feed

5 conversion and reduced body weights have been attributed to the
subclinical disease [Lovland and Kadhusdal, *Avian Path.* 30:73-81 (2001)].
Predisposing factors that lead to necrotic enteritis in both natural
outbreaks and experimental models include: (a) coccidiosis, (b) migration
of parasitic larvae, (c) feeds high in fish meal or wheat, and (d)
10 immunosuppressive diseases. In addition, necrotic enteritis can be
experimentally reproduced by: (i) providing animals feed contaminated by
C. perfringens, (ii) administering animals vegetative cultures orally or into
the crop, or (iii) intraduodenal administering of broth cultures of bacteria-
free crude toxins to the animals.

15 *C. perfringens* Types A or C are the two biotypes that cause necrotic
enteritis in poultry, with *alpha* toxin being the most common toxin detected
[Wages and Opengart, *Necrotic Enteritis*. pp: 781-785, In: *Disease of
Poultry*, 11th ed., (eds., Saif *et al.*), Iowa State Press, Ames, IA (2003)].
20 Indeed, greater than 90% of the *C. perfringens* isolates obtained from
forty-two Type A infected fowl produced a lethal *alpha* toxin, along with
sialidase, and the *theta* and *mu* toxins [Daube *et al.*, *AJVR* 54:496-501
(1996)]. In addition, enterotoxin produced by *C. perfringens* Type A has
been identified in chickens with necrotic enteritis and may play a role in the
25 intestinal disease [Niilo, *Can. J. Comp. Med.* 42:357-363 (1978)].

Recently, it has been reported that *C. perfringens* Type A or Type C can
encode the *cpb2* gene [Gilbert *et al.*, *Gene* 203:56-73 (1997)] and express
its product, the *beta* 2 toxin. A strong correlation between the expression
30 of *beta* 2 toxin and neonatal enteritis in swine has been observed
[Bueschel *et al.*, *Vet Micro* 94:121-129 (2003)]. The *beta* 2 toxin also has
been implicated as a pathogenic factor in enteritis of horses and cattle.
Bueschel *et al.*, *supra*, further reported that 37.2% of the three thousand
and twenty *C. perfringens* isolates that they obtained encoded the *beta* 2
35 toxin, and of the *C. perfringens* Type A isolates examined, 35.1% encoded
the *beta* 2 toxin. The limited sample (n=5) of avian *C. perfringens* Type A

5 field isolates were found to be $\approx 35\%$ positive for the *cpb2* genotype, and 40% of these also expressed the *beta* 2 toxin. In addition, employing PCR, Engstrom *et al.*, [*Vet Micro* 94:225-235 (2003)] found that 12% of the *C. perfringens* isolates from chickens with hepatitis also were positive for *cpb2*. The enterotoxin of *C. perfringens* Type A has also been shown to
10 be pathogenic in chickens, causing accumulation of fluid in a ligated intestinal loop model [Niilo, *Appl. Micro.* 28:889-891 (1974)].

Current efforts to control *C. perfringens* rely upon sanitary measures and placing antibiotics in the animal feed. The clostridial component of the
15 disease responds well to antibiotics and is generally suppressed by antibiotic feed additives and ionophorous, anticoccidial drugs. However, antibiotics are costly and subject to increasing concerns related to the promotion of bacterial resistance.

20 Vaccination also has become an important control measure in domestic animals, since the course of many *C. perfringens*-associated diseases is rapid and often fatal. For example, U.S. Patent No. 4,292,307 defines one "universal" multivalent vaccine prepared from toxoids of *C. perfringens* Type A, Type B, and Type D that further includes toxoids from *Cl. oedematiens*, and *Cl. septicum* toxoid. In addition, vaccines are
25 commercially available that are often multivalent and consist of inactivated cells, toxins, or combinations of these two [see, Songer, *Clin. Micro. Rev.* 9(2):216-234 (1996)].

30 Vaccination of female livestock may also elicit passive protection of their subsequently born offspring. Passive protection of mammalian neonates against pathologic *Clostridial* infections relies upon the transfer of specific antibody in the form of colostral antibodies. For example, Smith and Matsuoka [*Am. J. Vet. Res.* 20:91-93 (1959)] employed an inactivated
35 vaccine to inoculate pregnant sheep and reported maternally induced protection of young lambs against the *epsilon* toxin of *C. perfringens*.

5 Passive immunity in young mammals typically lasts 2 to 3 weeks [Songer, *Clin. Micro. Rev*, 9(2):216-234 (1996)].

In contrast to suckling mammals, passive immunity in avians has several obvious shortcomings, most notably, the complete lack of the maternal antibodies obtained from milk. Though passive immunity is just one possible explanation for their observed correlation, Heier *et al.*, [Avian Diseases 45:724-732 (2001)] did report that the survival of chicks was significantly higher in Norwegian Broiler flocks having higher titers of specific, naturally occurring maternal antibodies against *C. perfringens* *alpha* toxin than those flocks having low titers. In addition, Lovland *et al.* [Avian Pathology 33(1):83-92 (2004)] reported results that were consistent with modest passive protection of the progeny of hens that had been inoculated with vaccines based on *C. perfringens* Type A or Type C toxoids, as compared to the progeny of unvaccinated hens.

20 Heretofore, commercially significant protection from *C. perfringens* did not appear be attainable unless maternal antibodies for most, if not all of the pathologic components produced by *C. perfringens* bacteria were present in the inoculum. For example, vaccination of the dam with a product that does not contain enterotoxin only offers partial protection to piglets, and anti-*epsilon* toxin antibody in mother goats protects against death from toxemia, but not against enterocolitis [Songer, *Clin. Micro. Rev*, 9(2):216-234 (1996)].

30 Indeed, despite the tabulation of an impressive quantity of data regarding the various biotypes of *C. perfringens* and their corresponding toxins and deleterious bioactive substances, clostridial diseases in food producing animals remain a significant economic problem for farmers. Therefore, there is a need to provide additional means for protecting livestock against the pathological effects of *C. perfringens*. More particularly, there remains a need to provide a safe and effective vaccine against *C. perfringens* in

5 poultry. Moreover, there is a need to provide a simple vaccine against *C. perfringens* that can be administered to female animals, especially fertile and/or pregnant female livestock, that will passively protect their offspring.

10 The citation of any reference herein should not be construed as an admission that such reference is available as "prior art" to the instant application.

SUMMARY OF THE INVENTION

15 The present invention provides vaccines against *C. perfringens* that comprise a *C. perfringens* *alpha* toxoid, and/or an antigenic fragment of a *C. perfringens* *alpha* toxoid, and/or an inactive antigenic fragment of a *C. perfringens* *alpha* toxin, and/or any combination thereof as an antigen.

20 The present invention further provides vaccines that consist essentially of a single *C. perfringens* Type *alpha* toxoid, and/or an antigenic fragment of a *C. perfringens* *alpha* toxoid, and/or an inactive antigenic fragment of a *C. perfringens* *alpha* toxin, and/or any combination thereof as an antigen.

25 Preferably, one to two doses of 0.25 - 0.6 mL per dose of a vaccine of the present invention is sufficient to induce at least four antitoxin units (A.U.) of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera of an animal (e.g., a chicken) vaccinated with the vaccine. In one embodiment of this type, the determination of antitoxin units (A.U.) of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera of an animal vaccinated with the vaccine is performed six to seven weeks following the immunization. In a particular embodiment, a
30 single dose of the vaccine is sufficient to induce at least 4 antitoxin units (A.U.) of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera of the vaccinated animal, whereas, in an alternative embodiment, two doses of the vaccine are necessary. In a one embodiment the antigen has 2 or more Total Combining Power units (TCP).

35

5 In one such embodiment the animal is an avian. In a particular embodiment, the avian is a chicken. In another embodiment, the avian is a turkey.

10 In one embodiment, the antigen originated from a *C. perfringens* Type A cell, e.g., a *C. perfringens* Type A *alpha* toxoid. In another embodiment the antigen originated from a *C. perfringens* Type C cell, e.g., an inactive antigenic fragment of a *C. perfringens* Type C *alpha* toxin. In yet another embodiment the antigen originated from *C. perfringens* Type B. In still another embodiment the antigen originated from *C. perfringens* Type D. In
15 yet another embodiment, the antigen originated from *C. perfringens* Type E. In still another embodiment, the vaccine comprises an antigen originating from a *C. perfringens* sub-type.

20 In one embodiment, a vaccine of the present invention comprises an antigen that is a single *C. perfringens* Type antigen, with the proviso that only a single *C. perfringens* Type antigen is present in that vaccine. In one particular embodiment of this type, the *C. perfringens* is Type A. In a related embodiment, the *C. perfringens* is Type C. In one embodiment the antigen is an *alpha* toxoid. In a particular embodiment of this type, the
25 *alpha* toxoid is comprised by a *C. perfringens alpha* toxoid supernatant. In a specific embodiment, the vaccine comprises an *alpha* toxoid supernatant of a single *C. perfringens* Type, Type A.

30 In one vaccine of the present invention, the antigen is an *alpha* toxoid of an *alpha* toxin naturally encoded by a *C. perfringens* cell. In another vaccine of the present invention, the antigen is a recombinant polypeptide, i.e., one that is encoded by a gene that had been genetically manipulated. In an embodiment of this type, the recombinant polypeptide is an *alpha* toxoid in which enzymatic regions of the corresponding *alpha* toxin had
35 been genetically removed or altered, but, one or more antigenic epitopes had been retained.

5 In a particular embodiment the antigen is in a whole cell preparation. In another embodiment, the antigen is in a cell-free preparation. In yet another embodiment, the antigen is an *alpha* toxoid in a *C. perfringens alpha* toxoid supernatant. In a particular embodiment of this type, the *C. perfringens alpha* toxoid supernatant also is a cell-free preparation.

10

In another aspect of the present invention, a vaccine may also contain multiple antigens which may result in the production of antibodies of a variety of specificities when administered to an animal subject. Not all of these antibodies need to be protective against a disease. In a particular
15 embodiment of this type, such antigens are also from *C. perfringens*. Thus, a vaccine of the present invention may contain various other active or inactivated pathogenic factors, along with an *alpha* toxoid. Therefore, in accordance with the present invention, the *alpha* toxoid can be combined with other clostridial and non-clostridial cells, toxoids, and extracts, as well
20 as inactive antigenic fragments of *alpha* toxin.

One such multivalent vaccine of the present invention comprises a *C. perfringens alpha* toxoid, and/or an antigenic fragment of a *C. perfringens alpha* toxoid, and/or an inactive antigenic fragment of a *C. perfringens alpha* toxin, and/or any combination thereof, and further comprises a viral
25 antigen and/or a bacterial antigen and/or a parasite antigen. In a particular embodiment of this type the viral source of the antigen is infectious bursal disease virus. In another embodiment, the viral source of the antigen is infectious bronchitis virus. In yet another embodiment, the viral source of the antigen is reovirus. In still another embodiment, the viral source of the antigen is Newcastle disease virus. In yet another embodiment, the
30 bacterial source of the antigen is *E. coli*. In still another embodiment, the bacterial source of the antigen is *Salmonella*. In yet another embodiment, the bacterial source of the antigen is *Campylobacter*. In still another
35 embodiment the parasitic source of the antigen is from *Eimeria*. In a particular embodiment of this type, the antigen employed in the vaccine is

5 a part of an *Eimeria* merozoite, an *Eimeria* oocyst, or a mixture thereof. In a related embodiment the natural host of the parasite is an avian. In a particular embodiment of this type the parasite is *Eimeria* and the natural host of the parasite is a chicken.

10 A multivalent vaccine of the present invention can also comprise one or more of the following antigens: *C. perfringens* beta toxin, *C. perfringens* beta 2 toxin, *C. perfringens* enterotoxin, *C. perfringens* epsilon toxin, *C. perfringens* iota toxin, *C. perfringens* kappa toxin, *C. perfringens* lambda toxin, *C. perfringens* theta toxin, *C. sordellii* hemorrhagic toxin, *C. sordellii*
15 lethal toxin, *C. difficile* A toxin, *C. difficile* B toxin, *C. septicum* alpha toxin, *C. novyi* alpha toxin, and *C. novyi* beta toxin.

In a particular multivalent vaccine of the present invention, the vaccine comprises a *C. perfringens* alpha toxoid, and/or an antigenic fragment of a
20 *C. perfringens* alpha toxoid, and/or an inactive antigenic fragment of a *C. perfringens* alpha toxin, and/or any combination thereof, and further comprises one or more viral antigens from infectious bursal disease virus, and/or infectious bronchitis virus and/or reovirus, and/or Newcastle disease virus, and/or bacterial antigens from *E. coli*, and/or *Salmonella*,
25 and/or *Campylobacter*, and/or a parasitic antigen from *Eimeria*.

