VACUNA DE *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* Y MÉTODOS PARA PRODUCIRLA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] Esta invención pertenece al campo de las vacunas clostridiales para rumiantes.

ANTECEDENTES

[0002] La miositis clostridial (carbunco sintomático) provocada por *Clostridium chauvoei* es una enfermedad extremadamente importante desde un punto de vista económico en ovejas y ganado bovino. El *Clostridium chauvoei* es un bacilo anaeróbico grampositivo formador de esporas. Sus esporas se encuentran muy extendidas en el suelo y el abono, y luego de ser ingeridas pueden atravesar la mucosa intestinal, entrar en el torrente circulatorio y llegar a los músculos esqueléticos. Las esporas se encuentran latentes hasta que un traumatismo localizado en el músculo, el que más a menudo se produce en el ganado bovino por contusiones durante su manipulación en un corredor o por traumatismo en corrales de engorde atestados, lo que produce daño muscular y anoxia e hipoxia localizada.

[0003] Actualmente, lo que se sabe de la patogenicidad de *C. chauvoei* revela que las toxinas, una desoxirribonucleasa hialuronidasa, sialidasa y flagelos representan los factores de virulencia principales. Entre las toxinas propuestas, se demostró que la toxina A de *C. chauvoei* (CctA) representa la actividad hemolítica y citotóxica principal de *C. chauvoei.*

[0004] Además de la toxina CctA, sialidasa NanA y hialuronidasa NagH parecen facilitar que C. *chauvoei* migre desde el sitio inicial de infección, el cual generalmente se cree que se encuentra en la cavidad oral o las vías respiratorias, u ocasionalmente en lesiones de la piel, e ingrese en el tejido molecular donde la bacteria se puede replicar y provocar mionecrosis.

[0005] En general, no existe un tratamiento eficaz para ganado bovino con carbunco sintomático y la muerte se produce rápidamente. La prevención es el mejor enfoque. La vacunación contra las toxinas clostridiales y el mantenimiento de un entorno seguro son críticos.

[0006] Las vacunas contra el carbunco sintomático consisten en bacterias químicamente inactivadas que proporcionan proteínas de membrana externa y proteínas de flagelos propuestas como inmunógenos y sobrenadantes de cultivo bacteriano que se espera que contengan las toxinas principales. Recientemente, se ha demostrado que la toxina CctA sola, la cual se conserva entre cepas de *C. chauvoei* aisladas en todo el mundo y se prepara mediante tecnología de genes recombinantes, proporcionó una protección eficaz en un modelo de infección de cobayas que se usa como evaluación biológica de la potencia en el procedimiento de distribución de lotes de vacunas comerciales.

[0007] A pesar de que hay gran cantidad de bibliografía sobre el carbunco sintomático, los hallazgos científicos sobre la vacunación contra *C. chauvoei* para prevenir enfermedades y la letalidad en el ganado bovino son escasos. Uzal et ál. reconocieron que existen pocas a moderadas pruebas de la eficacia de las vacunas de *C. chauvoei* para prevenir la infección con este microorganismo en ganado

bovino. Ver *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* marzo de 2012; 28(1):71-7, viii. Por consiguiente, son necesarias en la técnica vacunas adicionales capaces de proteger a rumiantes contra las infecciones por C. *chauvoei*.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

[0008] En un primer aspecto, la divulgación proporciona una vacuna contra *Clostridium chauvoei,* la cual comprende un componente de *C. chauvoei* y una proteína cctA adicional.

[0009] En modalidades diferentes de este primer aspecto, una dosis de dicha vacuna contiene al menos alrededor de 3,5 µg de dicha proteína cctA adicional y de 0,025 a 0,148 RU de flagelos. En determinadas modalidades preferidas, la vacuna de acuerdo con el primer aspecto de la invención contiene alrededor de 0,074 RU de dichos flagelos y alrededor de 5 µg de dicha proteína cctA adicional. En la vacuna de acuerdo con cualesquiera modalidades del primer aspecto, la proteína cctA se produce a partir del sobrenadante de *C. chauvoei* cultivada y/o el componente de *C. chauvoei* es una vacuna bacteriana, un extracto de célula entera, un extracto de célula parcial o una combinación de estos.

[0010] En un segundo aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar una vacuna contra la infección por *C. chauvoei*, dicho método comprende

a. cultivar *C. chauvoei;*

b. recoger medios de cultivo;

c. concentrar *C. chauvoei* de dichos medios de cultivo;

d. concentrar cctA de dichos medios de cultivo y

e. combinar dicha cctA concentrada con *C. chauvoei*.

[0011] En determinadas modalidades, el método comprende el paso de microfiltrado de dichos medios de cultivo para obtener un residuo de diálisis microfiltrado y un producto de penetración microfiltrado.

[0012] En determinadas modalidades de acuerdo con este segundo aspecto de la invención, el paso de cultivo de *C. chauvoei* se puede llevar a cabo en un medio de cultivo que comprende una peptona de origen vegetal, una peptona de origen animal o una combinación de estas.

[0013] En determinadas modalidades, el paso de concentración de dicha cctA a partir de dichos medios de cultivo comprende:

a. la ultrafiltración de dicho producto de penetración microfiltrado para obtener un residuo de diálisis ultrafiltrado, seguido de

b. la diafiltración para obtener un residuo de diálisis diafiltrado, seguido de

c. la filtración estéril para obtener una solución estéril de dicha proteína cctA adicional.

[0014] En determinadas modalidades, la ultrafiltración comprende el pasaje de dicho producto de penetración microfiltrado a través de un casete de 10 kDa. En determinadas modalidades, la diafiltración comprende el pasaje de dicho residuo de diálisis ultrafiltrado a través de un casete de

10 kDA y/o a la diafiltración la sigue una filtración estéril del residuo de diálisis diafiltrado a través de un filtro de 0,2 µm para preparar la solución estéril de una proteína cctA adicional.

[0015] Preferentemente, en el método de acuerdo con cualquiera de las modalidades de este segundo aspecto de la invención, el producto de diálisis microfiltrado se diafiltra para obtener el componente de *C. chauvoei*.

[0016] En la modalidad más preferida, se combinan al menos una parte del componente de *C. chauvoei* y al menos una parte de la solución estéril de la proteína cctA adicional.