In an alternative embodiment, a multivalent vaccine of the present invention consists essentially of a single *C. perfringens* Type alpha toxoid, and/or an antigenic fragment of a *C. perfringens* alpha toxoid, and/or an
30 inactive antigenic fragment of a *C. perfringens* alpha toxin, and/or any combination thereof. In a related embodiment, the vaccine further contains a viral antigen and/or a bacterial antigen and/or a parasitic antigen, as provided herein.

35 A vaccine of the present invention can also comprise an adjuvant. One popular animal adjuvant is an aluminum hydroxide adjuvant. An

5 alternative adjuvant can be comprised in a water-in-oil emulsion along with the antigen. In a particular vaccine of this type, the water-in-oil emulsion is prepared with a 70% oil phase and a 30% aqueous phase. In another embodiment, the adjuvant is specifically not an aluminum hydroxide adjuvant. In one such embodiment, the vaccine including a non-aluminum
10 hydroxide adjuvant is administered to poultry. In a particular embodiment, a vaccine comprises a *C. perfringens alpha* toxoid, an adjuvant, and one or more protective antigens, either recombinant or natural, obtained from a virus, bacterium, and/or a bacterial extract.

15 In another aspect, the present invention provides methods of providing active immunity to an avian by immunizing an avian with a vaccine of the present invention. In a particular embodiment the vaccine dosage for such active immunity is about 0.05 to about 0.1 mL. In one embodiment the avian is a turkey. In another embodiment the avian is a chicken. In still
20 another embodiment the avian is a pheasant. The present invention also provides a method of administering a multivalent vaccine of the present invention to an avian to protect it against multiple diseases.

The present invention also provides methods of providing passive
25 immunity to the progeny of a female animal (e.g., a pregnant female) comprising administering a vaccine of the present invention to the female animal (e.g., mother) prior to the birth of her progeny. In one embodiment, the female is an avian and the vaccine is administered to the avian female prior to her laying of the eggs that comprise the progeny. In this manner
30 her progeny are provided passive immunity. In one such embodiment, the avian is a chicken. In another embodiment, the avian is a turkey. In still another embodiment, the avian is a pheasant.

In a particular embodiment, the method provides passive immunity against
35 a clostridial disease to the progeny of the vaccinated animal. In one such method the clostridial disease is a clostridial enteric disease. In a

5 particular method of this type, the clostridial enteric disease is necrotic enteritis. In another such method the clostridial disease is cholangiohepatitis. In still another embodiment the method provides passive immunity against a clostridial disease to the progeny of the vaccinated animal as well as provides protection against gangrenous
10 dermatitis, septicum, and/or hepatitis.

In one embodiment, the method of providing passive immunity to the progeny of a female animal comprises administering a multivalent vaccine to the female animal to protect her progeny against multiple diseases. In a
15 particular embodiment of this type, the female animal is in the poultry family and her progeny are protected from multiple poultry diseases.

In a particular embodiment the dosage for providing passive immunity to the progeny of a female animal is about 0.25 mL per dose of the vaccine.
20 In another embodiment the dosage is about 0.4 mL per dose of the vaccine. In still another embodiment the dosage is about 0.6 mL per dose of the vaccine. In an embodiment exemplified below, the dosage is about 0.5 mL per dose of the vaccine.

25 The present invention further provides a process for making a *C. perfringens alpha* toxoid vaccine of the present invention. One such method comprises growing a *C. perfringens* cell in a culture medium to produce a quantity of cultured cells that secrete a *C. perfringens alpha* toxin into the cell medium. The *C. perfringens alpha* toxoid is then
30 produced by inactivating the secreted *alpha* toxin. A majority of the cultured cells are removed from the culture medium to form a *C. perfringens alpha* toxoid supernatant. In a particular embodiment of the method, the concentration of the *C. perfringens alpha* toxoid supernatant is adjusted so that it is sufficient to induce at least four antitoxin units
35 (A.U.) of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera of an animal (e.g., a chicken) that has been vaccinated with either one or two doses of 0.25 –

00101

5 0.6 mL per dose of said vaccine. In one such embodiment, the concentration process includes diafiltration against a buffered solution in order to remove low molecular weight contaminants.

10 The process for making a *C. perfringens alpha* toxoid vaccine of the present invention can further comprise mixing the *C. perfringens alpha* toxoid supernatant with an adjuvant. In one such embodiment, the *C. perfringens alpha* toxoid supernatant is mixed in a water-in-oil emulsion. In a particular embodiment of this type, the water-in-oil emulsion is prepared with 70% oil phase and 30% aqueous phase.

15 The *C. perfringens* cells employed in the process can be from a single *C. perfringens* Type cell. In a particular embodiment of this type, the single *C. perfringens* Type cell is a *C. perfringens* Type A cell. In an alternative embodiment, the single *C. perfringens* Type cell is a *C. perfringens* Type C
20 cell.

 These and other aspects of the present invention will be better appreciated by reference to the following Detailed Description.

25 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

 The present invention provides unique vaccines against *C. perfringens* that are both safe and effective for the prevention of clostridial diseases in animals. In a particular embodiment, the administration of a vaccine of the
30 present invention to a female animal subject results in both the immunization of the female animal, and the development of antibodies that can be passively transferred to her subsequently born progeny. In one embodiment the present invention provides a vaccine that comprises a specific, minimum amount of an *alpha* toxoid of a single *C. perfringens*
35 Type that is effective against harmful *C. perfringens* infections. In a particular embodiment, the vaccine comprises a safe and immunologically

5 effective combination of an *alpha* toxoid of the present invention and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

The vaccines of the present invention can be used to protect against any condition or disease in which *C. perfringens* plays a role. Such diseases
10 include clostridial diseases. In one embodiment of this type, the clostridial disease is a clostridial enteric disease. Therefore, in a particular embodiment, the present invention provides vaccines that are effective for the prevention of the clostridial enteric disease in poultry known as necrotic enteritis. Other disease syndromes also may be prevented by the
15 vaccines of the present invention and include, but are not limited to, clostridia-related hepatitis, cholangeohepatitis, and grangrenous dermatitis.

The present invention discloses that a vaccine comprising a specific
20 minimal amount of *alpha* toxoid (*i.e.*, having a specific minimal TCP) obtained from a single *C. perfringens* Type, protects the progeny of the vaccinated female animal subject from clostridial diseases such as necrotic enteritis, regardless of whether any additional lethal toxins are expressed by a challenge *C. perfringens*. The present invention further
25 discloses a vaccine that elicits a specific minimal anti-*alpha* toxin response from the vaccinated female animal, which also protects the progeny of that vaccinated female animal subject from clostridial diseases, regardless of whether any additional lethal toxins are expressed by a naturally occurring *C. perfringens*. The vaccines of the present invention also may be
30 administered with an acceptable adjuvant.

As exemplified below, vaccinating hens with a vaccine derived from an inactivated *C. perfringens* Type A isolate that expresses an *alpha* toxin, but not a corresponding *beta* 2 toxin, unexpectedly, led to the passive
35 immunization of the three week-old progeny chicks against a challenge from a *C. perfringens* strain that expressed both the *alpha* toxin and the

5 *beta* 2 toxin. Heretofore, there had been no evidence for such cross-
protection against these two distinct toxins. Therefore, the present
invention provides relatively simple vaccines that are capable of
stimulating a specific minimum amount of anti-*alpha* toxins and thereby,
protect against clostridial diseases, e.g., necrotic enteritis, regardless of
10 what other toxins the *C. perfringens* challenge strain may express.

Indeed, in spite of the multitude of toxins and other biologically active
proteins produced by *C. perfringens* that have been shown to have
pathogenic effects on animals, and the multiple citations in the literature on
15 the contributions of these various toxins and other proteins to the
pathology of necrotic enteritis, the unique vaccines disclosed herein
provide both a substantial immune response to *C. perfringens* in
vaccinated broiler hens, and passive immunity to their subsequently born
offspring.

20 Although the present invention is completely independent of any theory or
model, the results provided herein are consistent with the *C. perfringens*
alpha toxin being the antigenic component that is both necessary and
sufficient for protection against necrotic enteritis. While the *beta*, *beta* 2
25 and enterotoxins may be critical to the pathology of necrotic enteritis, the
results provided herein are consistent with the *alpha* toxoid being the only
toxoid necessary in a vaccine for necrotic enteritis. In addition, since
alpha toxin production is generally the highest in Type A strains, *C.*
perfringens Type A strains are particularly useful as a source of *C.*
30 *perfringens alpha* toxin. However, other *C. perfringens* Types also can be
successfully used, especially when genetic modification has been used to
increase the level of *alpha* toxin production in these other Types.

As used herein the following terms shall have the definitions set out below:
35 As used herein a "protective antigen" is an antigen that results in the
production of specific antibodies that impart protection against infection
and/or disease to the animal vaccinated with that antigen and/or her

5 progeny. A vaccine which contains such a protective antigen is termed "immunologically effective".

As used herein the term "antigenic fragment" in regard to a particular protein is a fragment of that protein that is antigenic. For example, an
10 antigenic fragment of an *alpha* toxin or an *alpha* toxoid is a fragment of the *alpha* toxin or *alpha* toxoid that is antigenic. As used herein, an antigenic fragment of an *alpha* toxin or an *alpha* toxoid can be any fragment of the *alpha* toxin or *alpha* toxoid, respectively, including large fragments that are missing as little as a single amino acid from the full-length protein. In a
15 particular embodiment an antigenic fragment of an *alpha* toxin or *alpha* toxoid contains between 6 and 120 amino acid residues. In addition, an antigenic fragment of a given *alpha* toxin can be obtained by a recombinant source, from a protein isolated from natural sources, or through chemical synthesis. Moreover, an antigenic fragment can be
20 obtained following the proteolytic digestion of an *alpha* toxin, *alpha* toxoid, or a fragment thereof, through recombinant expression, or alternatively, it can be generated *de novo*, e.g., through peptide synthesis.

As used herein an "inactive antigenic fragment" of a *C. perfringens alpha*
25 toxin is an antigenic fragment of a *C. perfringens alpha* toxin that retains at least one antigenic epitope, but does not possess sufficient catalytic activities of the *alpha* toxin to make it deleterious. Such inactive antigenic fragments may be used alone, or alternatively, can be incorporated into fusion proteins.

30 As used herein, the term "*alpha* toxoid" refers to any inactive *alpha* toxin, (e.g., an inactive full-length *alpha* toxin) but is not meant to limit in any way the particular means of inactivating an *alpha* toxin to produce that *alpha* toxoid. Such inactivating methodology includes: (i) chemical methods that
35 modify the intact protein, e.g., formaldehyde or glutaraldehyde treatment; (ii) physical methods, such as heating; (iii) enzymatic methods that alter the protein, such as a protease that cleaves the toxin into fragments; (iv)

000000

5 recombinant methods, such as genetic engineering of the *alpha* toxin gene to remove or alter enzymatic regions of the protein, but retaining one or more antigenic epitopes (see e.g., US 5,817,317, the contents of which is hereby incorporated by reference in its entirety); and/or combinations of any or all of the above.

10

As used herein a *C. perfringens* "alpha toxoid supernatant" is a solution comprising inactivated *C. perfringens* alpha toxin, in which at least a majority of the cells that produced the toxin have been removed (i.e., greater than 70% of the cells being removed, and in a particular
15 embodiment, greater than 90% of the cells being removed). In a particular embodiment, the inactivated *C. perfringens* alpha toxin had been secreted into the culture media by *C. perfringens* cells that had been added to and/or cultured/grown in that culture media, and then inactivated. In another embodiment, the inactivated *C. perfringens* alpha toxin includes the *C.*
20 *perfringens* alpha toxin associated with the cells, which had been liberated through cell lysis, and then inactivated. The means of preparing the "alpha toxoid supernatant" is in no way meant to be limited to any particular method of removing the cells or cell debris from the solution, and includes centrifugation, column chromatography, ultrafiltration, etc.

25

As used herein a "cell-free" solution is one in which greater than 90% of the cells from a culture have been removed. The means of preparing the "cell-free" solution is in no way meant to be limited to any particular method of removing the cells or cell debris from the solution, and includes
30 centrifugation, column chromatography, ultrafiltration, etc.

As used herein the term "single *C. perfringens* Type" refers to one *C. perfringens* Type, e.g., Type A or Type B or Type C etc., as opposed to multiple Types, e.g., Type A and Type B and Type C. Therefore, a cell,
35 supernatant, composition, preparation, vaccine, etc. comprising an alpha toxoid of a "single *C. perfringens* Type" is a cell, supernatant, composition, preparation, vaccine, etc. that contains alpha toxoid from only that one

5 specific *C. perfringens* Type and does not contain *alpha* toxoid from any other *C. perfringens* Type. On the other hand, such cells, supernatants, compositions, preparations, vaccines, etc. may contain other non-*alpha* toxoid components, including other *C. perfringens* toxoids, and/or adjuvants, and/or immune stimulants, etc.

10

As used herein an "antitoxin unit" or "A.U." of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera is used interchangeably with "anti-*alpha* Toxin Neutralizing Test" units or "TNT" units and is defined by the ability of sera to neutralize the toxic effects of *alpha* toxin in a mouse bioassay. In this test, a known amount of *alpha* toxin established by international standards [EU
15 Pharmacopoeia 5.0.: 01/2005:0088, pp. 803-804] is mixed with serial dilutions of sera from vaccinated animals. The mixture is incubated one hour at room temperature and then injected intravenously into mice. The mice will survive if the toxin is completely neutralized by the sera,
20 otherwise they die. The antitoxin units or titer is determined as the reciprocal of the highest dilution of sera that neutralized the toxin.

As used herein the term "Total Combining Power" is abbreviated by "TCP" and is defined as described by Batty [*Toxin-Antitoxin Assay, Methods in*
25 *Microbiology*, Chapter 8, Volume 5A (1971), ed. JR Norris and DW Ribbons]. In this assay, a specific volume of the *alpha* toxoid supernatant is contacted with a known quantity of antitoxin units. After providing a suitable incubation period to allow the antitoxin and *alpha* toxoid to bind, e.g., one hour at room temperature, a known quantity of the *alpha* toxin is
30 added. The remaining free antitoxin then is given a suitable period to bind with the *alpha* toxin, e.g., one hour at room temperature. The amount of free *alpha* toxin is then determined by adding a substrate to the solution to measure the enzymatic activity of the *alpha* toxin. Suitable substrates include red blood cells (particularly sheep red blood cells) and lecithin.
35 The *alpha* toxoid can then be quantified through a calculation based upon the amount of enzymatic activity determined. The greater the amount of

5 *alpha* toxoid present in the assay solution, the higher the amount of enzymatic activity measured in the assay.

10 The terms "Type" and "biotype" are used interchangeably herein, and refer to the particular phenotype of a *C. perfringens* based on expression of various toxin genes. *Clostridium perfringens* is divided into types based on production of the four major toxins, *alpha*, *beta*, *epsilon* and *iota*. *C. perfringens* Type A produces *alpha* toxin; Type B produces *alpha*, *beta* and *epsilon* toxins; Type C produces *alpha* and *beta* toxins, Type D produces *alpha* and *epsilon* toxins, Type E produces *alpha* and *iota* toxins.

15 As many as 17 exotoxins of *C. perfringens* have been described. A biotype of *C. perfringens* is a classification based on production of some or all of the additional clostridial toxins and/or enzymes. For examples an enterotoxigenic pathotype of *C. perfringens* Type A may produce *theta* and *mu* toxins in addition to the *alpha* toxin.

20 As used herein, a multivalent vaccine is a vaccine that comprises two or more different antigens. In a particular embodiment of this type, the multivalent vaccine stimulates the immune system of the recipient against two or more different pathogens.

25 The terms "adjuvant" and "immune stimulant" are used interchangeably herein, and are defined as one or more substances that cause stimulation of the immune system. In this context, an adjuvant is used to enhance an immune response to one or more vaccine antigens. An adjuvant may be administered to the target animal before, in combination with, or after the administration of the vaccine. Adjuvants of the present invention may be obtained from any of a number of sources including from natural sources, recombinant sources, and/or be chemically synthesized, etc. Examples of chemical compounds used as adjuvants include, but are not limited to

30 aluminum compounds, metabolizable and non-metabolizable oils, block polymers, ISCOM's (immune stimulating complexes), vitamins and

35 minerals (including but not limited to: vitamin E, vitamin A, selenium, and

5 vitamin B12), Quil A (saponins), and CARBOPOL®. Additional examples of adjuvants, that sometimes have been referred to specifically as immune stimulants, include, bacterial and fungal cell wall components (e.g., lipopolysaccharides, lipoproteins, glycoproteins, muramylpeptides, *beta*-1,3/1,6-glucans), various complex carbohydrates derived from plants (e.g.,
10 glycans, acemannan), various proteins and peptides derived from animals (e.g., hormones, cytokines, co-stimulatory factors), and novel nucleic acids derived from viruses and other sources (e.g., double stranded RNA, CpG). In addition, any number of combinations of the aforementioned substances may provide an adjuvant effect, and therefore, can form an adjuvant of the
15 present invention.

As used herein an "anti-*alpha* toxin" is an antibody (monoclonal or polyclonal) that binds to *alpha* toxin. Antibodies to an *alpha* toxin can be measured by a TNT assay as described above. Alternatively, antibodies
20 can be detected by their ability to block the hemolytic effect of the *alpha* toxin. In a hemolysis inhibition assay, a known quantity of *alpha* toxin, sufficient to catalyze complete lysis of a given preparation of sheep red blood cells, is mixed with serial dilutions of sera and incubated for one hour at 36 ± 2 °C. The mixture is then incubated with 0.5% sheep red
25 blood cells for three hours at 36 ± 2 °C. When antibody binds to the *alpha* toxin, the toxin is unable to hemolyze the red blood cells. The titer is determined by the reciprocal of the highest dilution of sera that results in no hemolysis. In a similar assay, the ability of antibodies bound to *alpha* toxin to inhibit phospholipase activity can be measured by determining the
30 highest dilution of antisera that blocks the enzymatic cleavage of lecithin.

As used herein the term "polypeptide" is used interchangeably with the term "protein" and is further meant to encompass peptides. Therefore, as used herein, a polypeptide is a polymer of two or more amino acids joined
35 together by peptide linkages. Polypeptides of the present invention include naturally occurring proteins; recombinant proteins; chemically synthesized proteins; fragments of any of the naturally occurring,

5 recombinant, or chemically synthesized proteins; and fusion proteins that
comprise any of the naturally occurring, recombinant, and/or chemically
synthesized proteins, and/or any of their fragments. Preferably, the term
polypeptide is used to denote a polymer comprising twenty or more amino
10 peptide is used to denote a polymer comprising two to twenty amino acid
residues joined together by peptide linkages.

A "heterologous nucleotide sequence" as used herein is a nucleotide
sequence that is added by recombinant methods to a nucleotide sequence
15 encoding a protein of the present invention, *e.g.*, an *alpha* toxin of the
present invention, or encoding a fragment thereof (*e.g.*, an inactive
antigenic fragment), to form a nucleic acid that is not naturally formed in
nature. Such nucleic acids can encode fusion proteins. In addition, as
used herein, a heterologous nucleotide sequence need not be a single
20 contiguous nucleotide sequence, but can include multiple non-contiguous
nucleotide sequences that have been combined with a nucleotide
sequence encoding a polypeptide of the present invention, or a portion
thereof. A heterologous nucleotide sequence can comprise non-coding
sequences including restriction sites, regulatory sites, promoters and the
25 like. In still another embodiment the heterologous nucleotide can function
as a means of detecting a nucleotide sequence of the present invention.
The present invention provides heterologous nucleotide sequences that
when combined with nucleotide sequences encoding a polypeptide of the
invention or a fragment thereof, are necessary and sufficient to encode all
30 of the fusion proteins of the present invention.

As used herein a vaccine "consisting essentially of" or that "consists
essentially of" a single *C. perfringens* Type *alpha* toxoid, and/or antigenic
fragment of the *C. perfringens alpha* toxoid, and/or inactive antigenic
35 fragment of the corresponding *alpha* toxin is a vaccine that contains an
immunologically effective amount of the single *C. perfringens* Type *alpha*
toxoid, and/or antigenic fragment of the *C. perfringens alpha* toxoid, and/or

5 inactive antigenic fragment of the corresponding *alpha* toxin, to protect against a clostridial disease, but does not contain an immunologically effective amount of any other antigen known to protect against a clostridial disease such as another *C. perfringens* antigen, or an alternative *C. perfringens* Type *alpha* toxin, *alphatoxoid*, or fragment thereof. Such
10 vaccines may further include antigens related to other diseases such as viral antigens from infectious bursal disease virus, reovirus, and Newcastle disease virus; bacterial antigens from *E. coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter*, and a parasite antigens such as one from *Eimeria*.

15 As used herein the term "about" when used in conjunction with a particular dosage value signifies that the dosage value is within twenty percent of the indicated value, e.g., a dosage of about 0.5 mL can comprise between 0.4 mL and 0.6 mL.

20 Isolation of *C. Perfringens* Type A

C. perfringens isolates, such as *C. perfringens* type A, can be obtained from fecal samples and/or intestinal scrapings of infected animals. The samples/scraping can be streaked on blood agar plates, incubated anaerobically at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24-48 hours, and colonies that resemble *C. perfringens* type A are individually picked. To confirm their identity as *C. perfringens* type A isolate(s), the selected colonies can be further tested for characteristic *C. perfringens* type A biochemical properties, including genetic makeup.

30 The presence of the *alpha* toxin gene in the isolate can be determined by genetic analysis, e.g., by PCR. The expression of *alpha* toxin can be shown by its lecithinase activity in an assay using egg yolk and/or by a hemolysis assay employing sheep red blood cells. In a particular embodiment, *C. perfringens* isolates that express a high level of *alpha* toxin are used in the preparation of a vaccine of the present invention. A
35 selected *C. perfringens* isolate(s) can be grown anaerobically in nutrient

- 5 broth for 4-24 hours. The culture can be inactivated with, e.g., formalin, concentrated and blended into such a vaccine.

C. Perfringens Toxins

- 10 *Alpha* toxin – *Alpha* toxin is produced by all types of *C. perfringens*. *Alpha* toxin is a multifunctional phospholipase C that can split lecithin, forming phosphorylcholine and a diglyceride. When administered intravenously, *alpha* toxin has been shown to be lethal to mice. *Alpha* toxin is also markedly hemolytic. However, the susceptibility of red blood cells can
15 vary greatly depending on the species of animal used as the source of the red blood cells. *Alpha* toxin also brings about the aggregation of platelets, the lysis of platelets, leukocytes, and other body cells, as well as causing an increase in vascular permeability.

- 20 *Beta* toxin – *Beta* toxin is produced by *C. perfringens* Types B and C. The *beta* toxin is responsible for the inflammation of the intestine and the wholesale loss of mucosa, as well as the inhibition of intestinal movement. The *beta* toxin is a protein having a molecular weight of 35 kDa and is much more susceptible to proteolytic enzymes such as trypsin, than the
25 other *C. perfringens* toxins. *Beta* toxin has been reported to be lethal to animals, with mice being the most sensitive and chickens being the least sensitive.

- 30 *Beta 2* toxin – The *beta 2* toxin is the most recently discovered of the *C. perfringens* toxins. Despite their similar names, the amino acid sequences of the *beta 2* toxin and the *beta* toxin show no homology. The literature has shown a strong association between *beta 2* toxin and necrotic enteritis in certain animals [Garmory *et al.*, *Epidemiol. Infect.* 124:61-67 (2000), Herholz *et al.*, *J. Clin. Morco*, Feb:358-361 (1999)]. The *beta 2* toxin has a
35 molecular weight of 28 kDa. *Beta 2* toxin has been found to be lethal to mice and cytotoxic to certain cell lines, inducing rounding of the cells and lysis without affecting the actin cytoskeleton [Manteca *et al.*, *Vet. Microb.*

- 5 86:191-202 (2002), Schotte *et al.*, *J. Vet Med B* 51:423-416 (2004),
Gilbert *et al.*, *Gene* 203:65-73 (1997)].

Enterotoxin – Enterotoxin is typically produced by *C. perfringens* Type A strains. The presence of the enterotoxin has been traditionally used to
10 delineate enteric disease associated strains from those which are associated with tissue gas gangrene. Strains which cause gas gangrene do not typically have enterotoxin. The enterotoxin is a heat sensitive protein that has a molecular weight of 34 kDa. The lethal dose for mice is about 10 micrograms. The initial interaction of the enterotoxin is to form
15 pores in the host cell, followed by altered permeability of the cell, inhibition of macromolecular synthesis, cytoskeletal disintegration, and finally, lysis [see, Songer, *Clin. Micro. Rev*, 9(2):216-234 (1996)]. Enterotoxin effectuates the reversal of net transport in the cells of the intestines.

20 *Epsilon* toxin – *Epsilon* toxin is produced by *C. perfringens* Types B and D. *Epsilon* toxin is secreted as a protoxin that is converted by endogenous trypsin into an extremely potent neurotoxin. When administered intravenously, *Epsilon* toxin can be extremely lethal to mice. *Epsilon* toxin has a high affinity for neural tissue and has the effect of causing vascular
25 permeability. *Epsilon* toxin also causes permeability of the gut wall allowing large molecules, including itself, to enter the bloodstream. The *epsilon* toxin then progresses through the bloodstream to the brain where it disrupts the osmotic balance. This disruption of osmotic balance in the brain results in the neurological signs observed prior to the death of the
30 afflicted animal.