[0017] En el tercer aspecto, la divulgación proporciona una vacuna preparada de acuerdo con cualesquiera modalidades del segundo aspecto de la invención, en donde una dosis de dicha vacuna contiene al menos 3,5 µg de dicha proteína cctA concentrada.

[0018] En determinadas modalidades del tercer aspecto, una dosis de la vacuna contiene alrededor de 0,074 a 0,148 RU de dichos flagelos. Preferentemente, una dosis contiene alrededor de 5 µg de dicha cctA concentrada e incluso más preferentemente, una dosis contiene alrededor de 5 µg de dicha cctA concentrada y alrededor de 0,074 Ru de dichos flagelos.

[0019] En determinadas modalidades, la vacuna puede contener al menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste en antígenos de *Clostridium septicum, Clostridium haemolyticum, Clostridium novyi, Clostridium sordellii, Clostridium tetani, Clostridium perfringens* tipos C y D, *Erysipelothrix rhusiopathiae, Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo, Leptospira *interrogans* serovar Pomona y *Mannheimia haemolytica*. En determinadas modalidades, dicho al menos un antígeno adicional es un toxoide o cultivo inactivado. En cualesquiera modalidades de este tercer aspecto, la vacuna puede ser una vacuna no potenciada o puede comprender un adyuvante.

[0020] En el cuarto aspecto, la divulgación proporciona un método para prevenir la infección por *C. chauvoei* en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de la vacuna de acuerdo con cualquiera de las modalidades del primer o el tercer aspecto de la invención. En determinadas modalidades de este cuarto aspecto, dicho sujeto es un sujeto bovino o un sujeto ovino.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0021] La Figura 1 es una ilustración esquemática de un proceso para preparar el componente de *C. chauvoei* y la cctA concentrada para la preparación de la vacuna de acuerdo con determinadas modalidades de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0022] Se proporcionan las siguientes definiciones no taxativas para comprender mejor la invención.

[0023] La frase «una vacuna que comprende proteína cctA adicional» hace referencia a una vacuna que contiene un componente de *C. chauvoei* a la que se agregó proteína cctA purificada o parcialmente purificada adicional. Por lo tanto, en la vacuna que comprende una proteína cctA adicional, la relación de cctA a flagelos (un sustituyente de la cantidad de *C. chauvoei)* será mayor que dicha relación en

una vacuna que carece de cctA adicional. En determinadas modalidades, la relación de cctA a flagelos es al menos 50 % mayor, o al menos 100 % mayor, o al menos 300 % mayor, al menos 500 % mayor, al menos 1000 % mayor, al menos 1500 % mayor o al menos 2000 % mayor.

[0024] La expresión «alrededor de», como se aplica a un número de referencia, hace referencia al número más o menos 10 por ciento de dicho valor.

[0025] La expresión «vacuna bacteriana» hace referencia a una suspensión de bacterias inactivadas.

[0026] La expresión «componente de *C. chauvoei*» hace referencia a una vacuna bacteriana de *C. chauvoei*, un extracto de células enteras de *C. chauvoei*, un extracto de células parciales de C. *chauvoei* o cualquier combinación de estos.

[0027] Tal como se usa en la presente, el término «cultivo» significa una población de células o microorganismos que crece en ausencia de otras especies o tipos.

[0028] «Dosis» hace referencia a una vacuna o composición inmunogénica que se administra a un sujeto. Una «primera dosis» o «dosis de primovacunación» hace referencia a la dosis de una composición tal que se administra en el Día 0. Una «segunda dosis», «tercera dosis» o «dosis anual» hace referencia a una cantidad de dicha composición que se administra después de la primera dosis, la cual puede ser, aunque no necesariamente, la misma composición inmunogénica o vacuna que la primera dosis.

[0029] El «lisado» hace referencia al producto de lisis que es la desintegración de una célula mediante la ruptura de la membrana o pared celular. Es posible lograr la desintegración mediante medios mecánicos o químicos conocidos en la técnica.

[0030] La expresión «extracto de células parciales» hace referencia a una fracción del extracto de células enteras, en donde el extracto puede provocar una respuesta inmunitaria que es aproximadamente la misma que la respuesta inmunitaria provocada por el extracto de células enteras. Preferentemente, el extracto de células parciales comprende una fracción de membrana celular y/o pared celular. El extracto de células parciales no incluye cctA purificada y/o concentrada.

[0031] Tal como se usan en la presente con respecto a una vacuna u otra composición, «protección», «inmunidad protectora» y similares significan que la vacuna o composición evita o reduce los síntomas de la enfermedad provocada por el organismo del cual se derivan el antígeno o antígenos usados en la vacuna o composición. Los términos «protección» y similares también significan que es posible usar la vacuna o composición para tratar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad que ya se encuentra presente en un sujeto.

[0032] Una «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a una cantidad de un antígeno o vacuna que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto que recibe el antígeno o vacuna que es adecuada para prevenir o reducir cualesquiera signos o síntomas de una enfermedad, lo que incluye efectos adversos de salud o complicaciones de estos, provocados por una infección con un patógeno,

tal como un virus o una bacteria. Es posible inducir inmunidad humoral, inmunidad mediada por células o tanto inmunidad humoral como mediada por células. La respuesta inmunogénica de un animal a una vacuna se evalúa, p. ej., indirectamente a través de la medida de concentraciones de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos o directamente a través del seguimiento de signos y síntomas después de la exposición con una cepa de tipo salvaje. La inmunidad protectora conferida por una vacuna se evalúa mediante la medida, p. ej., de la reducción de signos clínicos tales como mortalidad, morbilidad, temperatura, condición física general y salud general y desempeño del sujeto. La cantidad de vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con el adyuvante particular usado, el antígeno usado o la condición del sujeto, y un experto en la técnica la puede determinar.

[0033] «Tratar» hace referencia a prevenir un trastorno, afección o enfermedad al cual se aplica dicho término, o a prevenir o reducir uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

[0034] Tal como se usan en la presente, «vacuna» o «composición de vacuna» hacen referencia a una composición inmunogénica que contiene los antígenos y puede producir una respuesta inmunitaria específica contra el antígeno. La administración de la vacuna a un sujeto provoca una respuesta inmunitaria protectora, la cual puede ser completamente protectora o parcialmente protectora. La vacuna se puede introducir directamente en el sujeto mediante cualquier vía de administración conocida, lo que incluye la administración parenteral, oral y similar. Los términos significan una composición que previene o reduce una infección, o que previenen o reducen uno o más signos o síntomas de infección. Usualmente, los efectos de protección de una composición de vacuna contra un patógeno se logran mediante la inducción de una respuesta inmunitaria en el sujeto. En términos generales, las incidencias eliminadas o reducidas de infección, la mejora de los signos o síntomas, o la eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicios de los efectos de protección de una composición de vacuna.

[0035] Tal como se usa en la presente, «aceptable desde un punto de vista veterinario» hace referencia a sustancias que, de acuerdo con el juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos veterinarios sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas y similares, conforme con una relación de beneficio a riesgo razonable y eficaz para su uso pretendido.

[0036] Un «vehículo veterinariamente aceptable», tal como se usa en la presente, hace referencia a un medio vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio activo y no es tóxico para el sujeto veterinario al que se le administra.

[0037] Las expresiones «extracto de células enteras» o «extracto de organismos enteros» y similares hacen referencia a un lisado celular, lo que incluye un lisado de células bacterianas, p. ej., un lisado de células de *C. chauvoei*.

[0038] La presente divulgación se basa en descubrimientos inesperados de que es posible concentrar cctA del sobrenadante de *C. chauvoei* cultivada, que la adición de esta cctA concentrada al componente

de *C. chauvoei* proporciona una vacuna más eficaz que *C. chauvoei* sola y que la cantidad de componente de *C. chauvoei* por dosis se puede reducir sin sacrificar la eficacia de la vacuna si la vacuna contiene proteína cctA adicional.

[0039] Por consiguiente, en el primer aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende un componente de *Clostridium chauvoei* y también comprende proteína cctA adicional.

[0040] *Componente de C. chauvoei*

[0041] En determinadas modalidades, el compuesto de *C. chauvoei* es una vacuna bacteriana. En otras modalidades, *C. chauvoei* es un extracto de células enteras. En incluso otras modalidades, *C. chauvoei* es un extracto de células parciales. Preferentemente, el extracto de células parciales comprende una fracción de membrana de *C. chauvoei* y/o una fracción de pared celular de *C. chauvoei*. También son posibles combinaciones diferentes de estas modalidades.

[0042] De acuerdo con la divulgación, se cuantifica la cantidad de componente de *C. chauveoei* con unidades relativas (RU) de flagelos. Por lo tanto, el uso de RU de flagelos es un sustituto de la cantidad de *C. chauvoei.* Sin embargo, se debe entender que es posible usar otras proteínas como sustitutos para la cuantificación de la cantidad de componente de *C. chauveoei*.

[0043] Se conocen múltiples métodos para preparar un componente de *C. chauvoei*. Por ejemplo, es posible inactivar *C. chauvoei* cultivada y obtenida con formalina, betapropriolactona (BPL) o etilenimina binaria (BEI), u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

[0044] Los extractos de células enteras se pueden preparar mediante la ruptura de la pared celular y la membrana celular de las bacterias. Esto se puede lograr mediante varios medios, los que incluyen medios químicos y físicos. Por ejemplo, es posible lisar las bacterias con amortiguador hipotónico, liofilización y/o centrifugación. Los extractos de células parciales se pueden obtener, por ejemplo, mediante la ultracentrifugación de la preparación de *C. chauvoei*.

[0045] Ejemplos no taxativos de preparaciones adecuadas de *C. chauvoei* incluyen productos actualmente disponibles como un componente de vacunas comercialmente disponibles que incluyen, de modo no taxativo, ONE SHOT ULTRA® 8 o ULTRAVAC® 7 IN 1 de Zoetis.

[0046] En determinadas modalidades, el componente de *C. chauvoei* es una vacuna bacteriana preparada mediante el cultivo de *C. chauvoei,* seguido de la inactivación con formalina. Luego, la suspensión que contiene *C. chauvoei* se microfiltra a través de un casete de 0,2 µm y después se diafiltra con solución salina a través de casetes de microfiltración de 0,2 µm.

[0047] *Proteína cctA adicional*

[0048] La proteína cctA de acuerdo con la invención comprende la SEQ ID NO: 1:

1 mikrilmlal atttifsltl pfsykavqaq entcivetps egvktftssd tayadyncfk

61 tnlsvtfied qhnnqltalv stegsfipsg lsrvggyyqa dmywpskyyt tlttydrnnr

121 vkitksiptn qidtvsvset mgysiggsls ieygkegpka gggingsyta qrsvtydqpd

181 yrtllmkdsv nsaswevafn atkdgydrds yhgiygnqlf mryrlyntgi nnlttdnnls

241 slivggfspk vvialtapkg teestvkvey nrfndqyrlr wsgtewygen nrnsridsss

301 esfilnwknh tvehagy

o una proteína que es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 y puede ser al menos el 91 %, o al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, los aminoácidos diferentes entre la secuencia de cctA y la SEQ ID NO: 1 son sustituciones y más preferentemente, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 % de estas sustituciones son sustituciones conservativas.

[0049] Los expertos en la técnica reconocerán que las alteraciones de la secuencia de ácido nucleico que provocan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifican pueden afectar poco la estructura tridimensional resultante de la proteína, si la afectan. Por ejemplo, es posible sustituir un codón para el aminoácido alanina, un aminoácido hidrófobo, con un codón que codifica otro residuo menos hidrófobo, tal como glicina, o un residuo más hidrófobo, tal como valina, leucina o isoleucina. De manera similar, también se puede esperar que los cambios que provocan la sustitución con un residuo con carga negativa de otro residuo, tal como ácido aspártico por ácido glutámico, o con un residuo de carga positiva por otro, tal como lisina por arginina, produzcan una proteína que tiene sustancialmente la actividad funcional.

[0050] Cada uno de los seis grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas usuales unos de otros: [1] Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); [2] Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); [3] Asparagina (N), Glutamina (Q); [4] Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); [5] Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y [6] Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W), (vea, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense 20100291549).