Kappa toxin – *Kappa* toxin is a collagen-hydrolyzing enzyme produced by *C. perfringens* Types A, D, E, and some Types of B and C. *Kappa* toxin has a molecular weight of 80 kDa and is lethal to mice. Intravenous
35 injection of *kappa* toxin to a mouse produces death within one hour due to the intense hemorrhaging of the lungs.

5 *Theta toxin* – Most strains of *C. perfringens* produce *theta* toxin. *Theta* toxin is 74 kDa protein responsible for the clear zones of hemolysis seen around colonies on blood agar plates. Purified *theta* toxin is extremely lethal to mice, producing death in a matter of minutes. *Theta toxin* is inhibited by certain steroids, with cholesterol being the most potent
10 inhibitor.

Passive Immunity

The present invention includes a vaccine comprised of a safe and immunologically effective preparation of a minimum amount of an antigen
15 of the present invention, e.g., an *alpha* toxoid, for the vaccination of non-human females, particular fertile and/or pregnant females, who can then transfer the effect of the vaccine to their newborn. Such transfer of immunity from mother to progeny is termed "passive immunity". Passive immunity can be accomplished *inter alia* through the ingestion of
20 colostrums, as occurs in mammals or the absorption of antibody into the bloodstream from the egg yolk, as occurs in poultry. In addition, as disclosed herein, poultry may consume antibodies *in ovo*, which results in raising the level of circulating systemic antibodies.

25 As demonstrated herein, passively transferring a specific amount of anti-*alpha* toxin to the neonatal animal protects neonates against a virulent *Clostridium perfringens* challenge. The extent of protection, as disclosed below, was completely unexpected, as heretofore, it had been believed that the gut had to be bathed with antibodies in order to significantly
30 protect against an oral *C. perfringens* type A challenge. Similarly, it is quite surprising that a correlation would exist between maternal antibody transfer of mucosal immunity through the ingestion of colostrum in the neonatal mammal and the absorption of maternal antibody in the egg. As demonstrated below for chickens, anti-*alpha* toxin antibodies are
35 absorbed into the blood stream *in ovo*. Moreover, the present invention discloses that inducing a specific, defined minimum anti-*alpha* toxin antibody titer in the bloodstream of the hen is sufficient to protect the

5 vaccinated offspring of that hen from a *C. perfringens* type A challenge performed weeks after the birth of those offspring.

Active Immunity

10 The present invention includes for the vaccination of chicken chicks (e.g., broiler chicks) and/or turkey poults to provide active immunity against necrotic enteritis, necrotic dermatitis and gangrenous dermatitis. The chicks and/or poults are vaccinated early in life, at about day one of age or slightly older (within the first week of life) with a single or two doses of the vaccine. Appropriate vaccine dosages for achieving active immunity can
15 vary from about 0.05 mL to about 0.5 mL. In a particular embodiment the vaccine dosage is about 0.05 mL to about 0.1 mL.

Cell Culture

Clostridium perfringens secretes *alpha* toxin into the media during growth.
20 After inactivation and removing at least a majority of the cells from the growth media, the resulting solution is referred to as an *alpha* toxoid supernatant. The cells are generally removed to minimize extraneous antigens in the vaccine which might otherwise promote reactivity and lessen the immune response. However, there is also a finite amount of
25 cell-associated *alpha* toxin. Therefore, the *alpha* toxin antigen may be derived from the cells and/or the media, in either concentrated or non-concentrated form.

C. perfringens may be grown in any appropriate vessel including flasks,
30 bottles, jugs, or mechanical fermenters. Fermentations may be monitored during growth so as to harvest the fermenter when the *alpha* toxin production is at its peak. Typical methods include affinity chromatography, gel electrophoresis (PHAST system, etc.), immuno assays, hemolysin and lecithinase activity assays. The cell culture fluid or cellular extract can be
35 inactivated with formaldehyde (0.1-2.0%) or a combination of formaldehyde and heat. Other chemicals that are typically used for protein denaturing and may also be used include, but are not limited to:

5 glutaraldehyde, phenol, various detergents such as Triton X-100, Sodium
dodecyl sulfate (SDS), and alcohols. Residual formaldehyde levels may
be monitored during inactivation so as to keep an optimal level without
over or under toxoiding. Typical methods for measuring free formaldehyde
are listed in the European Pharmacopoeia (01/2005:20418) or the 9 CFR
10 (113.100). Similar methods are available for measuring other types of
toxin inactivants. In certain instances the *alpha* toxin is deliberately under-
toxoided at this point in order to minimize denaturation of epitopes critical
for the development of antitoxins, and then further treated for detoxification
at a later point in the process. Other suitable chemical or biological agents
15 capable of inactivating the toxin may be also used such as glutaraldehyde,
phenol, various detergents such as Triton X-100, Sodium dodecyl sulfate
(SDS), and alcohols.

The resulting *alpha* toxoid may be stored for a period of time prior to any
20 additional processing, without detrimental effects. Typically, optimal
storage is at 2-8 °C. However, inactivated clostridial toxoids are extremely
stable and may also be stored at higher temperature. For periods of
storage longer than 6 months and higher than 8 °C in temperature, it may
be advisable to retest the potency of the toxoid by a Total Combining

25 Power test (TCP), or another similar immunological assay to determine the
immunogenic stability of the toxoid.

The cells may be removed from the inactivated culture medium by
30 centrifugation and/or filtration to obtain the toxoid supernatant. Removal of
the cells serves to reduce tissue reactivity that can be caused by the cell
components, whereas, removing extraneous antigens from the preparation
helps the immune response to focus on the toxoid component of the
vaccine.

35 The inactivated culture medium may be concentrated by any of a number
of means including ultrafiltration (preferably using ultrafiltration membranes

5 of not greater than 30,000 molecular weight cut-off) or by lyophilization. The concentration process may include diafiltration against an aqueous solution (e.g., phosphate buffered saline) in order to remove low molecular weight contaminants from the preparation. The concentrated fluid may be re-treated one or more times with either formaldehyde and/or heat until a

10 suitable assay indicates that the fluid is free from residual toxicity. Such assays include a mouse bioassay, i.e., injecting the fluid into mice and observing its effect on the mice; or measuring hemolysin activity, or lecithinase activity, etc.

15 The pH of the solution may have to be adjusted prior to blending to ensure optimal binding to adjuvants, emulsification with oils, and/or stability of solution. The isoelectric point (pI) of the *alpha* toxin is approximately 5.5 [Smith et al., *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, (3rd Ed.) Charles Thomas Publishers, p. 116 (1984)]. Adjustment of the pH of the toxoid

20 solution will alter the net charge on the protein, which is advantageous for enhancement of binding to certain adjuvants, such as aluminum adjuvants. The pH may also be adjusted to a level which increases the stability of the *alpha* toxoid for storage over a prolonged period of time. For example, proteins are more likely to precipitate out of solution at their pI, but are

25 usually stable at 1 pH unit above or below this value.

Nucleic Acids Encoding the Polypeptides of the Present Invention

A nucleic acid, such as a cDNA, that encodes a polypeptide of the present invention, can be used to generate recombinant bacterial host cells that

30 express a protein and/or antigen of the present invention, e.g., the *alpha* toxin. Such recombinant host cells can be inactivated, i.e., converted to bacterins, and used in immunogenic compositions such as vaccines.

In addition, obtaining and/or constructing a nucleic acid that encodes a

35 polypeptide of the present invention, including those encoding an *alpha* toxin of the present invention, or an inactive antigenic fragment thereof, may facilitate the production of the *alpha* toxin, *alpha* toxoid or fragments

5 thereof. The *alpha toxin*, *alpha* toxoid and/or antigenic fragments of either
are useful for making certain vaccines of the present invention.

Accordingly, the present invention includes nucleic acid constructs that
allow for the expression and isolation of the proteins and/or antigenic
10 fragments of the present invention. Sequences for such nucleic acids and
corresponding recombinant proteins of the antigens to be used in this
aspect of the present invention are well known to the skilled artisan. A
small sampling of the antigens that can be used in the vaccines of the
present invention, along with their GenBank accession number, and a
15 scientific article disclosing their amino acid sequences are provided below.

EXAMPLES OF ANTIGENS THAT CAN BE USED IN VACCINES

<u>SOURCE</u>	<u>ACCESSION</u>	<u>¹ARTICLE</u>
<u>Antigen</u>	<u>No.</u>	
<u>C. PERFRINGENS</u>		
<i>alpha toxin</i>	CAA35186	Saint-Joanis <i>et al.</i> , Mol. Gen. Genet. 219 (3):453-460 (1989)
<i>beta toxin</i>	CAA58246	Steinhorsdottir <i>et al.</i> , FEMS Microbiol. Lett. 130 (2-3): 273-278 (1995)
<i>beta 2 toxin</i>	NP_150010	Shimizu <i>et al.</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2): 996-1001 (2002)
enterotoxin	BAE79112	Miyamoto <i>et al.</i> , J. Bacteriol. 188 (4): 1585-1598 (2006)
<i>epsilon toxin</i>	AAA23236	Havard <i>et al.</i> , FEMS Microbiol. Lett. 97: 77-82 (1992)
<i>iota toxin</i>	CAA51959	Perelle <i>et al.</i> , Infect. Immun. 61 (12): 5147-5156 (1993)
kappa toxin	NP_561089	Shimizu <i>et al.</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2): 996-1001 (2002)
<i>lambda toxin</i>	CAA35187	Saint-Joanis <i>et al.</i> , Mol. Gen. Genet. 219 (3):453-460 (1989)
<i>theta toxin</i>	NP_561079	Shimizu <i>et al.</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2): 996-1001 (2002)
<u>C. DIFFICILE</u>		
A toxin	A37052	Wren <i>et al.</i> , FEMS Microbiol. Lett. 70: 1-6 (1990)
B toxin	CAA43299	von Eichel-Streiber <i>et al.</i> , Mol. Gen. Genet. 233: (1-2), 260-268 (1992)

¹ The sequences provided in these articles are hereby incorporated by reference.

<u>C. SEPTICUM</u>		
<i>alpha</i> toxin	AAB32892	Ballard <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> 63 (1): 340-344 (1995)
<u>C. NOVYI</u>		
<i>alpha</i> toxin	AAB27213	Ball <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> 61 (7): 2912-2918 (1993)

5 The nucleic acids encoding protein antigens that can be used in the vaccines of the present invention can further contain heterologous nucleotide sequences. To express a recombinant protein of the present invention in a host cell, an expression vector can be constructed
10 comprising the corresponding cDNA. The present invention therefore, includes expression vectors containing nucleic acids encoding recombinant proteins of the present invention, including variants thereof.

15 Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other nucleotide sequences which encode substantially the same amino acid sequence as a nucleic acid encoding a polypeptide of the present invention may be used in the practice of the present invention. These include, but are not limited to, allelic genes, homologous genes from other strains, and/or those that are altered by the substitution of different codons that encode
20 the same amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change. Host cells comprising the expression vectors of the present invention are also included. One commonly employed host cell, is an *E. coli* cell.

25 General methods for the cloning of cDNAs and expression of their corresponding recombinant proteins have been described [see Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L.I. (2000)].

30 In addition, any technique for mutagenesis known in the art can be used to modify a native *alpha* toxin of the present invention, including but not limited to, *in vitro* site-directed mutagenesis [Hutchinson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 253:6551 (1978); Zoller and Smith, *DNA*, 3:479-488 (1984);

5 Oliphant *et al.*, *Gene*, **44**:177 (1986); Hutchinson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**:710 (1986); Wang and Malcolm, *BioTechniques* **26**:680-682 (1999) the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties]. The use of TAB@ linkers (Pharmacia), etc. and PCR techniques also can be employed for site directed mutagenesis [see
10 Higuchi, "Using PCR to Engineer DNA", in *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, *ed.*, Stockton Press, Chapter 6, pp. 61-70 (1989)].

Polypeptides of the Present Invention

15 The present invention includes isolated and/or recombinant polypeptides, including, the *alpha* toxins and *alpha* toxoids of the present invention, strain variants thereof, inactive antigenic fragments thereof, and fusion proteins thereof. In addition, polypeptides containing altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for those
20 within the wild type amino acid sequence resulting in a conservative amino acid substitution are also included by the present invention.

For example, one or more of these amino acid residues within the sequence can be substituted by another amino acid of a similar polarity,
25 which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs.

For example, the nonpolar amino acids include alanine, leucine,
30 isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine and lysine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid.