[0051] La proteína cctA de *C. chauvoei* se puede preparar mediante múltiples métodos, los que incluyen la purificación de proteínas cctA del sobrenadante de *C. chauvoei* modificado, modificación genética y/o síntesis química. Estos métodos son conocidos en la técnica.

[0052] A los efectos de esta divulgación, se determina la cantidad de componente de *C. chauvoei* en una dosis de una vacuna mediante la cantidad de flagelos medida en unidades relativas o RU. Una única dosis de una vacuna sin cctA adicional contiene alrededor de 0,148 RU de flagelos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen otros métodos para determinar la cantidad de compuesto de *C. chauvoei* y es posible convertir los resultados finales de estos métodos en RU de flagelos.

[0053] En las vacunas descritas en la presente y que comprenden una proteína cctA adicional, la relación de cctA a flagelos será mayor que dicha relación en una vacuna que carece de cctA adicional. En determinadas modalidades, la relación de cctA a flagelos es al menos el 50 % mayor,

preferentemente, al menos el 75 % mayor, al menos el 100 % mayor, al menos el 150 % mayor, al menos el 200 % mayor, al menos el 250 % mayor, al menos el 300 % mayor, al menos el 350 % mayor y sucesivamente en comparación con una composición que comprende el componente de *C. chauvoei*, pero carece de la proteína cctA agregada.

[0054] En determinadas modalidades, la vacuna de acuerdo con la invención contiene de alrededor de 3,5 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o más, y puede contener hasta 30 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis y en modalidades diferentes, la vacuna puede contener de 3,5 a alrededor de 4 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis, o 3,5 a alrededor de 6 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o 3,5 a alrededor de 9 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o 3,5 a 10 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o 3,5 a alrededor de 15 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o 3,5 a alrededor de 20 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o 3,5 a alrededor de 25 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o 3,5 a alrededor de 30 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 4 a alrededor de 30 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 4 a alrededor de 25 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 4 a alrededor de 20 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 4 a alrededor de 15 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 4 a alrededor de 10 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 4 a alrededor de 8 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 4 a alrededor de 6 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis o alrededor de 5 µg de dicha proteína cctA adicional por dosis.

[0055] La adición de cctA al componente de *C. chauvoei* permite reducir la dosis del componente de alrededor de 0,148 RU de flagelos a alrededor de 0,1 RU de flagelos o incluso menos, p. ej., a alrededor de 0,074 RU de flagelos, o alrededor de 0,05 RU de flagelos.

[0056] Se debe entender que cantidades mayores de cctA permitirían cantidades menores de componentes de *C. chauvoei*. En términos prácticos, la adición de 0,1 µg de cctA resultará en la reducción de componente de *C. chauvoei* en alrededor de 0,00175 RU de flagelos. Preferentemente, la cantidad de flagelos es mayor o igual a alrededor de 0,025 RU por dosis, más preferentemente, mayor o igual a 0,055 RU por dosis y más preferentemente, mayor o igual a 0,060 RU, o mayor o igual a 0,65 RU o mayor o igual a 0,070 RU, o mayor o igual a 0,074 RU por dosis.

[0057] *Método para producir la vacuna*

[0058] En el segundo aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar una vacuna contra la infección por *C. chauvoei*. Por lo general, cuando se cultiva *C. chauvoei* para fabricar la vacuna, se descarta sobrenadante que contiene cctA. Sin embargo, los inventores descubrieron que la vacuna se puede producir mediante un método que emplea la concentración de cctA del sobrenadante, dicho método comprende:

a. cultivar *C. chauvoei;*

b. recoger medios de cultivo;

c. concentrar *C. chauvoei* de dichos medios de cultivo,

d. concentrar cctA de dichos medios de cultivo y

e. combinar dicha cctA concentrada con *C. chauvoei*.

[0059] En determinadas modalidades, se cultiva *C. chauvoei* en medios que contienen peptona, que es un producto de la hidrólisis de proteína. En determinadas modalidades, la peptona puede ser de origen vegetal (p. ej., peptona de soja) o de origen animal (p. ej., peptona cárnica o peptona de caseína) o cualquier combinación de estas. En un conjunto de modalidades preferidas, la peptona es peptona de soja.

[0060] En modalidades diferentes, la concentración de la peptona en el medio de cultivo es alrededor de 20 g/L a alrededor de 100 g/L, p. ej., alrededor de 30 g/L o 40 g/L, o alrededor de 50 g/L, o alrededor de 60 g/L, o alrededor de 70 g/L, o alrededor de 80 g/L o alrededor de 90 g/L. En determinadas modalidades, la concentración es alrededor de 25 a alrededor de 75 g/L y más preferentemente, alrededor de 45 a alrededor de 55 g/L.

[0061] Es posible concentrar *C. chauvoei* mediante microfiltración seguida de diafiltración. En determinadas modalidades, la microfiltración se logra mediante el pasaje de la solución a través de casetes de 100 000 kDa a 0,45 µm y posteriormente, se diafiltra a través de casetes de 100 000 kDa a 0,45 µm para preparar el componente de *C. chauvoei*. Por ejemplo, los casetes usados para los pasos de microfiltración y diafiltración pueden ser independientemente de 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,45 µm. En determinadas modalidades, tanto los casetes de microfiltración como de diafiltración son de 0,2 µm.

[0062] De modo beneficioso, el método para preparar el componente de *C. chauvoei* y el método para preparar la solución de cctA concentrada (o enriquecida) puede iniciar con un paso común de microfiltración, preferentemente a través del casete de 0,2 µm. Después del paso de microfiltración, se diafiltra el residuo de filtración microfiltrado y se prepara el componente de *C. chauvoei*. Entonces, se ultrafiltra el producto de penetración a través de un casete para obtener el residuo de filtración ultrafiltrado y luego se diafiltra el residuo de filtración tal como se describió anteriormente para obtener el residuo de filtración diafiltrado, y así se prepara la solución de cctA. Vea la Figura 1.

[0063] El tamaño de cctA es de alrededor de 32 kDa. Por consiguiente, los casetes usados para concentrar cctA deberían ser de menos de 32 kDa. En determinadas modalidades, los casetes son de 30 kDa, 20 kDa, 10 kDa o 5 kDa. En el método de acuerdo con la invención, es preferible usar casetes de 10 kDa en este paso.