5 Particularly preferred conserved amino acid exchanges are:

(a) Lys for Arg or *vice versa* such that a positive charge may be maintained;

(b) Glu for Asp or *vice versa* such that a negative charge may be maintained;

10 (c) Ser for Thr or *vice versa* such that a free -OH can be maintained;

(d) Gln for Asn or *vice versa* such that a free NH₂ can be maintained; and

(e) Ile for Leu or for Val or *vice versa* as roughly equivalent hydrophobic amino acids.

15 All of the polypeptides of the present invention, including the antigenic fragments, can be part of a fusion protein. In a specific embodiment, a fusion polypeptide is expressed in a prokaryotic cell. Such a fusion protein can be used for example, to enhance the antigenicity of an antigen or fragment thereof, to lower or remove its toxicity without negating its antigenicity, or to isolate an antigen of the present invention. Isolation of
20 the fusion protein in the latter case can be facilitated through the use of an affinity column that is specific for the protein/peptide fused to the antigen. Such fusion proteins include: a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein, a maltose-binding protein (MBP) fusion protein, a FLAG-tagged fusion protein, or a poly-histidine-tagged fusion protein. Specific linker
25 sequences such as a Ser-Gly linker can also be part of such a fusion protein.

Indeed, the expression of a fusion polypeptide can facilitate stable expression, and/or allow for purification based on the properties of the
30 fusion partner. Thus the purification of the recombinant polypeptides of the present invention can be simplified through the use of fusion proteins having affinity Tags. For example, GST binds glutathione conjugated to a solid support matrix, MBP binds to a maltose matrix, and poly-histidine chelates to a Ni-chelation support matrix [see Hochuli *et al.*, *Biotechnology*
35 6:1321-1325 (1998)].

5 The fusion protein can be eluted from the specific matrix with appropriate buffers, or by treating with a protease that is specific for a cleavage site that has been genetically engineered in between an *alpha* toxin, for example, and its fusion partner. Alternatively, an *alpha* toxin can be combined with a marker protein such as green fluorescent protein [Waldo
10 *et al.*, *Nature Biotech.* 17:691-695 (1999); U.S. Patent No. 5,625,048 and WO 97/26333, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties].

Alternatively or in addition, other column chromatography steps (e.g., gel
15 filtration, ion exchange, affinity chromatography etc.) can be used to purify the natural or recombinant polypeptides of the present invention (see below). In many cases, such column chromatography steps employ high performance liquid chromatography or analogous methods in place of the more classical gravity-based procedures.

20 In addition, the polypeptides of the present invention, including the *alpha* toxins and inactive antigenic fragments thereof can be chemically synthesized [see e.g., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman & Co., New York, N.Y., pp. 382, Grant, *ed.* (1992)].

25

General Polypeptide Purification Procedures

Generally, initial steps for purifying a polypeptide of the present invention can include salting in or salting out, e.g., in ammonium sulfate fractionations; solvent exclusion fractionations, e.g., an ethanol
30 precipitation. In addition, high speed ultracentrifugation may be used either alone or in conjunction with other extraction techniques.

Generally good secondary isolation or purification steps include solid phase absorption using calcium phosphate gel, hydroxyapatite, or solid
35 phase binding. Solid phase binding may be performed through ionic bonding, with either an anion exchanger, such as diethylaminoethyl (DEAE), or diethyl [2-hydroxypropyl aminoethyl (QAE) SEPHADEX or

5 cellulose; or with a cation exchanger such as carboxymethyl (CM) or
sulfopropyl (SP) SEPHADEX or cellulose. Alternative means of solid
phase binding includes the exploitation of hydrophobic interactions e.g.,
the use of a solid support such as phenylSephadex and a high salt buffer;
affinity-binding immuno-binding, using e.g., an *alpha* toxin-antibody bound
10 to an activated support. Other solid phase supports include those that
contain specific dyes or lectins etc.

A further solid phase support technique that is often used at the end of the
purification procedure relies on size exclusion, such as SEPHADEX and
15 SEPHAROSE gels. Alternatively, a pressurized or centrifugal membrane
technique, using size exclusion membrane filters may be employed.
Oftentimes, these two methodologies are used in tandem.

Solid phase support separations are generally performed batch-wise with
20 low-speed centrifugation, or by column chromatography. High
performance liquid chromatography (HPLC), including such related
techniques as FPLC, is presently the most common means of performing
liquid chromatography. Size exclusion techniques may also be
accomplished with the aid of low speed centrifugation. In addition size
25 permeation techniques such as gel electrophoretic techniques may be
employed. These techniques are generally performed in tubes, slabs or
by capillary electrophoresis.

Almost all steps involving polypeptide purification employ a buffered
30 solution. Unless otherwise specified, generally 25-100 mM concentrations
of buffer salts are used. Low concentration buffers generally imply 5-25
mM concentrations. High concentration buffers generally imply
concentrations of the buffering agent of between 0.1 – 2.0 M
concentrations. Typical buffers can be purchased from most biochemical
35 catalogues and include the classical buffers such as Tris, pyrophosphate,
monophosphate and diphosphate and the Good buffers such as Mes,
Hepes, Mops, Tricine and Ches [Good *et al.*, *Biochemistry*, **5**:467 (1966);

5 Good and Izawa, *Meth. Enzymol.*, 24B:53 (1972); and Fergunson and Good, *Anal. Biochem.*, 104:300 (1980)].

Materials to perform all of these techniques are available from a variety of commercial sources such as Sigma Chemical Company in St. Louis, Missouri.

10

Vaccine Components

C. Perfringens Alpha Toxoid: In particular embodiments it is advantageous for the animal vaccine to contain the minimum amount of the *alpha* toxoid required for protection against necrotic enteritis. That level was
15 determined to be 2 Total Combining Power units (TCP) per dose under the particular conditions exemplified below. TCP units are set based upon international standards [Batty, *Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology*, Chapter 8, Volume 5A (1971) ed. JR Norris and DW Ribbons] and the vaccines of the present invention can be readily blended
20 to have the desired potency. Less than 2 TCP units may be used, even under these conditions, if the vaccine further comprises immune stimulants. In any case, it is preferable that the vaccine elicit 4 or more antitoxin units per mL of animal sera.

25 Quantifying Alpha Toxoid: It is generally desirable to quantify the *alpha* toxoid to ensure that optimal levels are included in the vaccine. One conventional method of quantifying toxoids employs the Total Combining Power (TCP) test. In this assay, a specific volume of the *alpha* toxoid supernatant is contacted with a known quantity of antitoxin units. After
30 providing a suitable incubation period to allow the antitoxin and *alpha* toxoid to bind, e.g., 0.5 - 2 hours, a known quantity of the *alpha* toxin is added. The remaining free antitoxin then is given a suitable period to bind with the *alpha* toxin. The amount of free *alpha* toxin is then determined by adding to the solution a substrate for the phospholipase C activity of the
35 *alpha* toxin. Suitable substrates include red blood cells (particularly sheep red blood cells) and lecithin. The *alpha* toxoid can then be quantified through a calculation based upon the amount of phospholipase C activity.

5 The greater the amount of *alpha* toxoid present in the assay solution, the greater the amount of phospholipase C activity measured in the assay. Alternatively, the determination may be made without measuring the phospholipase C activity, e.g., any competitive antibody binding analysis may be used, including incorporating a chromatography step, enzyme
10 linked immunosorbant assay (ELISA), or competitive binding analysis by a Biacore instrument or the like.

Additional Antigens: Clostridial diseases often occur as mixed infections and therefore the addition of other clostridial toxoids may further reduce
15 pathology and clinical signs. Non-limiting examples of other clostridial toxoids from organisms which are known to cause gastric enteritis, including those from *C. perfringens*, that may be added to a vaccine of the present invention to increase potency against mixed infections include: *C. perfringens beta toxin*, *beta 2 toxin*, *theta toxin*, *epsilon toxin*, enterotoxin,
20 *kappa toxin*, *lambda toxin* and *iota toxin*; *C. sordellii* hemorrhagic toxin (HT) and lethal toxin (LT), *C. difficile* A and B toxins; *C. septicum alpha* toxin; and *C. novyi alpha* (A) and *beta* (B) toxins.

Antigens from other bacteria, viruses, fungi, or parasites may also be
25 included in the vaccines of the present invention. Such antigens include other toxins or toxoids, bacteria and/or extracts from bacteria; fungi and/or extracts from fungi; viruses and/or viral proteins; and/or parasites or proteins from parasites. Appropriate viral, bacterial, and parasitic antigens from the sources provided herein are well known in the art.

30 Non-limiting examples of bacterial organisms are: *Escherichia coli*, *Camplobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Chlamydia*, *Erysipelas spp.* *Pasteurella*, *Bordetella*, and *Ornithobacterium*.

35 Non-limiting examples of related toxins are: Gram negative bacteria lipopolysaccharide (LPS), which is known to enhance the immunological

5 response of vaccines and thus improve the production of antitoxins to the *alpha* toxin of *C. perfringens* and mycotoxins.

Non-limiting examples of appropriate viruses are: Coronavirus, Rotavirus, Astrovirus, Enteroviruslike virus, Torovirus, Adenovirus, Reovirus, Birnavirus, Herpesvirus, Paramyxovirus, Picornavirus, Mareks Disease
10 Virus, Hemorrhagic Enteritis Virus, and Newcastle Disease Virus.

Non-limiting examples of parasites are: Coccidia, the *Eimeria* species for example, and Cryptosporidia, [see, US 2004/0018215A1, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties].

15

Adjuvants

Adjuvants are also useful for improving the immune response and/or increasing the stability of vaccine preparations. Adjuvants are typically described as non-specific stimulators of the immune system, but also can
20 be useful for targeting specific arms of the immune system. One or more compounds which have this activity may be added to the vaccine. Therefore, particular vaccines of the present invention further comprise an adjuvant. Examples of chemical compounds that can be used as adjuvants include, but are not limited to aluminum compounds (e.g.,
25 aluminum hydroxide), metabolizable and non-metabolizable oils, mineral oils including mannide oleate derivatives in mineral oil solution (e.g., MONTANIDE ISA 70 from Seppic SA, France), and light mineral oils such as DRAKEOL 6VR, block polymers, ISCOM's (immune stimulating complexes), vitamins and minerals (including but not limited to: vitamin E,
30 vitamin A, selenium, and vitamin B12) and CARBOPOL®.

Other suitable adjuvants, which sometimes have been referred to as immune stimulants, include, but are not limited to: cytokines, growth factors, chemokines, supernatants from cell cultures of lymphocytes,
35 monocytes, cells from lymphoid organs, cell preparations and/or extracts from plants, bacteria or parasites (*Staphylococcus aureus* or lipopolysaccharide preparations) or mitogens.

5 Generally, an adjuvant is administered at the same time as an antigen of the present invention. However, adjuvants can also, or alternatively be administered within a two-week period prior to the vaccination, and/or for a period of time after vaccination, *i.e.*, so long as the antigen, *e.g.*, an *alpha* toxoid, persists in the tissues.

10

Preparation of Vaccines

Processes for making the vaccines of the present invention are also provided. In one embodiment, the vaccine comprises blending a safe and immunologically effective combination of an antigen of the present
15 invention, *e.g.*, an *alpha* toxoid supernatant of a single *C. perfringens* Type, and a pharmaceutically acceptable adjuvant. The amount of *alpha* toxoid can be quantified to contain at least 2 total combining power (TCP) units per dose of the vaccine. The *alpha* toxoid supernatant can be concentrated to minimize the dose size required to obtain at least 4.0
20 antitoxin units (A.U.) per mL of antisera from a vaccinated animal. The addition of other pharmaceutically acceptable immune modulation agents can reduce the TCP requirement to fall below 2 units per dose, so long as the vaccination still results in the requisite 4.0 A.U. of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera from the vaccinated animal. In certain
25 embodiments, the *C. perfringens alpha* toxoid is further purified from the *alpha* toxoid supernatants by such techniques as, but not limited to, concentration/ultrafiltration, chromatography and centrifugation.

Administration of Vaccines

30 Vaccines may be administered as a liquid, emulsion, dried powder and/or in a mist through any parenteral route, intravenously, intraperitoneally, intradermally, by scarification, subcutaneously, intramuscularly, or inoculated by a mucosal route, *e.g.*, orally, intranasally, as an aerosol, by eye drop, by *in ovo* administration, or implanted as a freeze dried powder.

35

00007

5

Animal Subjects

The term "animal subject" refers to an animal species capable of being infected by a pathogenic bacterium, and in a particular embodiment includes humans. Appropriate animal subjects also include those in the wild, livestock (e.g., raised for meat, milk, butter, eggs, fur, leather, feathers and/or wool), beasts of burden, research animals, companion animals, as well as those raised for/in zoos, wild habitats and/or circuses.