[0064] En determinadas modalidades, el paso de concentración de dicha cctA de dichos medios de cultivo comprende la ultrafiltración para obtener un residuo de diálisis diafiltrado, seguido de la diafiltración para obtener un residuo de diálisis diafiltrado, seguido de la filtración estéril para obtener

una solución estéril. Estos procedimientos son conocidos en la técnica.

[0065] La ultrafiltración es una variedad de filtración de membranas en la cual fuerzas como presión o gradientes de concentración llevan a una separación a través de una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y solutos de peso molecular elevado se retienen (residuo de diálisis), al tiempo que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana (producto de penetración). Este proceso particular se usa para purificar y concentrar compuestos con peso molecular elevado de 10^3 a 10^6 Da, en particular, proteínas. En general, la ultrafiltración se define por el umbral de peso molecular de la membrana que se usa en el proceso.

[0066] La diafiltración es un tipo especializado de proceso de ultrafiltración en el que el residuo de diálisis se diluye con un amortiguador tal como solución salina, PBS o agua y se volvió a ultrafiltrar para reducir la concentración de componentes producto de penetración solubles y mantener la concentración de componentes retenidos. Es posible usar casetes del mismo tamaño, tal como, por ejemplo, 10 kDa, tanto para ultrafiltración como diafiltración.

[0067] En determinadas modalidades preferidas, después de los pasos de ultrafiltración y diafiltración, se somete la cctA a filtración estéril. La solución de cctA filtrada estéril se puede agregar al componente de *C. chauvoei* para preparar la composición inmunogénica o vacuna que se describe en la presente.

[0068] *Vacunas y composiciones inmunogénicas*.

[0069] Las vacunas y composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención pueden contener otros antígenos, además de la composición del componente de *C. chauvoei* y la proteína cctA adicional. Los antígenos particularmente preferidos se derivan de patógenos que afectan a rumiantes. En determinadas modalidades, los antígenos se derivan de los seleccionados del grupo que consiste en antígenos *Clostridium septicum, Clostridium haemolyticum, Clostridium novyi, Clostridium sordellii, Clostridium tetani, Clostridium perfringens* de tipos C y D, *Erysipelothrix rhusiopathiae, Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo, Leptospira *interrogans* serovar Pomona y *Mannheimia haemolytica*.

[0070] Preferentemente, estos antígenos son organismos inactivados, un organismo atenuado, un toxoide de vacuna bacteriana o extractos de organismos enteros o extractos de organismos parciales.

[0071] Las vacunas y las composiciones inmunogénicas también pueden contener adyuvantes. Se conocen múltiples adyuvantes en la técnica. Los adyuvantes adecuados incluyen emulsiones oleosas (lo que incluye una emulsión de aceite en agua, de agua en aceite y de agua en aceite en agua), compuestos de alumbre, lo que incluye tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio, saponinas triterpenoides, complejos inmunoestimulantes, compuestos de amina cuaternaria (p. ej., sales de dimetildioctadecilamonio, p. ej., bromuro), oligonucleótidos que contienen CpG, oligorribonucleótidos, glucolípidos como N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida, también conocida como BAY®1005, y sales de esta (p. ej., el acetato), dextrano DEAE y combinaciones de estos.

[0072] En determinadas modalidades, el adyuvante contiene un complejo formado por Quil A (una saponina triterpenoide) y un esterol (p. ej., colesterol) en una emulsión de aceite en agua formada por un aceite mineral y lecitina conocido como PREZENT-A®. En otras modalidades, el adyuvante comprende una saponina triterpenoide y CpG. En incluso otras modalidades, el adyuvante comprende una mezcla de un oligonucleótido de CpG, una saponina triterpenoide y el esterol.

[0073] Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención pueden incluir uno o más vehículos aceptables desde un punto de vista veterinario como disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros conocidos por los expertos en la técnica. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros conocidos por el experto en la técnica. Los conservantes incluye mertiolato, entre otros conocidos por el experto en la técnica. Los antibióticos incluyen, de modo no taxativo, aquellos de las clases de aminoglucósidos, fármacos carbapenémicos, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

[0074] *Formas, dosis y vías de administración*

[0075] Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención se pueden administrar a animales para inducir una respuesta inmunitaria eficaz contra la infección por *C. chauvoei*. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para estimular una respuesta inmunitaria eficaz contra la infección por *C. chauvoei* mediante la administración a un animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica o vacuna de la presente invención que se describe en la presente.

[0076] Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención se pueden producir de varias formas que dependen de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas y vacunas se pueden producir en la forma de soluciones acuosas estériles o dispersiones adecuadas para uso inyectable. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas también se pueden producir en forma de suspensiones o emulsiones.

[0077] Las composiciones inmunogénicas y vacunas comprenden en general un vehículo aceptable desde un punto de vista veterinario en un volumen de alrededor de 0,5 ml a alrededor de 5 ml. En otra modalidad, el volumen del vehículo es de alrededor de 1 ml a alrededor de 4 ml, o de alrededor de 2 ml a alrededor de 3 ml. En otra modalidad, el volumen del vehículo es de alrededor de 1 ml, de alrededor de 2 ml o de alrededor de 5 ml. Los vehículos aceptables desde un punto de vista veterinario para uso en composiciones inmunogénicas y vacunas pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente en la presente.

[0078] De acuerdo con los métodos de la presente invención, es posible administrar una única dosis a animales o, de manera alternativa, se pueden producir dos o más inoculaciones con intervalos de alrededor de dos a alrededor de 26 semanas, p. ej., 3 semanas, 4, semanas, 5 semanas, 6 semanas, 10 semanas, 15 semanas, 20 semanas o 25 semanas. Pueden ser necesarios tratamientos de refuerzo y es posible ajustar la pauta de administración para obtener una inmunización óptima. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la pauta de administración óptima.