In a particular embodiment an animal subject of the invention is a "food producing" animal. For purposes of the present invention, the term "food-producing" animal shall be understood to include all animals bred for consumption (e.g., turkeys, broiler chickens) or for consumables (e.g., dairy cows, egg-laying hens, and the like) by humans and/or other animals. A non-limiting list of such animals include avians such as poultry, i.e., chickens, turkeys, geese, duck, ostriches, etc., bovines (e.g., cattle, dairy cows, buffalo), ovines (e.g., goats or sheep), porcines (e.g., swine, hogs or pigs), and equines (e.g., horses) etc.

In another embodiment, the animal subject is a companion animal. For purposes of the present invention, the term "companion" animal shall be understood to include housecats (feline), dogs (canine), rabbit species, horses (equine), rodents (e.g., guinea pigs, squirrels, rats, mice, gerbils, and hamsters), primates (e.g., monkeys) and avians, such as pigeons, doves, parrots, parakeets, macaws, canaries, and the like.

Other animals are also contemplated to benefit from the inventive vaccines, including marsupials (such as kangaroos), reptiles (such as farmed turtles), game birds, swans, ratites, and other economically important domestic animals.

The following examples are intended for exemplification of the present invention only and should not be construed to limit the scope of the invention in any way.

EXAMPLESEXAMPLE 1EFFICACY OF VACCINE IN BROILER HENS
VACCINATED BY A SUBCUTANEOUS ROUTESummary

Vaccinating broiler hens by a subcutaneous route using a vaccine comprising a single *C. perfringens* Type *alpha* toxoid (Type A) results in (i) an immunogenic response in the vaccinated broiler hens, (ii) significant anti-*alpha* toxoid antibody in the eggs of the vaccinated broiler hens, and (iii) passive protection of the subsequently born offspring of the vaccinated broiler hens.

Materials

C. Perfringens Type A *alpha* toxoid: *C. perfringens* Type A *alpha* toxoid is prepared as follows: *C. perfringens* Type A culture is grown under anaerobic conditions in a large scale fermenter (5000L) at a temperature of $37^{\circ}\text{C} \pm 2$. During fermentation sodium hydroxide is added in order to maintain a pH of 7.8 ± 2 . Carbohydrate (dextrin) is also added during the fermentation (up to 1% w/v) to promote growth. The culture is allowed to grow for 3-6 hours. At the end of the growth period, formaldehyde solution is added to the fermenter to a final level not to exceed 0.5%. Cells are removed by centrifugation and the resulting supernatant is filtered with a depth filter having pore sizes in the range of $0.25 - 2.0 \mu\text{m}$. The temperature is maintained at $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ during this process. The inactivated culture supernatant is then diafiltered and concentrated 10-30 fold using ultrafiltration with filters not greater than 20,000 molecular weight cutoff. Concentrated supernatant is stored at $2-8^{\circ}\text{C}$ for future blending into vaccines. Prior to blending, the concentrated supernatant is assayed for potency by using the combining power test (TCP) described above. The potency of each batch of toxoid is assigned in TCP units per mL.

5 Vaccine: The supernatant comprising the inactivated *C. perfringens* type A *alpha* toxoid is blended as a water-in-oil emulsion containing 4 Combining Power Units (TCP) per mL. The emulsion is prepared with 70% oil phase and 30% aqueous phase.

 The oil phase is prepared as follows:

10	Mineral oil	89.20%
	Span 80	10.00%
	Benzyl alcohol	0.75%
	Triethanolamine	0.05%

15 The aqueous phase is prepared as follows:

<i>C. perfringens</i> type A toxoid + saline	88%
33% Tween 80/saline solution	12%

20 A total of 30% aqueous phase is added slowly to the 70% oil phase and emulsified with a Silverson homogenizer. (Other inline homogenizers may also be used). The time of homogenization depends on the volume of the emulsion and is determined by viscosity, particle size, and stability of the emulsion for at least three days at 37 °C. Gentamicin is added to the aqueous phase to provide a final concentration of up to 30 µg/mL of serial
25 volume. Thimerosol is added to the aqueous phase to provide a final concentration of up to 0.01% of serial volume.

30 Vaccination: The pullets are vaccinated subcutaneously with 0.5 mL per dose of the blended vaccine. The first dose of vaccine is administered at 14 weeks of age, and the second dose is administered at 20 weeks of age. Twenty broiler pullets are vaccinated with the blended vaccine described above containing 1 TCP per dose. A second group of twenty pullets are vaccinated with the blended vaccine described above containing 2 TCP per dose. A third group of twenty pullets are used as controls and are not
35 vaccinated. A total of 2-3 roosters are commingled with each group of pullets to produce fertilized eggs.

5 Passive Immunity

Eggs are collected from 32, 52, and 65 week-old vaccinated and control hens. The progeny chicks hatched from these eggs are used to evaluate passive protection as listed in Table 1.

10 TABLE 1
NUMBER OF PROGENY CHICKS USED AT EACH TIME POINT

<u>Hens age</u>	<u>Progeny chicks in vaccinate group</u>	<u>Progeny chicks in challenge control group</u>
32 Weeks	9	9
52 Weeks	30	20
65 Weeks	14	18

15 The chicks are fed a non-medicated high protein diet for the first two weeks and then switched to normal feed for the remainder of the trial. Each bird is orally challenged with a virulent *C. perfringens* Type A that expresses both the *alpha* toxin and the *beta* 2 toxin. The challenge dose contains 6.3×10^7 to 6.3×10^8 colony forming units per mL, in a 3 mL dose. The birds are challenged for 3 consecutive days starting at 18 or 19 days of age. Two days after the last day of the challenge the birds are sacrificed and then examined for necrotic enteritis lesions. The efficacy results for the progeny chicks are listed individually in Tables 2-4, denoting the vaccination status of the individual chick's mother, and the extent of its necrotic enteritis lesions, if any, according to the Rating Scale provided below. Table 2 denotes progeny chicks from 32 week-old hens, Table 3 denotes progeny chicks from 52 week-old hens, and Table 4 denotes progeny chicks from 65 week-old hens. Table 5 shows the median score for progeny chicks from hens that were vaccinated with 2 TCP per dose. As shown, the progeny of the vaccinated hens are significantly protected against the administered bacterial challenge relative to the progeny of unvaccinated hens.

20

25

30

- 5
- Rating Scale for Necrotic Enteritis (NE) Lesions
- 0 = No necrotic enteritis gross lesions in the small intestine; intestine has normal elasticity (rolls back on itself after being opened).
- 10
- 1 = Thin and flaccid intestinal wall (intestine remains flat when opened and doesn't roll back into normal position); excess or thickened mucus covering mucosa membrane or focal or multifocal mild reddening of the mucosa or congestion of the serosal vessels.
- 15
- 2 = Single or few multifocal areas of reddening and swelling of the intestinal wall; single or few multifocal areas of ulceration or necrosis of the intestinal mucosa.
- 20
- 3 = Extensive multifocal areas of necrosis and ulceration of the intestinal mucosa ± significant hemorrhage or layer of fibrin or necrotic debris on the mucosal surface (Turkish towel appearance).
- 25
- 4 = Dead animal with necrotic enteritis gross lesions scored 2 or above.

30

TABLE 2

NECROTIC ENTERITIS LESION SCORES IN

INDIVIDUAL PROGENY CHICKS FROM 32 WEEK-OLD HENS

<u>Non-vaccinated</u> <u>non-challenged</u> <u>controls</u>	<u>Non-vaccinated</u> <u>challenge</u> <u>controls</u>	<u>Vaccine</u> <u>with 1 TCP</u> <u>per dose</u>	<u>Vaccine</u> <u>with 2 TCP</u> <u>per dose</u>
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	
Mean= 0	2.0	1.8	1.0
Median = 0	2.0	1.0	1.0

5

TABLE 3
NECROTIC ENTERITIS LESION SCORES IN
INDIVIDUAL PROGENY CHICKS FROM 52 WEEK-OLD HENS

<u>Non-vaccinated non-</u> <u>challenged controls</u>	<u>Non-vaccinated</u> <u>challenge controls</u>	<u>Vaccine with 2</u> <u>TCP per dose</u>
0	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
		0
		2
		1
		0
		1
		0
		1
		0
		2
		0
Mean= 0	1.7	0.6
Median = 0	1.5	0.5

TABLE 4
NECROTIC ENTERITIS LESION SCORES IN
INDIVIDUAL PROGENY CHICKS FROM 65 WEEK-OLD HENS

<u>Non-vaccinated non-</u> <u>challenged controls</u>	<u>Non-vaccinated</u> <u>challenge controls</u>	<u>Vaccine with 2</u> <u>TCP per dose</u>
0	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	
	2	
	3	
	3	
Mean= 0	1.5	0.6
Median = 0	2.0	0.0

TABLE 5
MEDIAN SCORE IN PROGENY CHICKS FROM
HENS VACCINATED WITH A DOSE OF 2 TCP

<u>TREATMENT</u> <u>GROUPS</u>	<u>MEDIAN NECROTIC ENTERITIS LESION SCORE</u> <u>FROM PROGENY OF HENS</u>		
	<u>32 WEEKS OLD</u>	<u>52 WEEKS OLD</u>	<u>65 WEEKS OLD</u>
Vaccinate group	1	0.5	0
Control group	2	1.5	2

Antibody Titers

Sera: Blood samples are collected from hens at 33 and 78 weeks of age. Blood is allowed to clot for 2-4 hours at room temperature and then sera is obtained following centrifugation. Sera is stored at -10 °C or colder until tested for antibody titer. The antibody titer to *C. perfringens alpha* toxin is evaluated by a haemolysis inhibition assay using serial dilutions and sheep red blood cells as follows: Serial dilutions (two-fold) are made in a V-bottom microtiter plate for each sample tested. A known amount of *alpha* toxin is added to each well containing a dilution of the sample. The plates are then incubated for one hour at 36 ± 2 °C to allow the antibodies obtained from the sera to complex with the *alpha* toxin. Following this incubation, a 0.5% solution of sheep red blood cells are added to the wells and the plates are incubated for three hours at 36 ± 2 °C to allow uncomplexed *alpha* toxin to lyse the red blood cells. The plates are then checked for the absence of haemolysis. The reciprocal of the highest dilution of the test sample that shows no haemolysis is considered the end point. The antibody titers are shown in Tables 6-8.

Egg Yolks: Egg yolks are processed to determine the antibody titer. Briefly, the yolk is separated and mixed with commercial extraction buffer (Promega EGGstract System®, Promega Catalog No. G1531 and G2610, Madison, Wisconsin). Following the extraction, an IgY pellet is obtained, which is then resuspended to the original volume of yolk with phosphate buffered saline. Egg yolk extract is pooled from at least 5 eggs and tested for antibody titer using a haemolysis inhibition (HI) assay as described for the sera above. The yolks from eggs collected from layers at 40, 52, and 65 weeks of age are evaluated for antibody titer in this manner. The antibody titers for the egg yolks are shown in Table 9.

TABLE 6
INDIVIDUAL HEN SERUM ANTIBODY TITER TO
***C. PERFRINGENS* TYPE A ALPHA TOXIN AT 33 WEEKS OF AGE**

<u>Vaccinated hens</u> <u>(2 TCP/Dose)</u>	<u>Control hens*</u>
1024	1
8192	2
256	1
1024	2
1024	2
256	2
256	2
1024	2
512	1
64	1
Geomean = 588	Geomean ≤ 2

*Values < 2 were considered as 1 for the purpose of calculating the geometric mean

TABLE 7
INDIVIDUAL HEN SERUM ANTIBODY TITER TO
***C. PERFRINGENS* TYPE A ALPHA TOXIN AT 78 WEEKS OF AGE**

<u>Vaccinated hens</u> <u>(2 TCP/Dose)</u>	<u>Control hens*</u>
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	

Geomean = 235 Geomean = 2

*Values < 2 were considered as 1 for the purpose of calculating the geometric mean

TABLE 8
GEOMETRIC MEAN HAEMOLYSIS INHIBITION TITER IN SERA
OF HENS AT VARIOUS TIME POINTS

<u>TREATMENT GROUPS</u>	<u>TITER IN SERUM</u> <u>(AGE AT SAMPLE COLLECTION)</u>	
	<u>33 WEEKS</u>	<u>78 WEEKS</u>
<u>VACCINATE GROUP</u> <u>(2 TCP/DOSE)</u>	588	235
<u>CONTROL GROUP</u>	≤2	2

TABLE 9
HAEMOLYSIS INHIBITION TITER IN EGG YOLK
FROM HENS COLLECTED AT VARIOUS TIME POINTS

<u>TREATMENT</u> <u>GROUPS</u>	<u>TITER IN EGG YOLK</u> <u>(AGE AT EGG COLLECTION)</u>		
	<u>40 WEEKS</u>	<u>52 WEEKS</u>	<u>65 WEEKS</u>
<u>VACCINATE</u> <u>GROUP</u>	515	2048	64
<u>CONTROL</u> <u>GROUP</u>	≤2	2	≤2

EXAMPLE 2
EFFICACY OF VACCINE IN BROILER HENS
VACCINATED BY AN INTRAMUSCULAR ROUTE

Summary

Vaccination of broiler hens by an intramuscular route using a vaccine comprising a single *C. perfringens* Type *alpha* toxoid (Type A), also results in (i) an immunogenic response in the vaccinated broiler hens, (ii) significant

anti-*alpha* toxoid antibody in the eggs of the vaccinated broiler hens, and (iii) passive protection for the subsequently born offspring of the vaccinated broiler hens.