[0079] Las composiciones inmunogénicas y vacunas se pueden administrar directamente al torrente sanguíneo, al músculo o a un órgano interno. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen la vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores con aguja (lo que incluye microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

[0080] Las formulaciones parenterales suelen ser soluciones acuosas que pueden contener excipientes como sales, carbohidratos y agentes amortiguadores (preferentemente, hasta un pH de alrededor de 3 a alrededor de 9, de alrededor de 4 a alrededor de 8, de alrededor de 5 a alrededor de 7,5, de alrededor de 6 a alrededor de 7,5, o de alrededor de 7 a alrededor de 7,5), pero para algunas aplicaciones, se pueden formular de manera más adecuada como una solución no acuosa estéril o como una forma seca que se puede usar en conjunto con un vehículo adecuado tal como agua estéril sin pirógenos.

[0081] Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación demorada, sostenida, repetida, controlada, dirigida y programada. Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas y/o vacunas de la invención se pueden formular como sólidos, semisólidos o líquidos tixotrópicos para administración como un depósito implantado con liberación modificada del compuesto activo. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen catéteres recubiertos con fármaco y microesferas de ácido poli(dl-táctico-coglucólico) (PGLA).

[0082] Los ejemplos siguientes se presentan como modalidades ilustrativas, pero no se debería interpretar que limitan el alcance de la invención. Múltiples cambios, variaciones, modificaciones y otros usos y aplicaciones de esta invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Método de producción de *Clostridium chauvoei* para flagelos y antígenos de cctA

[0083] Se preparó medio de concentración cuádruple como escala de inóculo y para la producción de antígeno. Se agregaron 200 g/L de peptona de soja y 20 g/L de extracto de soja a agua destilada a 50° ± 5°C y se mezclaron hasta su disolución. Se preparó una solución de 400 g/L de sulfato de

magnesio y se agregó volumen suficiente a la solución de extracto de levadura y peptona disuelta para obtener una concentración de 2,0 g/L de sulfato de magnesio. El medio de concentración cuádruple se lleva a concentración simple con agua destilada. Se ajustó el pH a 7,4 a 7,5 con solución de hidróxido de sodio. Se calentó el medio hasta un mínimo de 121 °C durante un mínimo de 30 minutos para esterilizarlo.

[0084] Se agregó una solución estéril de HCl cisteína al 10 % y ácido ascórbico al 5 % al medio base para obtener las concentraciones de finales de 0,05 % de HCl cisteína y 0,025 % ácido ascórbico y suficiente solución de glucosa estéril al 50 % para obtener una concentración de glucosa final del 0,2 % para preparar el medio final (PYE).

[0085] Se resuspendió una ampolla liofilizada de *Clostridium chauvoei* (cepa CH3) en medio de carne cocida de Robertson estéril y se usó para inocular tubos de ensayo que contenían el medio de carne cocida de Robertson complementado con HCl cisteína al 0,05 %, ácido ascórbico al 0,025 % y glucosa al 0,2 %. El cultivo de paso 1 de inóculo se incubó hasta que se enturbió mucho y se inoculó con inóculo al 2 % v/v en medio PYE (paso 2 del inóculo). El paso 2 de inóculo se incubó hasta que se enturbió en gran medida. Luego, se inoculó un fermentador con 5 % v/v de cultivo del cultivo de etapa 2 del inóculo. Se mantuvo la temperatura a 37 °C. Se permitió que el pH se redujera a pH 6,5 y se ajustó el controlador a pH 6,8. Luego del reajuste de pH, se agregó 50 % de la glucosa durante las 5 horas siguientes a una velocidad de 7,2 mL/L de cultivo/h. El cultivo se completó cuando el nivel de glucosa fue cero o cuando el cultivo llegó a una fase estacionaria. El cultivo se inactivó mediante la adición de 0,8 % v/v de formalina. El pH se ajustó a 6,8 o 6,9 y el cultivo en formol se incubó a 37 °C durante 7 días. Se mantuvo el cultivo inactivado a 2 a 8 °C hasta su procesamiento adicional.

[0086] Se produjo otra preparación de la vacuna tal como se describió anteriormente, pero con 200 g/L de peptona de carne en lugar de 200 g/L de peptona de soja.

Ejemplo 2: Procesamiento posterior de antígenos de *C. chauvoei*:

[0087] Se trató el cultivo de fermentación inactivado (preparado como se describió anteriormente en el Ejemplo 1) para cada grupo indicado como se describe a continuación. Estos antígenos de *C. chauvoei* procesados se emplearon en el Ejemplo 3 más adelante.

T01: (Lote entero) No procesado.

T02: (concentrado 15x MF) Concentrado 30x de cultivo inactivado por filtración de flujo tangencial a través de casetes de membrana con umbral de peso molecular de 0,2 µm. Se recuperó el concentrado celular del sistema con un lavado de solución salina que llevó a una reducción de volumen final igual a 15x.

T03: (concentrado 15x MF y diafiltrado) Concentrado 30x de cultivo inactivado por filtración de flujo tangencial a través de casetes de membrana con umbral de peso molecular de 0,2 µm. Se diafiltró el concentrado celular con solución salina (lavado de volumen constante 4x) y

el concentrado celular diafiltrado recuperado del sistema con un lavado de solución salina que llevó a una reducción de volumen final igual a 15x.

T04: (producto de penetración sin células UF 15x) El producto de penetración recogido durante la concentración celular se concentró 30 veces a través de filtración de flujo tangencial con casetes de membrana con umbral de peso molecular de 10 kDa. Se esterilizó el producto de penetración concentrado por filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Se recuperó el concentrado de producto de penetración del sistema con un lavado de solución salina que llevó a una reducción de volumen final igual a 15x.

T05: (producto de penetración sin células UF diafiltrado 15x) El producto de penetración recogido durante la concentración celular se concentró 30 veces a través de filtración de flujo tangencial con casetes de membrana con umbral de peso molecular de 10 kDa. El producto de penetración concentrado se diafiltró con solución salina (lavado de volumen constante 4x) y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Se recuperó el concentrado de producto de penetración del sistema con un lavado de solución salina que llevó a una reducción de volumen final igual a 15x.