Passive Immunity

A total of 14 broiler pullets are intramuscularly vaccinated with two doses of a 0.5 mL of the vaccine of Example 1 above, containing 2 TCP. An additional group of 40 pullets are used as controls. Three roosters are commingled with each group of pullets, as described above. The first dose of vaccine is administered at 10 weeks of age and the second dose is administered at 23 weeks of age. The eggs are collected from the hens at 32 weeks of age and hatched to determine passive protection in the progeny chicks following an experimental *C. perfringens* challenge.

Table 10 shows the incidence of necrotic enteritis and the median score for its corresponding lesions as determined by the Rating Scale of Example 1 above, for the progeny chicks of vaccinated and control hens. Table 11 shows that median score for the necrotic enteritis lesions for the individual progeny chicks. Table 12 lists the antibody titers against *C. perfringens* Type A *alpha* toxin of the individual progeny chicks, whereas, the antibody titers for the egg yolks from eggs collected from the vaccinated and control hens at 32 weeks of age are provided in Table 13.

TABLE 10
INCIDENCE OF DISEASE AND NECROTIC ENTERITIS LESION

<u>TREATMENT GROUPS</u>	<u>Number of birds</u>	<u>% Incidence</u>	<u>Median Score</u>	<u>Mean Score</u>
<u>VACCINATE GROUP</u>	8	0 (0/8)	0	0
<u>CONTROL GROUP</u>	29	76 (22/29)	2	1.7

TABLE 11
NECROTIC ENTERITIS LESION SCORES IN INDIVIDUAL
PROGENY CHICKS FROM 32 WEEK-OLD HENS

<u>Non-vaccinated</u> <u>non-challenged</u> <u>controls</u>	<u>Non-vaccinated</u> <u>challenge controls</u>	<u>Vaccine with 2</u> <u>TCP per dose</u>
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	
Mean =	0.0	1.7
Median =	0.0	2.0
		0.0

TABLE 12
SERUM ANTIBODY TITER OF
INDIVIDUAL HENS AT 35 WEEKS OF AGE²

<u>VACCINATED HENS</u> (2 TCP/Dose)	<u>CONTROL HENS³</u>
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
	2
	1
	2
	32
	1
	2
	1
	1
	2
	1
	1
	1

² Antibodies to *C. perfringens* Type A Alpha Toxin as Measured by Haemolysis Inhibition Assay described in Example 1 above.

³ Values < 2 were considered as 1 for the purpose of calculating the geometric mean.

Geomean = 681 ≤ 2

TABLE 13
ANTIBODY TITER IN EGG YOLK COLLECTED
FROM HENS AT 32 WEEKS OF AGE

<u>TREATMENT GROUPS</u>	<u>HAEMOLYSIS</u> <u>INHIBITION TITER</u>
<u>VACCINATE GROUP</u>	512
<u>CONTROLS GROUP</u>	<2

EXAMPLE 3
SEROLOGY IN SPF WHITE LEGHORN PULLETS
VACCINATED BY A SUBCUTANEOUS ROUTE

Antibody Titers

Antibody titers are evaluated in SPF white leghorn pullets that are vaccinated subcutaneously with the vaccine of Example 1 above, containing 1, 2, or 3 TCP. The pullets are vaccinated at 15 weeks of age with 0.5 mL of the vaccine and a booster dose is administered 4 weeks following the initial vaccination. Blood samples are collected 6 weeks following the booster vaccination. Serum from each individual bird is evaluated for antibody titer by the haemolysis inhibition assay as described above in Example 1.

80-11

TABLE 14
INDIVIDUAL PULLET SERUM ANTIBODY TITER TO
***C. PERFRINGENS* TYPE A ALPHA TOXIN**

<u>1 TCP/DOSE</u>		<u>2 TCP/DOSE</u>		<u>3 TCP/DOSE</u>		<u>CONTROLS</u>	
<u>Bird Id</u>	<u>Titer</u>	<u>Bird Id</u>	<u>Titer</u>	<u>Bird Id</u>	<u>Titer</u>	<u>Bird Id</u>	<u>Titer*</u>
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		
Geomean	242		1290		724		≤2

* Titers of <2 are considered as 1 for determining geometric mean titer

The antibody titer in the eggs collected at 25 week of age from the white leghorn layers are evaluated for haemolysis inhibition titer. The results are tabulated in Table 15.

TABLE 15
POOLED EGG YOLK ANTIBODY TITER TO
***C. PERFRINGENS* TYPE A ALPHA TOXIN**

<u>GROUP</u>	<u>VACCINE</u>	<u>ANTIBODY TITER</u>
1	1 TCP	512
2	2 TCP	512
3	3 TCP	512
4	Controls	<2

DETERMINATION OF TOXIN NEUTRALIZATION TITER (TNT)
IN POOLED SERA OF WHITE LEGHORN HENS

Antitoxin titer to *C. perfringens* Type A *alpha* toxin in the pooled serum of the hens is evaluated using mice. The pooled sera are tested for anti-

toxin titer using a method as described in Code of Federal Regulations, Animal and Plant Health Inspection Service, Department of Agriculture. The methods used to measure the antitoxin was similar to the current 9 CFR §113.111 (c), except that *alpha* toxin and antitoxin reagents are used instead of *beta* toxin and antitoxin. The following test reagents are used to determine the antitoxin titer:

- 1) *C. perfringens* Type A *alpha* antitoxin: IRP 426 (obtained from Center for Veterinary Biologics, USDA).
- 2) *C. perfringens* Type A *alpha* toxin IRP 446 (obtained from Center for Veterinary Biologics, USDA).

Briefly, diluted standard antitoxin or sera are combined with a known amount of standard *alpha* toxin. The presence of un-neutralized toxin is then detected by injection of the mixture into mice. Comparison to the effects of known amounts of standard *alpha* antitoxin on toxin activity are then evaluated by determining the dilution of standard or test sera that protects the mice from death in a bioassay. The antitoxin titer in the pooled sera of white leghorn pullets are as shown in Table 16 below.

TABLE 16
TOXIN NEUTRALIZATION TITER (TNT) IN
VACCINATED AND CONTROL PULLETS

<u>GROUP</u>	<u>VACCINE</u>	<u>ANTITOXIN TITER IN SERUM</u>	
		<u>Pre-vaccination</u>	<u>Post -vaccination</u>
1	1 TCP	<1	≥2 and <4
2	2 TCP	<1	≥4
3	3 TCP	<1	≥4
4	Controls	<1	<1

EXAMPLE 4

SEROLOGY IN SPF WHITE LEGHORN PULLETS
VACCINATED BY AN INTRAMUSCULAR ROUTE

Antibody Titers

Antibody titers in SPF white leghorn pullets that are vaccinated twice intramuscularly with vaccine of Example 1 above, containing 1, 2, or 3 TCP

are evaluated. The pullets are vaccinated at ten weeks of age with 0.5 mL of the vaccine and a booster dose is given four weeks following initial vaccination. Blood samples are collected seven weeks following booster vaccination. The individual pullet sera is evaluated for antibody titer by haemolysis inhibition assay as described in Example 1 above, and is tabulated in Tables 17 and 18 below.

TABLE 17
INDIVIDUAL PULLET SERUM ANTIBODY TITER TO
***C. PERFRINGENS* TYPE A ALPHA TOXIN**

1 TCP		2 TCP		3 TCP		Controls	
Bird Id	Titer	Bird Id	Titer	Bird Id	Titer	Bird Id	*Titer
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
Geomean	540		1024		2580		3

* Titers of <2 are considered as 1 for determining geometric mean titer

Toxin neutralization titer (TNT) in pooled sera of hens is evaluated using the procedure as described in Example 3 above, and the results are provided in Table 18 below.

TABLE 18
TOXIN NEUTRALIZATION TITER (TNT) IN
VACCINATED AND CONTROL PULLETS

<u>GROUP</u>	<u>VACCINE</u>	<u>ANTITOXIN TITER IN SERUM</u>	
		<u>Pre-vaccination</u>	<u>Post-vaccination</u>
1	1 TCP	<1	≥4
2	2 TCP	<1	≥4
3	3 TCP	<1	≥4
4	Controls	<1	<1

The antibody titer in the eggs collected at 25 week of age from these white leghorn layers are evaluated for haemolysis inhibition titer as described in Example 1 above. The results are summarized below in Table 19.

TABLE 19
POOLED EGG YOLK ANTIBODY TITER TO
C. PERFRINGENS TYPE A ALPHA TOXIN

<u>GROUP</u>	<u>VACCINE</u>	<u>ANTIBODY TITER</u>
1	1 TCP	512
2	2 TCP	256
3	3 TCP	512
4	Controls	<2

EXAMPLE 5
COMPARISON OF A MUTIVALENT AND A MONOVALENT
C. PERFRINGENS ALPHA TOXOID VACCINE IN PORCINE

Summary

Methods are described for providing passive protection in neonatal pigs by vaccinating the pregnant sows/gilts with the *C. perfringens* type A *alpha* toxoid vaccines of the present invention. The results show an antibody response in sows that can be transfered to piglets through colostrum.

Materials

C. perfringens Type A alpha toxoid: *C. perfringens* Type A *alpha* toxoid was prepared as described in Example 1 above.

Vaccine: A vaccine of the present invention can be blended with inactivated *C. perfringens* type A *alpha* toxoid containing >2 Total Combining Power Units. The vaccine can be blended with any adjuvant disclosed herein, including oil-in-water emulsion containing mineral oils, vegetable oils (peanut oil, soybean oil), squalene, squalane and other metabolizable oils. Other adjuvants such as Seponin, CARBOPOL®, and aluminum containing adjuvants (aluminum hydroxide, aluminum phosphate) also can be used in vaccine preparation. The vaccine can further contain other antigens including *E. coli* (K88, K99, 987P, Type 1), toxoids from *C. perfringens*, and/or toxoids from other pathogenic bacteria including *Clostridium difficile*, rotavirus, and/or Cryptosporidia.

Administration

The vaccines are administered to pregnant gilts/sows prior to farrowing by either intramuscular or subcutaneous route in order to provide passive protection in neonatal pigs through the ingestion of colostrum.

Results

The study is conducted in 32 week-old pigs comparing three vaccines:

Vaccine #1: blended with an aluminum hydroxide adjuvant containing 4 TCP of *C. perfringens* Type A *alpha* toxoid in a 2 mL dose.

Vaccine #2: blended with 4 TCP of *C. perfringens* type A *alpha* toxoid, *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P, *E. coli* Type 1 and *C. perfringens* type C *beta* toxoid in a 2 mL dose.

Vaccine #3: prepared as a placebo vaccine containing no *C. perfringens* type A *alpha* toxoid, but containing *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P, *E. coli* Type 1 and *C. perfringens* type C *beta* toxoid in a 2 mL dose.

One group of ten pigs is vaccinated intramuscularly with 2 mL of Vaccine #1. A second group of ten pigs is vaccinated intramuscularly with 2 mL of Vaccine #2. The third group of seven pigs is vaccinated with 2 mL of Vaccine #3. A booster dose of 2mL is given 20 days following the initial

vaccinations. The sera samples are collected at the time of initial vaccination (Day 0), 20 days after the booster vaccination (Day 40) and 41 days after booster vaccination (Day 61). The sera samples are then evaluated for antibody titer to *alpha* toxin by the haemolysis inhibition assay described in Example 1 above. The results for the three vaccines are individually shown in Tables 20-22, respectively.