Evaluación analítica de antígenos procesados posteriormente de *C. chauvoei*

[0088] Se evaluó la presencia de antígeno de ccctA y flagelos en los antígenos de *Clostridium chauvoei* con procesamiento posterior (preparados tal como se describió anteriormente). Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de ccctA y flagelos para tratamientos de procesamiento posterior diferentes para los lotes 065 y 370 de antígeno

Tratamiento	**Flagelos**		**cctA**	
	Lote 370 (peptona de carne)	**Lote 065 (peptona de soja)**	**Lote 370 (peptona de carne)**	**Lote 065 (peptona de soja)**
T01	0,78	NT	9,4	39
T02	14,2	NT	41,7	NT
T03	9,8	20	10	131
T04	0,37	NT	60,3	1465
T05	0,34	NT	93	1537

Ejemplo 3: Preparación de formulaciones de vacunas clostridiales experimentales:

[0089] Todas las vacunas de *Clostridial chauvoei* monovalentes experimentales se formularon con una concentración final de 1,6 mg/mL de hidróxido de aluminio (como aluminio). Se dan detalles para el

lote 370 de antígeno de *C. chauvoei* en la Tabla 2.

Tabla 2. Formulaciones de vacunas de C*. chauvoei* monovalentes formuladas con antígeno de lote 370

Componente							
	VC1548-1	**VC1548-2**	**VC1548-3**	**VC1548-4**	**VC1548-5**	**VC1548-6**	**VC1548-7**
Gel de hidróxido de aluminio 3% (mL)	533,3	533,3	533,3	533,3	533,3	533,3	533,3
Flagelos C. chauvoei (Ru) T03	0,0001	0,0005	0,0027	0,0108	0,0674	0,0294	0,0289
cctA C. chauvoei (µg/mL) T05	0,053	0,266	1,328	5,300	33,200	0,295	0,029
Solución de tiomersal 1 % (mL)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Volumen final	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabla 3. Formulaciones de vacunas de ULTRAVAC7 In 1® formuladas con antígeno de lote 370

Componente	**Formulaciones de vacuna**							
	VC1574-1	**VC1574-2**	**VC1574-3**	**VC1574-4**	**VC1574-5**	**VC1574-6**	**VC1574-7**	**VC1574-8**
Gel de hidróxido de aluminio 7,7 % (mL)	206,7	206,7	206,7	206,7	206,7	206,7	206,7	206,7
flagelos C. chauvoei (Ru) T03	0,234	0,117	0,128	0,171	0,063	0,011	0,054	0,090
ccctA C. chauvoei (µg/mL) T05	0,239	0,120	5,420	26,680	2,360	5,300	26,560	44,230
Concentrado toxoide C.	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7

septicum (mL)								
Concentrado de toxoide C. tetani (mL)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Concentrado de toxoide C. novyi (mL)	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5
Concentrado de toxoide de tipo D C. perfringens (mL)	16,1	16,1	16,1	16,1	16,1	16,1	16,1	16,1
Leptospira hardjo/Pomon a Pool (mL)	477,3	477,3	477,3	477,3	477,3	477,3	477,3	477,3
Solución de tiomersal 1 % (mL)	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2
Volumen final	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

[0090] Todas las vacunas clostridiales multivalentes experimentales (ULTRAVAC® 7 In 1) se formularon con una concentración final de 1,6 mg/mL de hidróxido de aluminio (como aluminio). Se dan detalles para el lote 065 de antígeno en la Tabla 4.

Tabla 4. Formulaciones de vacunas de ULTRAVAC 7 In 1® formuladas con antígeno de lote 065

Componente	**Formulaciones de vacuna**							
	VC1585-1	**VC1585-2**	**VC1585-3**	**VC1585-4**	**VC1585-5**	**VC1585-6**	**VC1585-7**	**VC1585-8**
Gel de hidróxido de aluminio 4,3% (mL)	372	372	372	372	372	372	372	372
flagelos C. chauvoei (Ru) T03	0,119	0,119	0,059	0,059	0,059	0,03	0	0,059
ccctA C. chauvoei	18,96	0,78	0,39	0,99	3,37	3,18	2,98	23,15

(µg/mL) T05								
concentrado de toxoide C. septicum (mL)	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7
Concentrado de toxoide C. tetani (mL)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Concentrado de toxoide C. novyi (mL)	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7
Concentrado de toxoide de C. perfringens tipo D (mL)	16,3	16,3	16,3	16,3	16,3	16,3	16,3	16,3
Leptospira hardjo (mL)	225,3	225,3	225,3	225,3	225,3	225,3	225,3	225,3
Leptospira Pomona (mL)	252,0	252,0	252,0	252,0	252,0	252,0	252,0	252,0
Solución de tiomersal 1 % (mL)	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2
Volumen final	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Ejemplo 4: Protección de cobayas:

[0091] Se dividió a las cobayas aleatoriamente en grupos de 5 animales para cada conjunto de vacunas. Se dejó un grupo de cinco cobayas por conjunto de vacunas como control. En los grupos vacunados, cada animal recibió una dosis de la vacuna de prueba (vacuna monovalente de dosis de 1 mL y vacunas ULTRAVAC® 7 In 1 de dosis de 1,25 mL) por vía subcutánea en el lado. Veintiocho días después de la primera inyección, cada animal en los grupos de prueba recibió una segunda inyección de la vacuna de prueba por vía subcutánea en el lado opuesto. Catorce días después de la segunda inyección, se expuso a los animales vacunados y de control a una suspensión de esporas de *Clostridium chauvoei* de cepa CH4 (0,5 ml) en solución de $CaCl_2$ al 5 %, la que se inyectó por vía intramuscular en el músculo del muslo de la pata trasera derecha.

[0092] Se inspeccionó a diario a las cobayas expuestas durante los 5 días siguientes y se registraron

las muertes ocurridas en la hoja de trabajo. Cuando se produjo una muerte, deben encontrarse presente síntomas evidentes de edema por carbunco sintomático. Al final del quinto día de exposición, se sometió a todos los animales a eutanasia. Se sometió a los animales moribundos a eutanasia por razones éticas y se consideró que fallecieron debido a una infección por *C. chauvoei*.

[0093] En un primer experimento, se evaluó la potencia de vacunas de *C. chauvoei* monovalentes que contenían proporciones diferentes de flagelos y cctA mediante exposición virulenta en cobayas. Al aumentar el nivel de cctA en la vacuna en ausencia de células, se obtuvo un 100 % de protección (vea la Tabla 5). Cabe destacar que se redujo en gran medida el nivel de cctA para obtener protección total mediante la adición de células (flagelos).

[0094] En un segundo experimento, se evaluó la potencia de vacunas de ULTRAVAC® 7 In 1 que contenían 5 antígenos clostridiales y dos antígenos de *Leptospira* mediante exposición virulenta en cobayas. Se logró protección total con un equilibrio de flagelos y cctA. Los niveles de cctA y flagelos necesarios para la protección total fueron mayores que los necesarios para la vacuna monovalente.

[0095] En el tercer experimento, se evaluó la potencia de vacunas de ULTRAVAC® 7 In 1 que contenían 5 antígenos clostridiales y dos antígenos de *Leptospira* mediante exposición virulenta en cobayas. La diferencia con el experimento 2 fue que el antígeno de *C. chauvoei* usado en este experimento se derivó de antígeno cultivado en peptona de soja. Nuevamente, se logró protección total con un equilibrio de flagelos y antígenos de cctA.

Tabla 5. Formulaciones de vacunas de *C. chauvoei* monovalentes formuladas con antígeno de lote 370

Vacuna	**Flagelos, RU**	**cctA µg/mL**	**Potencia (supervivientes)**
VC1548-1	0,0001	0,053	0 %
VC1548-2	0,0005	0,266	20%
VC1548-3	0,0027	1,328	20%
VC1548-4	0,0108	5,3	80%
VC1548-5	0,0674	33,2	100%
VC1548-6	0,0294	0,295	100%
VC1548-7	0,0289	0,029	100%

Tabla 6. Formulaciones de vacunas de ULTRAVAC® 7 In 1® formuladas con antígeno de lote 370

Vacuna	**Flagelos, RU**	**cctA µg/mL**	**Potencia (supervivientes)**
VC1574-1	0,234	0,239	40%
VC1574-2	0,117	0,12	60%

VC1574-3	0,128	5,42	100%
VC1574-4	0,171	26,68	100%
VC1574-5	0,063	2,36	0 %
VC1574-6	0,011	5,3	60%
VC1574-7	0,054	26,56	80%
VC1574-8	0,090	44,23	80%

Tabla 7. Formulaciones de vacunas de ULTRAVAC® 7 In 1 formuladas con antígeno de lote 065

Vacuna	**Flagelos, RU**	**cctA µg/mL**	**Potencia (% supervivientes)**
VC1585-1	0,119	18,96	100 %
VC1585-2	0,119	0,78	60%
VC1585-3	0,059	0,39	0 %
VC1585-4	0,059	0,99	40%
VC1585-5	0,059	3,37	100 %
VC1585-6	0,03	3,18	0 %
VC1585-7	0	2,98	0 %
VC1585-8	0,059	23,15	100 %

[0096] Todas las publicaciones citadas en la memoria descriptiva, tanto publicaciones de patente como publicaciones no patente, son indicativas del nivel de experticia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas esas publicaciones se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación individual se incorpora a la presente mediante esta referencia.

[0097] Aunque se ha descrito en la presente la invención con referencia a modalidades particulares, se debe entender que estas modalidades son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Por consiguiente, se debe entender que es posible hacer muchas modificaciones a las modalidades ilustrativas y que se podrían concebir otros arreglos sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención tal como lo definen las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Zoetis Services LLC

Cameron, Anthony

<120> VACUNA DE *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* Y MÉTODOS PARA PRODUCIRLA

<130> ZP000393

<160>1

<170> PatentIn versión 3,5

‹210› 1

‹211› 317

‹212› PRT

‹213› *Clostridium Chauvoei*

<400> 1

Met Ile Lys Arg Ile Leu Met Leu Ala Leu Ala Thr Thr Thr Ile Phe
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Pro Phe Ser Tyr Lys Ala Val Gln Ala Gln Glu Asn
20 25 30
Thr Cys Ile Val Glu Thr Pro Ser Glu Gly Val Lys Thr Phe Thr Ser
35 40 45
Ser Asp Thr Ala Tyr Ala Asp Tyr Asn Cys Phe Lys Thr Asn Leu Ser
50 55 60
Val Thr Phe Ile Glu Asp Gln His Asn Asn Gln Leu Thr Ala Leu Val
65 70 75 80
Ser Thr Glu Gly Ser Phe Ile Pro Ser Gly Leu Ser Arg Val Gly Gly
85 90 95
Tyr Tyr Gln Ala Asp Met Tyr Trp Pro Ser Lys Tyr Tyr Thr Thr Leu
100 105 110
Thr Thr Tyr Asp Arg Asn Asn Arg Val Lys Ile Thr Lys Ser Ile Pro
115 120 125
Thr Asn Gln Ile Asp Thr Val Ser Val Ser Glu Thr Met Gly Tyr Ser
130 135 140
Ile Gly Gly Ser Leu Ser Ile Glu Tyr Gly Lys Glu Gly Pro Lys Ala
145 150 155 160
Gly Gly Gly Ile Asn Gly Ser Tyr Thr Ala Gln Arg Ser Val Thr Tyr
165 170 175
Asp Gln Pro Asp Tyr Arg Thr Leu Leu Met Lys Asp Ser Val Asn Ser
180 185 190

Ala Ser Trp Glu Val Ala Phe Asn Ala Thr Lys Asp Gly Tyr Asp Arg
195 200 205
Asp Ser Tyr His Gly Ile Tyr Gly Asn Gin Leu Phe Met Arg Tyr Arg
210 215 220
Leu Tyr Asn Thr Gly Ile Asn Asn Leu Thr Thr Asp Asn Asn Leu Ser
225 230 235 240
Ser Leu Ile Val Gly Gly Phe Ser Pro Lys Val Val Ile Ala Leu Thr
245 250 255
Ala Pro Lys Gly Thr Glu Glu Ser Thr Val Lys Val Glu Tyr Asn Arg
260 265 270
Phe Asn Asp Gln Tyr Arg Leu Arg Trp Ser Gly Thr Glu Trp Tyr Gly
275 280 285
Glu Asn Asn Arg Asn Ser Arg Ile Asp Ser Ser Ser Glu Ser Phe Ile
290 295 300
Leu Asn Trp Lys Asn His Thr Val Glu His Ala Gly Tyr
305 310 315