TABLE 20
MONOVALENT *C. PERFRINGENS* TYPE A *ALPHA* TOXOID VACCINE

Pig #	Haemolysis Inhibition Titer		
	Day 0 (Pre-vac)	Day 40	Day 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
Geomean	12	49	60

TABLE 21
C. PERFRINGENS TYPE A ALPHA TOXOID COMBO VACCINE
WITH E. COLI- C. PERFRINGENS TYPE C BETA TOXOID

Haemolysis Inhibition Titer			
Pig #	Day 0 (Pre- vac)	Day 40	Day 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
Geomean	8	79	74

TABLE 22
E. COLI – C. PREFRINGENS TYPE C BETA TOXOID

Haemolysis Inhibition Titer			
Pig #	Day 0 (Pre- vac)	Day 40	Day 61
Group 3	Day 0	Day 40	Day 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
Geomean	4	24	24

EXAMPLE 6
DETERMINATION OF TOXIN NEUTRALIZATION TITER (TNT)
IN POOLED SERA OF VACCINATED SOWS

Four pregnant sows are evenly divided into two treatment groups. One group is vaccinated by intramuscular route with 2.0 mL of vaccine containing 4 TCP in a 2 mL dose of Vaccine #1 of Example 5 above. The other group is the controls who are not vaccinated. The sows are vaccinated at approximately 6-7 weeks prior to farrowing, and a booster

dose is given three weeks later. Blood samples are collected before vaccination, and just prior to farrowing. Table 23 shows the evaluation of the sera samples for antitoxin titer to *alpha* toxin using a toxin neutralization test (TNT) as described in Example 3 above.

TABLE 23
TNT TITER

<u>Treatment Group</u>	<u>Sow Number</u>	<u>Pre-vaccination (TNT)</u>	<u>Post-Booster vaccination (TNT)</u>
Vaccinate	10614	<1	>4 <8
Vaccinate	10616	<1	>4 <8
Control	10615	<2	<2
Control	10617	<1	<2

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

It is further to be understood that all base sizes or amino acid sizes, and all molecular weight or molecular mass values, given for nucleic acids or polypeptides are approximate, and are provided for description. Various publications are cited herein, the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entireties.

WHAT IS CLAIMED:

1. A vaccine comprising an antigen selected from the group consisting of a *C. perfringens alpha* toxoid, an antigenic fragment of a *C. perfringens alpha* toxoid, an inactive antigenic fragment of a *C. perfringens alpha* toxin, and any combination thereof;

wherein one to two doses of 0.25 - 0.6 mL per dose of the vaccine is sufficient to induce at least four antitoxin units (A.U.) of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera of a chicken vaccinated with the vaccine.

2. The vaccine of Claim 1, wherein the antigen is in a cell-free preparation.

3. The vaccine of Claim 1, wherein the antigen is an *alpha* toxoid in a *C. perfringens alpha* toxoid supernatant.

4. The vaccine of Claim 1, wherein the antigen is a recombinant polypeptide.

5. The vaccine of Claim 1, wherein said antigen has 2 or more TCP.

6. The vaccine of Claim 1, wherein said antigen is selected from the group consisting of a *C. perfringens* Type A *alpha* toxoid and a *C. perfringens* Type C *alpha* toxoid.

7. The vaccine of Claim 1, further comprising an adjuvant.

8. The vaccine of Claim 7, wherein a water-in-oil emulsion comprises the antigen and adjuvant.

9. The vaccine of Claim 8, wherein the water-in-oil emulsion was prepared with a 70% oil phase and a 30% aqueous phase.

10. The vaccine of Claim 1, wherein the antigen is a *C. perfringens* Type *alpha* toxoid; with the proviso that only a single *C. perfringens* Type *alpha* toxoid is present in said vaccine.

11. The vaccine of Claim 10, wherein said *alpha* toxoid is comprised by a *C. perfringens alpha* toxoid supernatant.

12. The vaccine of Claim 1, which is a multivalent vaccine further comprising one or more of the following toxins: *C. perfringens beta* toxin, *C. perfringens beta 2* toxin, *C. perfringens* enterotoxin, *C. perfringens epsilon* toxin, *C. perfringens iota* toxin, *C. perfringens kappa* toxin, *C. perfringens lambda* toxin, *C. perfringens theta* toxin, *C. sordellii* hemorrhagic toxin, *C. sordellii* lethal toxin, *C. difficile* A toxin, *C. difficile* B toxin, *C. septicum alpha* toxin, *C. novyi alpha* toxin, and *C. novyi beta* toxin.

13. The vaccine of Claim 12, wherein the multivalent vaccine further comprises one or more viral antigens, one or more bacterial antigens, and one or more parasitic antigens;

wherein the one or more viral antigens is from one or more of the following sources: infectious bursal disease virus, infectious bronchitis virus, reovirus, and Newcastle disease virus;

wherein the one or more bacterial antigens is from one or more of the following sources: *E. coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter*; and

wherein the one or more parasite antigens is from *Eimeria*.

14. The vaccine of Claim 1, which is a multivalent vaccine that further comprises one or more additional antigens;

wherein the additional antigen is from one or more of the following sources: infectious bursal disease virus, infectious bronchitis virus, reovirus, Newcastle disease virus, *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Eimeria*.

15. A vaccine consisting essentially of an antigen selected from the group consisting of a single *C. perfringens* Type *alpha* toxoid, an antigenic fragment of the *alpha* toxoid, an inactive antigenic fragment of a single *C. perfringens* Type *alpha* toxin, and any combination thereof;

wherein the single *C. perfringens* Type *alpha* toxoid and the inactive antigenic fragment of the single *C. perfringens* Type *alpha* toxin are the same Type; and

wherein one to two doses of 0.25 - 0.6 mL per dose of the vaccine is sufficient to induce at least four antitoxin units (A.U.) of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera of a chicken vaccinated with the vaccine.

16. A method of providing passive immunity against multiple poultry diseases to the progeny of a female avian comprising administering the vaccine of Claim 13 to the female avian prior to her laying of the eggs that comprise the progeny; wherein the progeny are provided passive immunity from multiple diseases.

17. A method of providing passive immunity against a clostridial disease to the progeny of a female avian, said method comprising administering the vaccine of Claim 1 to the female avian prior to her laying of the eggs that comprise the progeny; wherein the progeny are provided passive immunity.

18. The method of Claim 17 wherein the avian is a chicken or a turkey.

19. The method of Claim 17 wherein the clostridial disease is a clostridial enteric disease.

20. The method of Claim 19 wherein the clostridial enteric disease is necrotic enteritis.

21. The method of Claim 17 wherein the clostridial disease is selected from the group consisting of cholangiohepatitis, gangrenous dermatitis, and cellulitis.
22. A method of making a *C. perfringens alpha* toxoid vaccine comprising:
- (a) growing a *C. perfringens* cell in a culture medium to produce a quantity of cultured cells; wherein said quantity of cultured cells secrete a *C. perfringens alpha* toxin into the cell medium;
 - (b) inactivating the secreted *alpha* toxin to produce a *C. perfringens alpha* toxoid;
 - (c) removing a majority of the quantity of cultured cells from the culture medium to form a *C. perfringens alpha* toxoid supernatant; and
 - (d) adjusting the concentration of the *C. perfringens alpha* toxoid supernatant so that it is sufficient to induce at least four antitoxin units (A.U.) of anti-*alpha* toxin antibody per mL of antisera of an avian that has been vaccinated with either one or two doses of 0.25 - 0.6 mL per dose of said vaccine.
23. The method of Claim 22, further comprising mixing the *C. perfringens alpha* toxoid supernatant with a water-in-oil emulsion.
24. The method of Claim 23, wherein the water-in-oil emulsion is prepared with 70% oil phase and 30% aqueous phase.
25. The method of Claim 24 wherein the *C. perfringens* cell is a single *C. perfringens* Type cell.
26. The method of Claim 25 wherein said single *C. perfringens* Type cell is selected from the group consisting of a *C. perfringens* Type A cell and a *C. perfringens* Type C cell.

00153

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/014669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/08 A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 292 307 A (ZEMLYAKOVA ET AL) 29 September 1981 (1981-09-29) cited in the application column 4, lines 60-68 column 5, lines 1-48	1-12,22
Y	column 5, lines 45-47 ----- -/--	8,9, 23-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the International filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 August 2006

Date of mailing of the international search report

11/09/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Domingues, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/014669

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOVLAND ATLE ET AL: "Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers." AVIAN PATHOLOGY, vol. 33, no. 1, February 2004 (2004-02), pages 83-92, XP009071423 ISSN: 0307-9457 cited in the application page 84 pages 86-7	1-21
Y	page 84, paragraph 6	9
X	WO 93/23543 A (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE OF THE UNITED K) 25 November 1993 (1993-11-25) page 3, paragraph 3 page 4, paragraph 2 pages 12-14	1-8, 15
X	STEVENS DENNIS L ET AL: "Immunization with the C-domain of alpha-toxin prevents lethal infection, localizes tissue injury, and promotes host response to challenge with Clostridium perfringens" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 190, no. 4, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 767-773, XP002396053 ISSN: 0022-1899 the whole document	1-8, 15
X	SCHOEPE H ET AL: "Naturally occurring clostridium perfringens nontoxic alpha-toxin variant as a potential vaccine candidate against alpha-toxin-associated diseases" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 69, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 7194-7196, XP002964080 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-4, 15
Y	AUCOUTURIER JEROME ET AL: "Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 1, no. 1, June 2002 (2002-06), pages 111-118, XP002262967 ISSN: 1476-0584 the whole document	8, 9, 23-26
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/014669

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	SCHOEPE ET AL: "Immunization with an alphatoxin variant 121A/91-R212H protects mice against Clostridium perfringens alphatoxin" ANAEROBE, LONDON, GB, vol. 12, no. 1, February 2006 (2006-02), pages 44-48, XP005198292 ISSN: 1075-9964 the whole document	1-21
E	WO 2006/041933 A (DIVERSA CORPORATION; HICKLE, LESLIE; ANDERSON, ABRAHAM; BROWN, ROBERT,) 20 April 2006 (2006-04-20) page 22, paragraph 95 examples 2,3	1-21

0056

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/014669

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4292307	A	29-09-1981	SU 627610 A1	05-02-1980
			SU 627612 A1	05-02-1980
WO 9323543	A	25-11-1993	AT 226635 T	15-11-2002
			AU 671838 B2	12-09-1996
			AU 4334293 A	13-12-1993
			CA 2136230 A1	25-11-1993
			CN 1084407 A	30-03-1994
			DE 69332434 D1	28-11-2002
			DE 69332434 T2	26-06-2003
			DK 642581 T3	17-02-2003
			EP 0642581 A1	15-03-1995
			ES 2185631 T3	01-05-2003
			GB 2283020 A	26-04-1995
			IL 105763 A	20-11-2005
			JP 7506725 T	27-07-1995
			JP 3370672 B2	27-01-2003
			MX 9302964 A1	31-01-1995
			NZ 253189 A	27-08-1996
			PT 642581 T	31-03-2003
			US 5817317 A	06-10-1998
WO 2006041933	A	20-04-2006	NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2006/014669

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

DAVIS, Michael, D.
Schering Corporation
2000 Galloping Hill Road
Patent Department K-1-6 1990
Kenilworth, New Jersey 07033
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 14 July 2006 (14.07.2006)	
Applicant's or agent's file reference AH06333	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2006/014669	International filing date (day/month/year) 17 April 2006 (17.04.2006)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 18 April 2005 (18.04.2005)
Applicant SCHERING-PLOUGH LTD. et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
18 April 2005 (18.04.2005)	60/672,289	US	04 July 2006 (04.07.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 89 65
Telephone No. +41 22 338 97 20

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		158
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/08, A61P 31/04		
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) SCHERING-PLOUGH LTD.		
(30) Prioridad	(31) No. 60/672,289	32) Fecha 18/04/05	(33) Pais US	(72) Inventor(es) JAYAPPA, Huchappa y O'CONNELL, Kevin
				(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 18/11/07		(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 26/10/06	
	Fecha de presentación de la solicitud: 17/04/06		N° publicación: WO/2006/113772	
	No. de solicitud PCT/US2006/014669			
(54) Título: VACUNA DE TOXOIDE DE C. PERFRINGENS ALFA				

Reivindicación(es):

1. Una vacuna que comprende un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un toxoide alfa de C. perfringens, un fragmento antigénico de un toxoide alfa de C. perfringens, un fragmento antigénico inactivo de una toxina alfa de C. perfringens, y cualquier combinación de los anteriores;
donde una a dos dosis de 0,25 a 0,6 ml cada una de la vacuna son suficientes para inducir por lo menos cuatro unidades de antitoxina (A. U.) de anticuerpo antitoxina alfa, por ml de antisero de un pollo vacunado con la vacuna.

MODELO DE UTILIDAD []

- [[
[[
[[
[[
[[

INCOMPLETA []

[.]

- []
[]
[]
[]

INCOMPLETA []

1

- $$\begin{aligned} & \{ \cdot \} ; \\ & [\quad] \\ & [\cdot] . \\ & [\quad] : \end{aligned}$$

INCOMPLETA []

~~Responsible~~

Fecha _____



arrera 13 No. 27-00 Plso 5, 7 y 10

Commutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: Info@slc.gov.co

www.slcc.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia