



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

(21) **PI0610843-1 A2**

(22) Data de Depósito: 17/04/2006
(43) Data da Publicação: 27/07/2010
(RPI 2064)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/08
A61P 31/04

(54) Título: **VACINA TOXÓIDE ALFA CONTRA C. PERFRINGENS**

(30) Prioridade Unionista: 18/04/2005 US 60/672,289

(73) Titular(es): SCHERING-PLOUGH LTD.

(72) Inventor(es): HUCHAPPA JAYAPPA, KEVIN O'CONNELL

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006014669 de 17/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/113772 de 26/10/2006

(57) Resumo: VACINA TOXOIDE ALFA CONTRA C. PERFRINGENS. A presente invenção refere-se a vacinas que compreendem toxóides tipo alfa contra C. perfringens, fragmentos antigênicos dos mesmos, fragmentos antigênicos inativados de toxinas alfa de C. perfringens ou qualquer combinação dos mesmos. A presente invenção descreve ainda processos de uso destas vacinas para proteção de animais contra clostridioses, doenças provocadas por bactérias do gênero Clostridium. A presente invenção descreve também processos para a produção destas vacinas.

Pat 020040178706
Pi 0610843-1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**VACINA TOXÓIDE-ALFA CONTRA *C. PERFRINGENS***".

Referência Cruzada a Pedidos de Patente Relacionados

5 Este é um pedido de patente não provisório que reivindica prioridade, segundo o § 119(e) do 35 U.S.C., do pedido de patente provisório U.S. Nº 60/672 289, depositado em 18 de abril de 2005, o conteúdo do qual são aqui incorporados em sua totalidade por referência neste pedido de patente.

Campo da Invenção

10 A presente invenção refere-se a vacinas compreendendo toxóides do tipo alfa do *C. perfringens*, fragmentos antigênicos dos mesmos, fragmentos antigênicos de alfa toxinas e quaisquer combinações dos mesmos. A presente invenção refere-se ainda a métodos para uso destas vacinas para proteção de animais contra doenças provocadas por clostrídios. A presente invenção refere-se também a processos de produção destas vacinas.

15 Antecedentes da Invenção

O *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) é uma bactéria anaeróbica encontrada naturalmente no solo, em matéria orgânica em decomposição e como parte da flora intestinal natural de animais, inclusive de seres humanos. O *C. perfringens* é também o agente etiológico de inúmeras doenças clostridiais, presente em animais domésticos, valiosos em termos econômicos. O *C. perfringens* produz algumas toxinas com ação patogênica em animais, incluindo a toxina alfa, a toxina beta, a toxina beta 2, a toxina épsilon, a toxina teta, a toxina um, a toxina delta, a toxina iota, a toxina kapa e a toxina lâmbda. Além disso, o *C. perfringens* codifica outras substâncias biologicamente ativas que causam efeitos patológicos, incluindo: hialuronidase, fosfatase ácida, protease, collagenase, sulfatase e neuraminidase.

20

25

As diferentes cepas de *C. perfringens* são designadas com Biotipos de A até E, dependendo do espectro de toxinas que aquela bactéria específica produz [Justin *et al.*, *Biochemistry* 41:6253-6262 (2002); McDonel, *Pharmacology of Bacterial Toxins*; F Dorner and J Drews (eds.) Pergamon Press, Oxford (1986)]. Inicialmente, essa classificação de tipos era fundamentada em ensaios de neutralização sorológica em camundongos ou porquinhos-da-

30

índia. Mais recentemente, os métodos para classificação de tipo molecular empregam a reação em cadeia da polimerase (PCR), direcionada para seqüências genéticas que codificam uma das inúmeras toxinas do *C. perfringens*.

5 A clostridiose intestinal em cavalos foi correlacionada com concentrações altas do *C. perfringens* Tipo A no intestino. O quadro, em cavalos, manifesta-se por diarreia líquida profusa e um alto índice de mortalidade. O *C. perfringens* Tipo A está ligado também à doença entérica em leitões lactentes com sintomas que incluem enterite necrótica leve e atrofia de vilosidades [Songer, Clin. Micro. Rev, 9(2):216-234 (1996)].

10 As doenças clostridiais causadas por *C. perfringens* são caracterizadas por morte súbita em aves bem-desenvolvidas com lesões fibrinonecróticas confluentes ("Toalha turca"), no intestino delgado (formas entéricas), e/ou hepatite associada a *C. perfringens* com colangiohepatite ou necrose fibrinóide no fígado. Aves acometidas passam por um período rápido de depressão, diarreia e desidratação. A mortalidade varia de 2% a 50%. A patologia hepática leva à condenação dos animais abatidos.

15 A enterite necrótica (EM) é um exemplo de doença entérica clostridial causada por *C. perfringens* que resulta em conseqüências econômicas significantes na avicultura. A doença é especialmente comum em galinhas de 2 a 10 semanas de idade, criadas em chão batido, embora a doença tenha sido também relatada em perus e galinhas poedeiras criadas em gaiola. A enterite necrótica ocorre geralmente, na avicultura, como doença secundária ou em uma situação em que há alteração da microflora intestinal normal, permitindo a proliferação anormal de *C. perfringens* patogênico. A prevalência de enterite necrótica subclínica é desconhecida, uma vez que as lesões
25 somente podem ser observadas por meio de exame *post-mortem*. No entanto, relatos de comprometimento e inversão do desenvolvimento alimentar e redução de peso corporal foram atribuídos à doença subclínica [Lovland and Kadhusdal, Avian Path. 30:73-81 (2001)]. Fatores predisponentes que levam
30 à enterite necrótica, tanto em surtos naturais como em modelos experimentais, incluem: (a) coccidiose, (b) migração de larvas parasitárias, (c) ração com alto teor de peixe ou trigo e (d) doenças imunossupressoras. Ademais,

a enterite necrótica pode ser reproduzida experimentalmente da seguinte maneira: (i) fornecimento de ração contaminada por *C. perfringens* aos animais (ii) administração de culturas em vegetais por via oral ou no papo ou (iii) administração intraduodenal de caldos de culturas de toxinas brutas sem bactérias aos animais.

Os Tipos A ou C do *C. perfringens* são os biotipos que causam enterite necrótica em aves domésticas, sendo a toxina alfa a mais comumente detectada [Wages and Opengart, *Necrotic Enteritis*. pp: 781-785, In: *Disease of Poultry*, 11th ed., (eds., Saif *et al.*), Iowa State Press, Ames, IA (2003)]. De fato, mais de 90% dos isolados de *C. perfringens*, obtidos de quarenta e duas aves domésticas infectadas pelo Tipo A, produziram uma toxina letal, juntamente com sialidase, e as toxinas teta e mu [Daube *et al.*, *AJVR* 54:496-501 (1996)]. Ademais, a enterotoxina, produzida pelo *C. perfringens* Tipo A, foi identificada em galinhas com enterite necrótica e pode também participar na doença intestinal [Niilo, *Can. J. Comp. Med.* 42:357-363 (1978)].

Recentemente, foi relatado que o *C. perfringens* Tipo A ou Tipo C pode codificar o gene *cpb2* [Gilbert *et al.*, *Gene* 203:56-73 (1997)] e expressar o seu produto, a toxina beta 2. Foi observada uma forte correlação entre a expressão da toxina beta 2 e a enterite neonatal em suínos [Bueschel *et al.*, *Vet Micro* 94:121-129 (2003)]. A toxina beta 2 foi implicada também como fator patogênico na enterite eqüina e bovina. Bueschel *et al.*, supramencionados, relataram ainda que 37,2% dos três mil e vinte isolados obtidos de *C. perfringens* codificaram a toxina beta 2 e, dos isolados examinados de *C. perfringens* Tipo A, 35,1% codificaram a toxina beta 2. Foi constatado, na amostra limitada (n=5) de isolados de campo de *C. perfringens* Tipo A das aves, que ≈35% eram positivos para o genótipo *cpb2* e 40% deste expressaram também a toxina beta 2. Além disso, Engstrom *et al.*, [Vet Micro 94:225-235 (2003)], ao empregarem a técnica de PCR, constataram que 12% dos isolados de *C. perfringens*, provenientes de galinhas com hepatite, eram também positivos para *cpb2*. A enterotoxina do *C. perfringens* Tipo A demonstrou também ser patogênica em galinhas, ocasionando o acúmulo de líquido em um modelo de alça intestinal ligada [Niilo, *Appl. Micro.*

28:889-891 (1974)].

Atualmente, os esforços para controlar o *C. perfringens* baseiam-se em medidas sanitárias e na introdução de antibióticos na ração dos animais. O componente clostridial da doença responde bem aos antibióticos e é, de maneira geral, suprimido por aditivos antibióticos contidos na ração e medicamentos ionóforos contra coccidiose. No entanto, antibióticos são caros e sujeitos às crescentes preocupações relativas à promoção de resistência bacteriana.

A vacinação tornou-se também uma medida de controle importante em animais domésticos, uma vez que o curso de muitas doenças associadas ao *C. perfringens* é rápido e freqüentemente fatal. Por exemplo, o pedido de Patente U.S. Nº 4 292 307 define uma vacina multivalente "universal", preparada a partir de toxóides de *C. perfringens* Tipo A, Tipo B e Tipo D, a qual inclui ainda toxóides de *Cl. oedematiens* e toxóide de *Cl. septicum*. Ademais, as vacinas disponíveis no mercado são freqüentemente multivalentes e consistem em células inativadas, toxinas ou combinações de ambas [consultar, Songer, *Clin. Micro. Rev*, 9(2):216-234 (1996)].

A vacinação das fêmeas do plantel pode resultar também em proteção passiva da ninhada nascida subsequente. A proteção passiva de neonatos mamíferos, contra infecções patológicas causadas por clostridium, baseia-se na transferência de anticorpos específicos sob a forma de anticorpos presente em colostro. Por exemplo, Smith e Matsuoka [*Am. J. Vet. Res.* 20:91-93 (1959)] empregaram uma vacina inativada para inocular ovelhas prenhas e relatou a proteção induzida por transmissão materna da ninhada de carneiros contra a toxina épsilon do *C. perfringens*.

A imunidade passiva dura tipicamente em ninhadas de mamíferos de 2 a 3 semanas [Songer, *Clin. Micro. Rev*, 9(2):216-234 (1996)].

Ao contrário de mamíferos lactentes, a imunidade passiva em aves possui várias deficiências óbvias, mais acentuadamente, a ausência completa de anticorpos maternos, obtidos a partir de leite materno. Embora a imunidade passiva seja apenas uma das possíveis explicações da correlação que observaram, Heier *et al.*, [*Avian Diseases* 45:724-732 (2001)] não

relataram que a sobrevivência de ninhadas de pintos era significativamente mais alta em plantel de galinhas de corte norueguesas com títulos mais altos de anticorpos maternos naturais, específicos contra a toxina alfa de *C. perfringens*, do que naqueles plantéis com títulos baixos. Além disso, Lovland *et al.* [Avian Pathology 33(1):83-92 (2004)] relataram que os resultados eram compatíveis com a proteção passiva reduzida da progênie de galinhas que tinham sido inoculadas com vacinas à base de toxóides de *C. perfringens* Tipo A ou Tipo C, em comparação à progênie de galinhas não vacinadas.

Até aqui, não pareceu ser possível obter proteção comercialmente significativa, contra o *C. perfringens*, a não ser que anticorpos maternos para a maioria, se não para todos os componentes patológicos produzidos pela bactéria *C. perfringens*, estivesse presente no inoculado. Por exemplo, a vacinação da porca usando um produto que não incluía enterotoxina confere somente proteção parcial aos leitões, e anticorpo contra toxina épsilon, em cabras, protege somente contra morte por toxemia, porém não contra enterocolite [Songer, Clin. Micro. Rev, 9(2):216-234 (1996)].

De fato, apesar de a arrumação em tabelas de uma quantidade impressionante de dados, referentes aos vários biotipos de *C. perfringens* e suas toxinas e substâncias bioativas deletérias correspondentes, as doenças clostridiais em animais matrizes de corte permanece um problema econômico relevante para os fazendeiros. Por conseguinte, há necessidade de prover meios adicionais para proteção de rebanhos contra os efeitos patológicos do *C. perfringens*. Mais especificamente, permanece a necessidade de prover uma vacina segura e eficaz contra *C. perfringens* na avicultura. Além disso, há necessidade de prover uma vacina simples contra *C. perfringens* que possa ser administrada a fêmeas de animais, especialmente, rebanhos férteis e/ou prenhes, que protegerão passivamente as suas prole.

A citação de qualquer referência no presente não deve ser interpretada como admissão de que esta referência é disponibilizada ao presente pedido de patente como "técnica anterior".

Sumário da Invenção

A presente invenção provê vacinas contra *C. perfringens* que

compreendem toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico de um toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou qualquer combinação dos mesmos sob a forma de antígeno. A presente invenção provê ainda vacinas que consistem, essencialmente, em um único toxóide Tipo alfa contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico de toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico inativo de uma toxina alfa do *C. perfringens* e/ou qualquer combinação dos mesmos, sob a forma de antígeno.

Preferencialmente, uma ou duas doses de 0,25 – 0,6 ml por dose de uma vacina da presente invenção são suficientes para induzir pelo menos quatro unidades antitoxina (A.U.) de anticorpo antitoxina alfa, por ml de anti-soro de um animal (por exemplo, uma galinha) vacinado com a vacina. Em uma concretização desse tipo, a determinação de unidades antitoxina (A.U.) do anticorpo antitoxina alfa, por ml de anti-soro de um animal vacinado com a vacina, é efetuada de seis a sete semanas após a imunização.

Em uma concretização específica, uma dose única da vacina é suficiente para induzir, pelo menos, quatro unidades antitoxina (A.U.) do anticorpo antitoxina alfa, por ml de anti-soro do animal vacinado, enquanto que, em uma concretização alternativa, são necessárias duas doses da vacina. Em uma concretização, o antígeno possui 2 ou mais unidades de Potência Total Combinada (TCP).

Em uma destas concretizações, o animal é uma ave. Em uma concretização específica, a ave é uma galinha. Em outra concretização, a ave é um peru.

Em uma concretização, o antígeno originou-se de uma célula de *C. perfringens* Tipo A, por exemplo, um toxóide alfa do *C. perfringens* Tipo A. Em outra concretização, o antígeno originou-se de uma célula de *C. perfringens* Tipo C, por exemplo, um fragmento antigênico inativo de uma toxina alfa de *C. perfringens* Tipo C. Em ainda uma outra concretização, o antígeno originou-se de *C. perfringens* Tipo B. Em ainda outra concretização, o antígeno originou-se de *C. perfringens* Tipo D. Ainda em uma outra concretização, o antígeno originou-se de *C. perfringens* Tipo E. E em mais outra concretização, a vacina compreende um antígeno que originou-se de um subtipo

de *C. perfringens*.

Em uma concretização, uma vacina da presente invenção compreende um antígeno que é antígeno de um único Tipo de *C. perfringens*, com a ressalva de que somente antígeno de um único Tipo de *C. perfringens* está presente nesta vacina. Em uma concretização específica deste tipo, o *C. perfringens* é do Tipo A. Em uma concretização correlata, o *C. perfringens* é do Tipo C. Em uma concretização, o antígeno um toxóide alfa. Em uma concretização em particular deste tipo, o toxóide alfa está compreendido em um sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens*. Em uma concretização específica, a vacina compreende um sobrenadante de um único Tipo de *C. perfringens*, o Tipo A.

Em uma vacina da presente invenção, o antígeno é um toxóide alfa de uma toxina alfa naturalmente codificada por uma célula do *C. perfringens*. Em outra vacina da presente invenção, o antígeno é um polipeptídeo recombinante, isto é, um daqueles codificados por um gene que foi manipulado geneticamente. Em uma concretização desse tipo, o polipeptídeo recombinante é um toxóide alfa no qual regiões enzimáticas da toxina alfa correspondente foram geneticamente removidas ou alteradas, porém, no qual foram mantidos uma ou mais epitopos antigênicos.

Em uma concretização específica, o antígeno é um preparado inteiramente de células. Em outra concretização, o antígeno é um preparado sem células. Em ainda outra concretização, o antígeno é um toxóide alfa em um sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens*. Em uma concretização específica desse tipo, o sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens* é também um preparado sem células.

Em outra característica da presente invenção, uma vacina pode conter também antígenos múltiplos que podem resultar na produção de anticorpos de uma variedade de especificações quando administrado a um animal de pesquisa. Nem todos estes anticorpos precisam ser protetores contra uma doença. Em uma concretização específica desse tipo, estes antígenos derivam também de *C. perfringens*. Dessa forma, uma vacina da presente invenção pode conter fatores patogênicos ativos ou inativados, junto com um

toxóide alfa. Por conseguinte, de acordo com a presente invenção, o toxóide alfa pode estar combinado a outras células clostridiais e não clostridiais, toxóides e extratos, além de fragmentos antigênicos inativos de toxina alfa.

Uma destas vacinas multivalentes da presente invenção compreende um toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico de um toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico inativo de uma toxina alfa do *C. perfringens* e/ou qualquer combinação dos mesmos, e compreende ainda um antígeno viral e/ou um antígeno bacteriano e/ou um antígeno parasitário. Em uma concretização específica desse tipo, a origem viral do antígeno é o vírus da doença infecciosa da bursa. Em outra concretização, a origem viral do antígeno é o vírus da bronquite infecciosa. Em ainda outra concretização, a origem viral do antígeno é o reovírus. Ainda em outra concretização, a origem viral do antígeno o vírus da doença de Newcastle. Em mais uma outra concretização, a origem bacteriana do antígeno é *E. coli*. Em outra concretização, a origem bacteriana do antígeno é *Salmonella*. Em ainda outra concretização, a origem bacteriana do antígeno é *Campylobacter*. Em mais uma outra concretização, a origem parasitária do antígeno provém de *Eimeria*. Em uma concretização específica desse tipo, o antígeno empregado na vacina é parte de um merozóita de *Eimeria*, um oocisto de *Eimeria* ou mista mistura dos mesmos. Em uma concretização correlata, o hospedeiro natural do parasita é uma ave. Em uma concretização específica desse tipo, o parasita é o *Eimeria* e o hospedeiro natural do parasita é uma galinha.

Uma vacina multivalente da presente invenção pode compreender também um ou mais dos seguintes antígenos: toxina beta do *C. perfringens*, toxina beta 2 do *C. perfringens*, enterotoxina do *C. perfringens*, toxina épsilon do *C. perfringens*, toxina iota do *C. perfringens*, toxina kapa do *C. perfringens*, toxina lâmbda do *C. perfringens*, toxina teta do *C. perfringens*, toxina hemorrágica do *C. sordellii*, toxina letal do *C. sordellii*, toxina A do *C. difficile*, toxina B do *C. difficile*, toxina alfa do *C. septicum*, toxina alfa do *C. novyi* e toxina beta do *C. novyi*.

Em uma vacina multivalente específica da presente invenção, a

vacina compreende um toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico de um toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico inativo de uma alfa toxina de *C. perfringens* e/ou qualquer combinação dos mesmos, compreendendo ainda um ou mais antígenos virais provenientes de vírus da doença infecciosa da bursa e/ou do vírus da bronquite infecciosa e/ou do reovírus e /ou do vírus da doença de Newcastle, e/ou antígenos bacterianos provenientes de *E. coli* e/ou *Salmonella* e/ou *Campylobacter*, além de um antígeno parasitário proveniente do *Eimeria*.

Em uma concretização alternativa, uma vacina multivalente da presente invenção consiste, essencialmente, em alfa toxóide contra um único Tipo de *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico de um alfa toxóide contra *C. perfringens* e/ou um fragmento antigênico inativo de uma toxina alfa de *C. perfringens* e/ou qualquer combinação dos mesmos. Em uma concretização correlata, a vacina contém ainda um antígeno viral e/ou um antígeno bacteriano e/ou um antígeno parasitário, conforme provido no presente.

Uma vacina da presente invenção pode compreender também um adjuvante. Um adjuvante animal popular é um adjuvante hidróxido de alumínio. Um adjuvante alternativo pode compreender emulsão água-em-óleo junto com o antígeno. Em uma vacina específica desse tipo, a emulsão água-em-óleo é preparada com 70% de fase oleosa e 30% de fase aquosa. Em outra concretização, o adjuvante é especificamente um adjuvante diferente de hidróxido de alumínio. Em uma destas concretizações, a vacina, incluindo um adjuvante diferente de hidróxido de alumínio, é administrada a aves domésticas. Em uma concretização específica, uma vacina compreende um toxóide alfa contra *C. perfringens*, um adjuvante e um ou mais antígenos protetores, recombinantes ou naturais, obtidos de um vírus, bactéria e/ou de um extrato bacteriano.

Em outra característica, a presente invenção provê métodos para conferir imunidade ativa a uma ave, pela imunização de uma ave com uma vacina da presente invenção. Em uma concretização específica, a dose da vacina, para esta imunidade ativa, é de aproximadamente 0,05 a aproxi-

madamente 0,1 ml. Em uma concretização, a ave é um peru. Em outra concretização, a ave é uma galinha. Em ainda outra concretização, a ave é um faisão. A presente invenção provê também um método de administração de uma vacina multivalente da presente invenção para uma ave para proteger a
5 mesma contra diversas doenças.

A presente invenção provê também métodos para conferir imunidade passiva à prole da fêmea de um animal (por exemplo, uma fêmea prenha), compreendendo a administração de uma vacina da presente invenção à fêmea do animal (por exemplo, mãe), antes do nascimento de sua
10 progênie. Em uma concretização, a fêmea é uma ave e a vacina é administrada à fêmea antes da postura de ovos que compõem a sua progênie. Dessa maneira, é conferida imunidade passiva à sua prole. Nesta concretização, a ave é uma galinha. Em outra concretização, a ave é uma perua. Em ainda outra concretização, a ave é a fêmea de faisão.

15 Em uma concretização específica, o método provê imunidade passiva contra uma doença provocada por bactérias do gênero *Clostridium* à progênie do animal vacinado. Em um destes métodos, esta doença é clostridiose do tipo entérica. Em um método específico deste tipo, a doença entérica da clostridiose é enterite necrótica. Em outro destes métodos, a doença
20 clostridiose é colangiohepatite. Em ainda outra concretização, o método confere imunidade passiva contra uma doença clostridiose à progênie do animal vacinado, bem como confere proteção contra dermatite gangrenosa, séptica e/ou hepatite.

Em uma concretização, o método para conferir imunidade passiva à progênie da fêmea de um animal compreende a administração de uma
25 vacina multivalente à fêmea do animal para proteção de sua progênie contra diversas doenças. Em uma concretização específica deste tipo, a fêmea do animal pertence à família de aves domésticas e sua progênie é protegida contra diversas doenças que afetam aves domésticas.

30 Em uma concretização específica, a dosagem para conferir imunidade passiva à progênie da fêmea de um animal é de aproximadamente 0,25 ml por dose da vacina. Em outra concretização, a dosagem é de apro-

ximadamente 0,4 ml por dose da vacina. Em ainda outra concretização, a dosagem é de aproximadamente 0,6 ml por dose da vacina. Em uma concretização exemplificada abaixo, a dosagem é de aproximadamente 0,5 ml por dose da vacina.

5 A presente invenção provê ainda um processo para produção de uma vacina de toxóide alfa contra *C. perfringens* da presente invenção. Um destes métodos, compreende o cultivo de uma célula de *C. perfringens* em um meio de cultura que produza quantidade suficiente de células cultivadas que permita a secreção de uma toxina alfa de *C. perfringens* no meio celular.

10 O toxóide alfa contra *C. perfringens* é produzido, em seguida, por inativação da toxina alfa secretada. A maior parte das células cultivadas são removidas do meio de cultura para formarem um sobrenadante contendo toxóide alfa contra *C. perfringens*. Em uma concretização específica do método, a concentração do sobrenadante contendo toxóide alfa contra *C. perfringens* é

15 ajustada de forma a ser suficiente para induzir pelo menos quatro unidades de antitoxina (A.U.) do anticorpo antitoxina alfa por ml de anti-soro de um animal (por exemplo, uma galinha) que foi vacinado com uma ou duas doses de 0,25 – 0,6 ml por dose da referida vacina. Em uma destas concretizações, o processo de concentração inclui uma diafiltração contra uma solução

20 tamponada a fim de remover contaminantes de baixo peso molecular.

 O processo de produção de uma vacina de toxóide alfa contra *C. perfringens* da presente invenção pode compreender ainda a mistura do sobrenadante contendo alfa toxóide contra *C. perfringens* com um adjuvante. Em uma destas concretizações, o sobrenadante contendo toxóide alfa contra

25 *C. perfringens* é misturado em uma emulsão água em óleo. Em uma concretização específica deste tipo, a emulsão água em óleo é preparada com 70% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.

 As células de *C. perfringens*, empregadas no processo, podem ser células provenientes de um único Tipo de *C. perfringens*. Em uma concretização específica deste tipo, a célula do único Tipo de *C. perfringens* é

30 uma célula de *C. perfringens* Tipo A. Em uma concretização alternativa, a célula do único Tipo de *C. perfringens* é uma célula de *C. perfringens* Tipo C.

Estas e outras características da presente invenção serão apreciadas melhor por referência à Descrição Detalhada a seguir.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção provê vacinas únicas contra *C. perfringens* que são seguras e eficazes para prevenção de doenças provocadas por bactérias do gênero *Clostridium* em animais. Em uma concretização específica, a administração de uma vacina da presente invenção à fêmea de um animal resulta na imunização da fêmea do animal e no desenvolvimento de anticorpos que podem ser transferidos passivamente para sua progênie nascida subsequente. Em uma concretização, a presente invenção provê uma vacina que compreende uma quantidade específica mínima de um toxóide alfa contra um único Tipo de *C. perfringens*, eficaz contra infecções nocivas provocadas pelo *C. perfringens*. Em uma concretização específica, a vacina compreende uma combinação segura e imunologicamente eficaz de um toxóide alfa da presente invenção e um adjuvante farmacologicamente aceitável.

As vacinas da presente invenção podem ser utilizadas para proteger contra qualquer condição ou doença em que haja participação do *C. perfringens*. Estas doenças incluem doenças do tipo clostridiose. Em uma concretização deste tipo, a clostridiose é uma doença entérica. Por conseguinte, em uma concretização específica, a presente invenção provê vacinas que são eficazes para a prevenção da manifestação entérica da clostridiose em aves domésticas, conhecida como enterite necrótica. Outras síndromes de doenças podem ser prevenidas também pelas vacinas da presente invenção e incluem, entre outras, hepatite relacionada a clostrídios, colangio-hepatite e dermatite gangrenosa.

A presente invenção expõe que uma vacina compreendendo uma quantidade específica mínima de toxóide alfa (isto é, que tenha um TCP específico mínimo), obtido de um único Tipo de *C. perfringens*, protege a progênie da fêmea vacinada do animal, sujeita a clostridioses como enterite necrótica, independentemente de quaisquer toxinas letais adicionais expressadas por um *C. perfringens* provocado. A presente invenção expõe ainda

uma vacina que resulta em uma resposta específica mínima de antitoxina alfa, proveniente da fêmea vacinada do animal, que protege também a progênie desta fêmea vacinada do animal, sujeita a clostridioses, independentemente de quaisquer toxinas letais adicionais expressadas por *C. perfringens* naturalmente existente. As vacinas da presente invenção podem ser administradas também junto a um adjuvante aceitável.

Conforme é exemplificado abaixo, galinhas vacinadas com uma vacina derivada de um isolado inativado de *C. perfringens* Tipo A que expresse uma toxina alfa, porém não uma toxina beta 2 correspondente, levou inesperadamente à imunização passiva de pintos da progênie de três semanas em um teste com uma cepa de *C. perfringens* que expressava tanto a toxina alfa como a toxina beta 2. Até esta data, não havia evidências dessa proteção cruzada contra estas duas toxinas distintas. Por conseguinte, a presente invenção provê vacinas relativamente simples que são capazes de estimular uma quantidade específica mínima de antitoxinas alfa e, desse modo, proteger contra doenças provocadas por bactérias do gênero *Clostridium*, por exemplo, enterite necrótica, não obstante o tipo de outras toxinas que a cepa testada de *C. perfringens* possa expressar.

De fato, apesar de a multiplicidade de toxinas e de outras proteínas biologicamente ativas, produzidas pelo *C. perfringens* e que demonstraram possuir efeitos patogênicos sobre animais, e as inúmeras citações na literatura sobre as contribuições destas várias toxinas e de outras proteínas para a patologia da enterite necrótica, as vacinas únicas, descritos no presente pedido, provêem uma resposta imunológica relevante contra *C. perfringens* em galinhas poedeiras vacinadas, além de imunidade passiva para sua ninhada nascida subsequente.

Embora a presente invenção independa completamente de qualquer teoria ou modelo, os resultados providos neste pedido são compatíveis com o fato de que a toxina alfa do *C. perfringens* é o componente antigênico não só necessário como suficiente para proteção contra a enterite necrosante. Embora as toxinas beta, beta 2 e enterotoxinas possam ser fundamentais para a patologia da enterite necrosante, os resultados providos

neste pedido são compatíveis com o fato de que o toxóide alfa é o único toxóide necessário em uma vacina para enterite necrosante. Ademais, como a produção da toxina alfa é, de maneira geral, a mais alta em cepas do Tipo A, as cepas de *C. perfringens* Tipo A são particularmente úteis como fonte de toxina alfa do *C. perfringens*. No entanto, outros Tipos de *C. perfringens* podem ser utilizados com êxito, especialmente quando modificação genética tiver sido utilizada para aumentar o nível de produção de toxina alfa nestes outros Tipos.

Conforme utilizados no presente, os termos seguintes possuirão as definições descritas abaixo:

Conforme utilizado no presente, um "antígeno de proteção" é um antígeno que resulta na produção de anticorpos específicos que conferem proteção contra infecção e/ou doença ao animal vacinado com aquele antígeno e/ou sua progênie. Uma vacina que contenha este antígeno de proteção é chamada de "imunologicamente eficaz".

Conforme utilizado no presente, o termo "fragmento antigênico", em relação a uma proteína em particular, é um fragmento desta proteína que é antigênico. Por exemplo, um fragmento antigênico de uma toxina alfa ou de um toxóide alfa é um fragmento da toxina alfa ou toxóide alfa que é antigênico. Conforme utilizado no presente, um fragmento antigênico de uma toxina alfa ou de um toxóide alfa pode ser qualquer fragmento da toxina alfa ou toxóide alfa, respectivamente, incluindo fragmentos grandes, em que de toda a extensão da proteína esteja faltando apenas um único aminoácido. Em uma concretização específica, um fragmento antigênico de uma toxina alfa ou toxóide alfa contém entre 6 e 120 resíduos de aminoácidos. Ademais, um fragmento antigênico de uma determinada toxina alfa pode ser obtido de origem recombinante, de uma proteína isolada de fontes naturais ou por meio de síntese química. Além disso, um fragmento antigênico pode ser obtido após a digestão proteolítica de uma toxina alfa, toxóide alfa ou de um fragmento dos mesmos, por meio de expressão recombinante ou, alternativamente, ele pode ser gerado *de novo*, por exemplo, por meio de síntese protéica.

Conforme utilizado no presente, um "fragmento antigênico inativo" de uma toxina alfa de *C. perfringens* é um fragmento antigênico de uma toxina alfa de *C. perfringens* que retém pelo menos um epitopo antigênico, porém não possui atividade catalítica suficiente da toxina alfa para torná-lo deletério. Estes fragmentos antigênicos inativos pode ser utilizados isoladamente ou, alternativamente, podem ser incorporados em proteínas de fusão.

Conforme utilizado no presente, o termo "toxóide alfa" refere-se a qualquer toxina alfa inativa (por exemplo, uma toxina alfa de extensão completa), porém não pretende restringir de forma alguma os meios específicos de inativação de toxina alfa para produção daquele toxóide alfa. Estes processos de inativação incluem: (i) processos químicos que modificam a proteína intacta, por exemplo, tratamento com formaldeído ou glutaraldeído; (ii) processos físicos, como aquecimento; (iii) processos enzimáticos que alteram a proteína, como uma protease que cliva a toxina em fragmentos; (iv) processos recombinantes, como engenharia genética do gene da toxina alfa para remover ou alterar regiões enzimáticas da proteína, porém retendo um ou mais epitopos antigênicos (consultar, por exemplo., US 5.817.317, cujo conteúdo é aqui, integralmente, incorporado por referência neste pedido de patente); e/ou combinações de todos e quaisquer dos precedentes.

Conforme utilizado no presente, um "sobrenadante de toxóide alfa" de *C. perfringens* é uma solução compreendendo toxina alfa inativada de *C. perfringens*, na qual pelo menos a maioria das células que produzem a toxina foram removidas (isto é, mais de 70% das células tendo sido removidas e, em uma concretização específica, mais de 90% das células tendo sido removidas). Em uma concretização específica, a toxina alfa do *C. perfringens* foi secretada no meio de cultura, por células do *C. perfringens* que foram acrescentadas e/ou cultivadas naquele meio de cultura e, em seguida, inativadas. Em outra concretização, a toxina alfa inativada do *C. perfringens* inclui a toxina alfa do *C. perfringens* associada às células que foram liberadas por lise celular e inativadas em seguida. Os meios de preparo do "sobrenadante de toxóide alfa" não pretendem de forma alguma ficarem restritos a qualquer processo em particular de remoção das células ou de restos

celulares da solução, e incluem centrifugação, cromatografia em coluna, ultrafiltração, etc.

Conforme utilizada no presente, uma solução "livre de células" é aquela em que mais de 90% das células de uma cultura foram removidas.

- 5 Os meios de preparado da solução "livre de células" não pretendem de forma alguma ficarem restritos a qualquer processo em particular de remoção das células ou de restos celulares da solução, e inclui centrifugação, cromatografia em coluna, ultrafiltração, etc.

- Conforme utilizado no presente, o termo "único Tipo de *C. perfringens*" refere-se a um Tipo de *C. perfringens*, por exemplo, Tipo A ou Tipo B ou Tipo C, etc., ao contrário de múltiplos Tipos, por exemplo, Tipo A e Tipo B e Tipo C. Por conseguinte, uma célula, composição, preparado, vacina, etc., compreendendo um toxóide alfa contra "um único Tipo de *C. perfringens*" é uma célula, sobrenadante, composição, preparado, vacina, etc., que
- 10 contém toxóide alfa proveniente de um único Tipo específico de *C. perfringens* e não contém toxóide alfa proveniente de qualquer outro Tipo de *C. perfringens*. Por outro lado, estas células, sobrenadantes, composições, preparados, vacinas, etc., podem conter outros componentes diferentes de toxóide alfa, incluindo outros toxóides contra *C. perfringens* e/ou adjuvantes,
- 15 e/ou estimuladores imunológicos, etc.
- 20

- Conforme utilizada no presente, uma "unidade antitoxina" ou "A.U." de anticorpo antitoxina alfa por ml de anti-soro é utilizada alternadamente com unidades de "Teste Neutralizante de antitoxina alfa" ou unidades de "TNT", e é definida pela capacidade do soro de neutralizar os efeitos tóxicos da toxina alfa em um ensaio biológico com camundongos. Neste teste,
- 25 uma quantidade conhecida de toxina alfa, estabelecida por padrões internacionais [Farmacopéia Européia 5.0.: 01/2005:0088, páginas 803-804] é misturada a uma série de diluições de soro obtido de animais vacinados. A mistura é incubada por uma hora em temperatura ambiente e, em seguida, injetada por via intravenosa em camundongos. Os camundongos sobreviverão
- 30 se a toxina for completamente neutralizada pelo soro, em caso contrário, morrerão. As unidades ou título de antitoxina são determinados como o nú-

mero inversamente proporcional à diluição mais alta do soro que neutralizou a toxina.

Conforme utilizado no presente, o termo "Poder Total Combinado" é abreviado por "TCP" e definido conforme descrito por Batty [*Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology*, Capítulo 8, Volume 5A (1971), ed. JR Norris e DW Ribbons]. Neste ensaio, um volume específico do sobrenadante contendo toxóide alfa é posto em contato com uma quantidade conhecida de antitoxinas. Após um período de incubação apropriado, para permitir que a antitoxina e o toxóide alfa se liguem, por exemplo, uma hora em temperatura ambiente, uma quantidade conhecida de toxina alfa é acrescentada. É fornecido então um período adequado ao restante de antitoxina livre para se ligar com a toxina alfa, por exemplo, uma hora em temperatura ambiente. A quantidade de toxina alfa livre é determinada em seguida pelo acréscimo de um substrato à solução para medir a atividade enzimática da toxina alfa. Substratos adequados incluem hemácias (principalmente hemácias de ovelha) e lecitina. O toxóide alfa pode então ser quantificado pelo cálculo da quantidade de atividade enzimática determinada. Quanto maior a quantidade presente de toxóide alfa na solução do ensaio, mais alto o valor da atividade enzimática medido no ensaio.

Os termos "Tipo" e "biotipo" são utilizados no presente alternadamente e referem-se ao fenótipo específico de um *C. perfringens* tendo como base a expressão de vários genes de toxinas. O *Clostridium perfringens* é dividido em tipos, baseado na produção de quatro toxinas principais, alfa, beta, épsilon e iota. O *C. perfringens* Tipo A produz toxina alfa; o Tipo B produz toxinas alfa, beta e épsilon; o Tipo C produz toxinas alfa e beta, o Tipo D produz toxinas alfa e épsilon, o Tipo E produz toxinas alfa e iota. Foram descritas 17 exotoxinas de *C. perfringens*. A classificação de biótipos de *C. perfringens* baseia-se na produção de algumas ou de todas as outras toxinas e/ou enzimas clostridianas. Por exemplo, um tipo patológico enterotoxigênico do *C. perfringens* Tipo A produz toxinas teta e um, além da toxina alfa.

Conforme utilizada no presente, uma vacina multivalente é uma

vacina que compreende dois ou mais antígenos diferentes. Em uma concretização específica deste tipo, a vacina multivalente estimula o sistema imunológico do recipiente contra dois ou mais patógenos diferentes.

O termo "adjuvante" e "estimulador imunológico" são utilizados no presente alternadamente e definidos como uma ou mais substâncias que ocasionam estimulação do sistema imunológico. Nesse contexto, um adjuvante é utilizado para intensificar uma resposta imunológica a um ou mais antígenos da vacina. Um adjuvante pode ser administrado para o animal visado antes, em combinação ou após a administração da vacina. Adjuvantes da presente invenção podem ser obtidos de algumas origens, incluindo a partir de origem natural, origem recombinante e/ou sintetizados quimicamente, etc. Exemplos de compostos químicos utilizados como adjuvantes incluem, entre outros, compostos de alumínio, óleos que podem ou não ser metabolizados, polímeros em bloco, ISCOM (complexos estimuladores imunológicos), vitaminas e minerais (incluindo, entre outros: vitamina E, vitamina A, selênio e vitamina B12), Quil A (saponinas) e CARBOPOL®. Exemplos adicionais de adjuvantes, os quais às vezes foram referidos especificamente como estimuladores imunológicos incluem componentes de parede celular de bactérias e de vírus (por exemplo, lipopolissacarídeos, lipoproteínas, glicoproteínas, muramipeptídeos, beta-1,3/1,6-glucanos), vários complexos de carboidratos derivados de plantas (por exemplo, glicanos, acemannan), várias proteínas e peptídeos de origem animal (por exemplo, hormônios, citocinas, fatores co-estimuladores) e novos ácidos nucleicos derivados de vírus e de outras fontes (por exemplo, RNA de dupla fita, CpG). Além disso, qualquer número de combinações das substâncias supramencionadas pode prover um efeito adjuvante e pode, por conseguinte, formar um adjuvante da presente invenção.

Conforme utilizada no presente, uma "antitoxina alfa" é um anticorpo (monoclonal ou policlonal) que se liga à toxina alfa. Anticorpos contra toxina alfa podem ser determinados por um ensaio de TNT conforme descrito acima. Alternativamente, anticorpos podem ser detectados por sua capacidade de bloquearem o efeito hemolítico da toxina alfa. Em um ensaio de

inibição de hemólise, uma quantidade conhecida de toxina alfa, suficiente para catalizar a lise de um preparado específico de hemácias de ovelhas, é misturada a uma série de diluições de soro e incubada por uma a uma hora em $36 \pm 2^\circ\text{C}$. A mistura é em seguida incubada com hemácias de ovelhas a 0,5% por três horas em $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Quando o anticorpo liga-se à toxina alfa, a toxina é incapaz de hemolisar as hemácias. O título é determinado pelo valor inversamente proporcional à diluição mais alta do soro que resultar em ausência de hemólise. Em um ensaio semelhante, a capacidade de anticorpos de se ligar à toxina alfa para inibir a atividade de fosfolipase pode ser medida pela determinação da diluição mais alta do soro que bloqueia a clivagem da lecitina.

Conforme utilizado no presente, o termo "polipeptídeo" é utilizado, alternadamente, com o termo "proteína" e pretende ainda incluir peptídeos. Por conseguinte, conforme utilizado no presente, um polipeptídeo é um polímero de dois ou mais aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Polipeptídeos da presente invenção incluem proteínas que ocorrem naturalmente; proteínas recombinantes, proteínas sintetizadas quimicamente; fragmentos de proteínas naturais, recombinantes ou sintéticas, além de proteínas de fusão que compreendem qualquer proteína natural, recombinante e/ou sintética e/ou quaisquer de seus fragmentos. Preferencialmente, o termo polipeptídeo é utilizado para definir um polímero compreendendo vinte ou mais resíduos de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas.

Uma "seqüência heteróloga de nucleotídeos", conforme utilizada no presente, é uma seqüência de nucleotídeos que foi acrescentada por processos recombinantes a uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína da presente invenção, por exemplo, uma toxina alfa da presente invenção, ou que codifica um fragmento da mesma (por exemplo, um fragmento antigênico inativo), para formar um ácido nucléico que não é formado naturalmente na natureza. Estes ácidos nucléicos podem codificar proteínas de fusão. Ademais, conforme utilizada no presente, uma seqüência heteróloga de nucleotídeos não precisa ser uma seqüência contígua de nucleotídeos, porém pode incluir múltiplas seqüências não contíguas de nucle-

otídeos que foram combinadas a uma seqüência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo da presente invenção, ou uma porção do mesmo. Uma seqüência heteróloga de nucleotídeos pode compreender seqüências não codificadoras, incluindo sítios de restrição, sítios de regulação, promotores e similares. Em ainda outra concretização, a seqüência heteróloga de nucleotídeos pode funcionar como meio de detecção de uma seqüência de nucleotídeos da presente invenção. A presente invenção provê seqüências heterólogas de nucleotídeos que, quando combinadas a seqüências de nucleotídeos, codificam um polipeptídeo da invenção ou um fragmento do mesmo, e são necessárias e suficientes para codificar todas as proteínas de fusão da presente invenção.

Conforme utilizada no presente, uma vacina "constituída essencialmente de" ou que "consiste essencialmente em" um toxóide alfa contra um único Tipo de *C. perfringens* e/ou fragmento antigênico do toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou fragmento antigênico inativo da toxina alfa correspondente é uma vacina que contém uma quantidade imunologicamente eficaz do toxóide alfa contra o único Tipo de *C. perfringens* e/ou fragmento antigênico do toxóide alfa contra *C. perfringens* e/ou fragmento antigênico inativo da toxina alfa correspondente, para proteger contra uma doença clostridiana, porém não contém uma quantidade imunologicamente eficaz de qualquer outro antígeno conhecido que proteja contra uma doença clostridiana, como outro antígeno do *C. perfringens* ou toxina alfa, toxóide alfa ou fragmento dos mesmos de outro Tipo de *C. perfringens*. Estas vacinas podem incluir ainda antígenos relacionados a outras doenças como antígenos virais do vírus da doença infecciosa da bursa, reovírus e vírus da doença de Newcastle; antígenos bacterianos de *E. coli*, *Salmonella*, e *Campylobacter*, e antígenos parasitários como os de *Eimeria*.

Conforme utilizado no presente, o termo "aproximadamente", quando utilizado em conjunto com um valor particular de dose, significa que o valor da dose inclui 20 por cento do valor indicado, por exemplo, uma dose de aproximadamente 0,5 ml pode compreender entre 0,4 ml e 0,6 ml.

Isolamento de *C. Perfringens* Tipo A

Isolados de *C. perfringens*, como de *C. perfringens* Tipo A, podem ser obtidos de amostras de fezes e/ou esfregaços intestinais de animais infectados. As amostras/esfregaços podem ser aplicadas sobre placas de Ágar sangue, incubados sob condições anaeróbicas em $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24-48 horas e as colônias que se parecem com as de *C. perfringens* tipo A são coletadas individualmente. Para confirmar a sua identificação como isolado(s) de *C. perfringens* tipo A, as colônias selecionadas podem ser ainda testadas quanto a características bioquímicas do *C. perfringens* tipo A, incluindo constituição genética.

A presença do gene da toxina alfa no isolado pode ser determinada por análise genética, por exemplo, por PCR. A expressão da toxina alfa pode ser demonstrada por sua atividade de lecitinase em um ensaio utilizando gema de ovo e/ou por ensaio de hemólise empregando hemácias de ovelhas. Em uma concretização específica, isolados de *C. perfringens* que expressam um nível alto de toxina alfa são utilizados no preparo de uma vacina da presente invenção. Um isolado ou mais selecionados de *C. perfringens* podem crescer anaerobicamente em caldo nutritivo por 4-24 horas. A cultura pode ser inativada com, por exemplo, formalina, concentrada e misturada a esta vacina.

Toxinas do *C. Perfringens*

Toxina alfa – A toxina alfa é produzida por todos os tipos de *C. perfringens*. A toxina alfa é uma fosfolipase C multifuncional que pode dividir a lecitina, formando fosforilcolina e um diglicerídeo. Quando administrada por via intravenosa, a toxina alfa demonstrou ser letal para camundongos. A toxina alfa é também acentuadamente hemolítica. No entanto, a susceptibilidade das hemácias pode variar imensamente dependendo da espécie de animal utilizada como a fonte das hemácias. A toxina alfa também acarreta a agregação de plaquetas, a lise de plaquetas, leucócitos e de outras células do corpo, bem como ocasiona aumento da permeabilidade vascular.

Toxina beta – A toxina beta é produzida por *C. perfringens* Tipos B e C. A toxina beta é responsável pela inflamação do intestino e perdas

volumosas de muco, bem como pela inibição do movimento intestinal. Ela é uma proteína com peso molecular de 35 kDa e muito mais susceptível a enzimas proteolíticas, como tripsina, do que outras toxinas do *C. perfringens*. De acordo com o relatado, esta toxina é letal para animais, sendo camundongos os mais sensíveis e galinhas, as menos sensíveis.

Toxina beta 2 – A toxina beta 2 é a toxina mais recentemente descoberta do *C. perfringens*. Apesar da semelhança de nomes, não foi constatada homologia entre a sequência de aminoácidos da toxina beta 2 e da toxina beta. A literatura mostrou haver uma forte relação entre a toxina beta 2 e enterite necrosante em certos animais [Garmory *et al.*, *Epidemiol. Infect.* 124:61-67 (2000), Herholz *et al.*, *J. Clin. Micro.* Feb:358-361 (1999)]. A toxina beta 2 possui 28 kDa de peso molecular e foi constatado que ela era letal para camundongos e citotóxica para certas linhagens celulares, induzindo ao arredondamento e lise das células sem afetar o citoesqueleto de actina [Manteca *et al.*, *Vet. Microb.* 86:191-202 (2002), Schotte *et al.*, *J. Vet Med B* 51:423-416 (2004), Gilbert *et al.*, *Gene* 203:65-73 (1997)].

Enterotoxina – A enterotoxina é produzida tipicamente por cepas do *C. perfringens* Tipo A. A presença da enterotoxina foi tradicionalmente utilizada para delinear cepas associadas à doença entérica daquelas associadas à gangrena gasosa tecidual. As cepas que provocam gangrena gasosa não possuem tipicamente enterotoxina. A enterotoxina é uma proteína sensível ao calor com peso molecular de 34 kDa. A dose letal para camundongos é de aproximadamente 10 microgramas. Inicialmente, a interação forma poros na célula do hospedeiro, seguido por alteração da permeabilidade celular, inibição da síntese de macromoléculas, desintegração do citoesqueleto e, finalmente, lise [consultar, Songer, *Clin. Micro. Rev.* 9(2):216-234 (1996)]. A enterotoxina afeta o sentido inverso do transporte líquido nas células do intestino.

Toxina épsilon – Esta toxina é produzida por *C. perfringens* Tipos B e D. A toxina épsilon é secretada sob a forma de pró-toxina, convertida pela tripsina endógena em uma neurotoxina extremamente potente. Quando administrada por via intravenosa, esta toxina pode ser extremamen-

te letal para camundongos. A toxina épsilon possui uma alta afinidade pelo tecido nervoso e tem como efeito a permeabilidade vascular. Ela altera também a permeabilidade da parede do intestino, permitindo a entrada de moléculas grandes, inclusive a sua, na circulação sangüínea. A toxina épsilon segue, em seguida, pela circulação sangüínea até o cérebro onde provoca o 5
desequilíbrio osmótico. Este desequilíbrio osmótico no cérebro leva a sinais neurológicos, observados antes da morte do animal acometido.

Toxina kapa – Esta toxina é uma enzima com capacidade para hidrolisar colágeno, produzida por *C. perfringens* Tipos A, D, E e alguns Tipos B e C. A toxina kapa possui peso molecular de 80 kDa e é letal para 10
camundongos. A injeção intravenosa da toxina kapa, em um camundongo, levou à morte em uma hora em decorrência da intensa hemorragia dos pulmões.

Toxina teta – A maioria das cepas de *C. perfringens* produz toxina teta. Esta toxina é uma proteína de 74 kDa, responsável pelas zonas claras de hemólise observadas em volta de colônias em placas de ágar sangue. A toxina teta purificada é extremamente letal para camundongos, levando à morte em questão de minutos. Ela é inibida por certos esteróides, sendo o 15
colesterol o inibidor mais potente.

20 Imunidade passiva

A presente invenção inclui uma vacina contendo um preparado seguro e imunologicamente eficaz de uma quantidade mínima de um antígeno da presente invenção, por exemplo, um toxóide alfa, para vacinação de fêmeas não humanas, principalmente fêmeas férteis e/ou prenhas, que podem então transferir o efeito da vacina para sua prole. Esta transferência de 25
imunidade materna para progênie é denominada "imunidade passiva". A imunidade passiva pode ser obtida, *inter alia*, pela ingestão de colostro, conforme ocorre em mamíferos, ou a capacidade de absorção de anticorpos, com entrada na circulação sangüínea vindos da gema de ovo, conforme ocorre em aves domésticas. Além disso, conforme exposto no presente pedido, 30
as aves domésticas podem consumir anticorpos em ovo, resultando em aumento do nível de anticorpos sistêmicos circulantes.

Como demonstrado no presente, a transferência passiva de uma quantidade específica de antitoxina alfa para o animal recém-nascido protege este recém-nascido contra um ataque de um *Clostridium perfringens* virulento. A extensão da proteção, conforme exposta abaixo, foi inteiramente inesperada, uma vez que até esta data, acreditava-se ser obrigatório para uma proteção significativa contra um ataque oral de *C. perfringens* Tipo A que o intestino tivesse que ser banhado com anticorpos. Da mesma forma, é bastante surpreendente que existisse uma correlação entre transferência materna de anticorpo de imunidade de mucosa através da ingestão de colostro, no mamífero recém-nascido, e a absorção de anticorpos maternos no ovo.

Como demonstrado abaixo para galinhas, os anticorpos do tipo antitoxina alfa são absorvidos na circulação sangüínea em ovo. Ademais, a presente invenção descreve que a indução de um título definido do anticorpo antitoxina alfa mínimo específico, na circulação sangüínea da galinha, é suficiente para proteger a ninhada daquela galinha vacinada de um ataque de um *C. perfringens* Tipo A, efetuado semanas após o nascimento desta ninhada.

Imunidade ativa

A presente invenção inclui a vacinação de pintos (por exemplo, pintos de granja) e/ou filhotes de peru para conferir imunidade ativa contra enterite necrótica, dermatite necrótica e dermatite gangrenosa. Os pintos e/ou filhotes de peru são vacinados precocemente em vida, aproximadamente com um dia de vida ou ligeiramente mais velhos (na primeira semana de vida) com uma dose única ou duas da vacina. As dosagens apropriadas da vacina para obter-se imunização ativa podem variar de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 0,5 ml. Em uma concretização específica, a dosagem da vacina é de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 0,1 ml.

Cultura de células

O *Clostridium perfringens* secreta toxina alfa no meio durante o crescimento. Após inativação e remoção de pelo menos a maioria das células do meio de crescimento, a solução resultante é referida como sobrena-

dante de toxóide alfa. As células são geralmente removidas para minimizar a presença de antígenos externos na vacina que poderiam promover de outra forma reatividade e diminuir a resposta imunológica. No entanto, a quantidade de toxina alfa associada à célula é limitada. Por conseguinte, o antígeno da toxina alfa pode ser derivado das células e/ou o meio, de forma concentrada ou não concentrada.

O *C. perfringens* pode ser cultivado em qualquer recipiente apropriado, incluindo frascos, tubos, vasilhames ou meios de fermentação mecânicos. A fermentação pode ser monitorada durante o crescimento de forma a ser feita a colheita da fermentação quando a produção de toxina alfa estiver em seu pico. Processos típicos incluem cromatografia por afinidade, eletroforese em gel (sistema PHAST, etc.), imunoenaios e ensaios de hemolisina e lecitinase. O líquido ou extrato da cultura de células pode ser inativado com formaldeído (0,1-2,0%) ou uma combinação de formaldeído e calor. Outras substâncias químicas tipicamente utilizadas para desnaturação de proteína e que podem ser empregadas também incluem, entre outros: glutaraldeído, fenol, vários detergentes como Triton X-100, Sulfato de dodecil sódico (SDS), e álcoois. Os níveis residuais de formaldeído podem ser monitorados durante a inativação para manter um nível ideal sem produção excedente ou insuficiente de toxóide. Processos típicos para determinação de formaldeído livre são listados na Farmacopéia Européia (01/2005:20418) ou em 9 CFR (113.100). Há disponíveis processos semelhantes para determinação de outros tipos de agentes de inativação de toxinas. Em certas circunstâncias, a toxina alfa é deliberadamente mantida sub-toxóide neste ponto para minimizar a desnaturação de epitopos fundamentais para o desenvolvimento de antitoxinas e, em seguida, tratada posteriormente para neutralização de poder tóxico em um ponto adiante no processo. Outros agentes químicos ou biológicos adequados capazes de inativar a toxina e que podem ser utilizados são glutaraldeído, fenol, vários detergentes como Triton X-100, Sulfato de dodecil sódico (SDS) e álcoois.

O toxóide alfa resultante pode ser armazenado, sem efeitos nocivos, por um período de tempo antes de qualquer processamento adicional.

Tipicamente, o armazenamento ideal é em 2-8°C. Toxóides inativados contra clostrídios, no entanto, são extremamente estáveis e podem ser armazenados em temperatura mais alta. Para períodos de armazenamento superiores a 6 meses em temperaturas superiores a 8°C, pode ser recomendável repetir o teste da potência do toxóide, fazendo-se um teste de Poder Total Combinado (TCP) ou outro ensaio imunológico semelhante para determinar a estabilidade imunogênica do toxóide.

As células podem ser removidas do meio de cultura inativado por centrifugação e/ou filtração para obter o sobrenadante do toxóide. A remoção das células serve para reduzir a reatividade de tecidos que pode ser causada pelos componentes celulares, enquanto que a remoção de antígenos externos do preparado ajuda a fazer com que a resposta imunológica fique voltada para o componente toxóide da vacina.

O meio de cultura inativado pode ser concentrado por algumas técnicas, incluindo ultrafiltração (preferencialmente utilizando membranas de ultrafiltração com limites para peso molecular inferiores a 30.000) ou por liofilização. O processo de concentração pode incluir diafiltração em uma solução aquosa (por exemplo, solução salina com tampão fosfato), visando remover contaminantes de baixo peso molecular do preparado. O líquido concentrado pode ser tratado uma ou mais vezes com formaldeído e/ou calor até que um ensaio adequado indique não haver mais toxicidade no líquido. Estes ensaios incluem um ensaio biológico com camundongo, isto é, a injeção do líquido no camundongo e a observação de seus efeitos sobre o camundongo ou a determinação da atividade da hemolisina ou da lecitinase, etc.

O pH da solução pode precisar ser ajustado antes de ser efetuada a mistura para assegurar uma ligação ideal aos adjuvantes, emulsificação com óleos e/ou estabilidade da solução. O ponto isoelétrico (pI) da toxina alfa é de aproximadamente 5,5 [Smith *et al.*, *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, (3rd Ed.) Charles Thomas Publishers, p. 116 (1984)]. O ajuste do pH da solução do toxóide alterará a carga final sobre a proteína, intensificando vantajosamente a ligação de certos adjuvantes, como adjuvantes de alumí-

5 nio. O pH pode ser ajustado também para um nível que aumente a estabilidade do toxóide alfa para armazenamento por um período de tempo prolongado. Por exemplo, as proteínas são mais propensas a precipitar em uma solução que tenha o seu *pI*, porém são geralmente estáveis em pH com 1 unidade acima ou abaixo desse valor.

Ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da invenção

10 Um ácido nucleico, como um cDNA, que codifica um polipeptídeo da presente invenção, pode ser utilizado para gerar células recombinantes do hospedeiro bacteriano que expressem uma proteína e/ou antígeno da presente invenção, por exemplo, a toxina alfa. Estas células recombinantes do hospedeiro podem ser inativadas, isto é, convertida em bacterinas, e utilizadas em composições imunogênicas como vacinas.

15 Ademais, a obtenção e/ou construção de um ácido nucleico que codifique um polipeptídeo da presente invenção, inclui aqueles que codificam uma toxina alfa da presente invenção, ou um fragmento antigênico inativo da mesma, pode facilitar a produção da toxina alfa, toxóide alfa ou de fragmentos dos mesmos. A toxina alfa, toxóide alfa e/ou fragmentos antigênicos de qualquer um destes são úteis para produção de certas vacinas da presente invenção.

20 De acordo com o mesmo, a presente invenção inclui construtos de ácidos nucleicos que permitem a expressão e isolamento das proteínas e/ou fragmentos antigênicos da presente invenção. Sequências para estes ácidos nucleicos e proteínas recombinantes correspondentes dos antígenos a serem utilizados nesta caracterização da presente invenção são bem-
25 conhecidos para o versado na técnica. Uma amostra pequena dos antígenos que podem ser utilizados nas vacinas da presente invenção, juntamente com o seu número de acesso no GenBank e um artigo científico expondo suas sequências de aminoácidos são providos abaixo.

Exemplos de antígenos que podem ser utilizados em vacinas

Fonte Antígeno	Nº de acesso	¹ Artigo
<i>C. PERFRINGENS</i>		
Toxina alfa	CAA35186	Saint-Joanis <i>et al.</i> , <i>Mol. Gen. Genet.</i> 219 (3):453-460 (1989)
Beta toxina	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 épsilon	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 kapa	NP_561089	Shimizu <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 99 (2): 996-1001 (2002)
Toxina lâmbda	CAA35187	Saint-Joanis <i>et al.</i> , <i>Mol. Gen. Genet.</i> 219 (3):453-460 (1989)
Toxina teta	NP_561079	Shimizu <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 99 (2): 996-1001 (2002)
<i>C. DIFFICILE</i>		
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)
<i>C. SEPTICUM</i>		
Toxina alfa	AAB32892	Ballard <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> 63 (1): 340-344 (1995)
<i>C. NOVI</i>		
Toxina alfa	AAB27213	Ball <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> 61 (7): 2912-2918 (1993)

¹ Estas seqüências providas nestes artigos são aqui incorporadas por referência.

Os ácidos nucléicos que codificam antígenos protéicos que podem ser utilizados nas vacinas da presente invenção podem conter ainda seqüências heterólogas de nucleotídeos. Para expressar uma proteína recombinante da presente invenção na célula de um hospedeiro, pode ser
5 construído um vetor de expressão compreendendo o cDNA correspondente. A presente invenção, portanto, inclui vetores de expressão contendo ácidos nucléicos que codificam proteínas recombinantes da presente invenção, incluindo variantes das mesmas.

Em resultado à degeneração de seqüências de nucleotídeos de
10 codificação, outras seqüências de nucleotídeos que codificam substancialmente as mesmas seqüências de aminoácidos, como um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo da presente invenção, podem ser utilizadas na prática da presente invenção. Elas incluem, entre outros, genes alelos, genes homólogos de outras cepas e/ou aquelas alteradas pela substituição de có-
15 dons diferentes que codificam o mesmo resíduo de aminoácido dentro da seqüência, produzindo desse modo uma modificação silenciosa. Células hospedeiras, compreendendo os vetores de expressão da presente invenção também são incluídas. Uma célula hospedeira comumente utilizada é uma célula de *E. coli*.

20 Processos gerais para clonagem de cDNAs e expressão de suas proteínas recombinantes correspondentes já foram descritos [consultar Sambrook e Russell, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L.I. (2000)].

Ademais, qualquer técnica para mutagênese, conhecida na técnica, pode ser utilizada para modificar uma toxina alfa nativa da presente
25 invenção, incluindo, entre outras, mutagênese *in vitro* em sítio direcionado [Hutchinson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 253:6551 (1978); Zoller and Smith, *DNA*, 3:479-488 (1984); Oliphant *et al.*, *Gene*, 44:177 (1986); Hutchinson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:710 (1986); Wang and Malcolm, *BioTechniques* 26:680-682 (1999), os conteúdos dos quais são aqui incorporados, em
30 sua totalidade, por referência neste pedido de patente]. O uso de agentes de ligação TAB@ (Pharmacia), etc. e de técnicas de PCR podem ser empregados

também para mutagênese em sítio direcionado [consultar Higuchi, "*Using PCR to Engineer DNA*", em *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Capítulo 6, pág. 61-70 (1989)].

5 Polipeptídeos da presente invenção

A presente invenção inclui polipeptídeos isolados e/ou recombinantes, incluindo as toxinas alfas e toxóides alfas da presente invenção, variantes de cepas dos mesmos, fragmentos antigênicos inativos dos mesmos e proteínas de fusão dos mesmos. Ademais, polipeptídeos contendo seqüências alteradas em que resíduos de aminoácidos, funcionalmente equivalentes, são substituídos por aqueles contidos na seqüência de aminoácidos do tipo selvagem, resultando em uma substituição conservadora de aminoácidos, são incluídos também pela presente invenção.

Por exemplo, um ou mais destes resíduos de aminoácidos, contidos na seqüência, podem ser substituídos por outro aminoácido de polaridade similar, que atue como um equivalente funcional, resultando em uma alteração silenciosa. Substitutos de um aminoácido contido na seqüência podem ser selecionados entre outros componentes da classe à qual o aminoácido pertença.

Por exemplo, os aminoácidos não polares incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos de pólo neutro incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os aminoácidos com carga positiva (básicos) incluem arginina e lisina. Os aminoácidos com carga negativa (ácídicos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico.

Trocas de aminoácidos conservadoras particularmente preferidas são:

(a) Lis por Arg ou vice-versa, de forma que uma carga positiva possa ser mantida;

(b) Glu por Asp ou vice-versa, de forma que uma carga negativa possa ser mantida;

(c) Ser por Tr ou vice-versa, de forma que um -OH livre possa

ser mantido;

(d) Gln por Asn ou vice-versa, de forma que um NH_2 livre possa ser mantido; e

(e) Ile por Leu ou por Val ou vice-versa, como aminoácidos hidrofóbicos praticamente equivalentes.

Todos os polipeptídeos da presente invenção, incluindo os fragmentos antigênicos, podem fazer parte de uma proteína de fusão. Em uma concretização específica, um polipeptídeo de fusão é expresso em uma célula procariótica. Este tipo de proteína de fusão pode ser utilizado, por exemplo, para intensificar a antigenicidade de um antígeno ou fragmento do mesmo, para diminuir ou remover a sua toxicidade sem anular a sua antigenicidade ou para isolar um antígeno da presente invenção. O isolamento da proteína de fusão, no último caso, pode ser facilitado pelo uso de uma coluna de afinidade, específica para a proteína/peptídeo que foi fundido ao antígeno. Estas proteínas de fusão incluem: proteína de fusão de glutathione-S-transferase (GST), proteína de fusão de uma proteína de ligação de maltose (MBP), proteína de fusão com tag FLAGG ou proteína de fusão com tag de uma poli-histidina. Sequências específicas de agente de ligação, como um agente de ligação Ser-Gli, podem fazer parte também desta proteína de fusão.

De fato, a expressão de um polipeptídeo de fusão pode facilitar uma expressão estável e/ou permitir a purificação com base nas propriedades da parceira fundida. Dessa forma, a purificação dos polipeptídeos da presente invenção pode ser simplificada pelo uso de proteínas de fusão que possuam afinidade de Tags. Por exemplo, a GST liga glutathione conjugada a uma matriz sólida de sustentação, a MBP liga-se uma matriz de maltose e polihistidina atua como quelante em uma matriz de sustentação de quelação de Ni [consultar Hochuli *et al.*, *Biotechnology* 6:1321-1325 (1998)].

A proteína de fusão pode ser extraída da matriz específica com tampões apropriados, ou pelo tratamento com uma protease, específica para um sítio de clivagem, incorporado geneticamente, entre a toxina alfa, por exemplo, e a sua parceira de fusão. Alternativamente, uma toxina alfa pode

ser combinada com uma proteína marcada, como uma proteína verde fluorescente [Waldo *et al.*, *Nature Biotech.* 17:691-695 (1999); Patente U.S. Nº 5 625 048 e WO 97/26333, cujos conteúdos são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente].

5 Alternativamente ou em acréscimo, outras etapas de cromatografia em coluna (por exemplo, filtração em gel, troca iônica, cromatografia por afinidade, etc.) podem ser utilizadas para purificar os polipeptídeos naturais ou recombinantes da presente invenção (consultar abaixo). Em muitos casos, estas etapas de cromatografia em coluna empregam cromatografia
10 líquida de alto desempenho ou outros processos análogos em vez de os procedimentos mais clássicos à base de gravidade.

Além disso, os polipeptídeos da presente invenção, incluindo as toxinas alfas e fragmentos antigênicos inativados das mesmas podem ser sintetizados quimicamente [consultar, por exemplo, *Synthetic Peptides: A*
15 *User's Guide*, W.H.Freeman & Co., New York, N.Y., pp. 382, Grant, ed. (1992)].

Procedimentos Gerais de Purificação de Polipeptídeos

De maneira geral, as etapas iniciais para purificação de um polipeptídeo da presente invenção podem incluir a inclusão ou exclusão de sal,
20 por exemplo, em fracionamentos de sulfato de amônio; em fracionamentos para exclusão de solvente, por exemplo, uma precipitação por etanol. Ademais, ultracentrifugação de alta velocidade pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas de extração.

Geralmente, um bom isolamento secundário ou etapas de purifi-
25 cação incluem absorção de fase sólida, utilizando gel de fosfato de cálcio, hidroxiapatita ou ligação de fase sólida. A ligação de fase sólida pode ser executada pela ligação iônica, com um agente para troca de anion, como dietilaminoetila (DEAE), ou dietil [2-hidroxipropil aminoetil] (QAE) SEFADEX ou celulose; ou usando um agente para troca de cátion, como carboximetil
30 (CM) ou sulfopropil (SP) SEPHADEX ou celulose. Meios alternativos de ligação de fase sólida incluem a exploração de interações hidrofóbicas, por exemplo, o uso de um suporte sólido, como fenilSefarose e um tampão alta-

mente salino; ligação imunológica por ligação por afinidade, utilizando, por exemplo, um anticorpo antitoxina alfa ligado a um suporte ativado. Outros suportes de fase sólida incluem aqueles contendo corantes específicos ou lectinas, etc.

- 5 Uma outra técnica de suporte de fase sólida, freqüentemente utilizada no final do procedimento de purificação, baseia-se em exclusão por tamanho, como géis de SEFADEX e SEFAROSE. Alternativamente, pode ser empregada uma técnica de membrana pressurizada ou centrifuga, utilizando filtros de membrana para exclusão por tamanho. Geralmente, estes
- 10 dois métodos são utilizados em conjunto.

- Separações de suporte de fase sólida são geralmente executadas em bateladas com centrifugação a baixa velocidade ou por cromatografia em coluna. A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), incluindo técnicas correlatas como FPLC, é atualmente o meio mais comum de reali-
- 15 zação de cromatografia líquida. Técnicas de exclusão por tamanho podem ser executadas também com o auxílio de centrifugação a baixa velocidade. Além disso, podem ser empregadas técnicas de permeação por tamanho, como de eletroforese em gel. Estas técnicas são geralmente executadas em tubos, placas ou por eletroforese capilar.

- 20 Quase todas as etapas envolvendo purificação de polipeptídeos empregam uma solução tamponada. Exceto se especificado de outra forma, são utilizadas geralmente concentrações de sais de tampão de 25-100 mM. Tampões de concentração baixa implicam geralmente concentrações de 5-25 mM. Tampões de concentração alta implicam geralmente concentrações
- 25 do agente do tamponamento entre 0,1 – 2,0 M. Tampões típicos podem ser adquiridos da maioria dos catálogos de produtos bioquímicos e incluem tampões clássicos como de Tris, pirofosfato, monofosfato e difosfato e Bons tampões como de Mes, Hepes, Mops, Tricina e Ches [Good *et al.*, *Biochemistry*, 5:467 (1966); Good and Izawa, *Meth. Enzymol.*, 24B:53 (1972); e
- 30 Ferguson and Good, *Anal. Biochem.*, 104:300 (1980)].

 Há materiais disponíveis para executar todas estas técnicas, provenientes de uma variedade de fontes comerciais como Sigma Chemical

Company em St. Louis, Missouri.

Componentes das vacinas

Toxóide alfa contra *C. Perfringens*: Em concretizações específicas, é vantajoso que a vacina animal contenha a quantidade mínima do toxóide alfa necessária para proteção contra enterite necrótica. Esse nível foi determinado como sendo de 2 unidades de Poder Total Combinado (TCP) por dose, sob as condições específicas exemplificadas abaixo. As unidades de TCP são estabelecidas com base em padrões internacionais [Batty, *Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology*, Capítulo 8, Volume 5A (1971) ed. JR Norris and DW Ribbons] e as vacinas da presente invenção podem ser prontamente misturadas para ser obtida a potência desejada. Mesmo sob estas condições, podem ser utilizadas menos de 2 unidades de 2 TCP se a vacina compreender ainda estimulantes imunológicos. De qualquer modo, é preferível que a vacina resulte em 4 ou mais unidades antitoxina por ml de soro do animal.

Quantificação do toxóide alfa: Geralmente, é recomendável quantificar o toxóide alfa para assegurar a inclusão de níveis ideais na vacina. Um método convencional de quantificar toxóides emprega o teste de Poder Combinado Total (TCP). Nesse ensaio, um volume específico do sobrenadante de toxóide alfa é posto em contato com uma quantidade conhecida de unidades antitoxina. Após prover um período adequado de incubação, para permitir a ligação entre a antitoxina e o toxóide alfa, por exemplo, 0,5 - 2 horas, uma quantidade conhecida de toxina alfa é acrescentada. A seguir, é concedido um período adequado para que a antitoxina livre ligue-se à toxina alfa. A quantidade de toxina alfa livre é, em seguida, determinada pelo acréscimo da solução contendo um substrato para a atividade da fosfolipase C da toxina alfa. Substratos adequados incluem hemácias (principalmente hemácias de ovelha) e lecitina. O toxóide alfa pode ser então quantificado por cálculo com base na quantidade de atividade da fosfolipase C. Quanto maior for a quantidade de toxóide alfa presente na solução do ensaio, tanto maior será a quantidade da atividade da fosfolipase C medida no ensaio. Alternativamente, a determinação pode ser efetuada sem a medição da ati-

vidade da fosfolipase C, por exemplo, pode ser utilizada uma análise de ligação competitiva a anticorpo, incorporando uma etapa de cromatografia, imunoensaio de absorção enzimática direta (ELISA) ou análise de ligação competitiva por um aparelho da Biacore ou similar.

- 5 Antígenos adicionais: As doenças provocadas por Clostrídios ocorrem freqüentemente sob a forma de infecções mistas e o acréscimo, por conseguinte, de toxóides de outros Clostrídios podem reduzir ainda mais a patologia e sinais clínicos. Exemplos não restritivos de toxóides de outros Clostrídios, obtidos de organismos reconhecidamente causadores de enterite gástrica, compreendendo aqueles contra *C. perfringens*, os quais podem ser acrescentados a uma vacina da presente invenção para aumentar a potência contra infecções mistas incluem: toxina beta, toxina beta 2, toxina te-
10 ta, toxina épsilon, enterotoxina, toxina kapa, toxina lâmbda e toxina iota de *C. perfringens*; toxina hemorrágica (HT) e toxina letal (LT) de *C. sordellii*,
15 toxinas A e B de *C. difficile*, toxina alfa de *C. septicum* e toxinas alfa (A) e beta (B) de *C. novyi*.

Antígenos de outras bactérias, vírus, fungos ou parasitas podem ser incluídos também nas vacinas da presente invenção. Estes antígenos incluem toxinas ou toxóides, bactérias e/ou extratos de bactérias, fungos
20 e/ou extratos de fungos; vírus e/ou proteínas virais e/ou proteínas de parasitas. Antígenos apropriados de vírus, bactérias e/ou parasitas, cuja origem é provida no presente, são bem-conhecidos na técnica

Exemplos não restritivos de organismos bacterianos são: *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Chlamydia*, *Erysipelas spp.* *Pasteurella*, *Bordetella* e *Ornithobacterium*.
25

Exemplos não restritivos de toxinas correlatadas são: lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria gram negativa, o qual, notadamente, intensifica a resposta imunológica de vacinas e melhora, desse modo, a produção de
30 antitoxinas contra a toxina alfa do *C. perfringens* e de micotoxinas.

Exemplos não restritivos de vírus apropriados são: Coronavírus, Rotavírus, Astrovírus, vírus semelhante a Enterovírus, Torovírus, Adenoví-

rus, Reovírus, Birnavírus, Herpesvírus, Paramixovírus, Picornavírus, Vírus da Doença de Mareks, Vírus da Enterite Hemorrágica e Vírus da Doença de Newcastle.

- Exemplos não restritivos de parasitas são: *Coccidia*, as espécies de *Eimeria*, por exemplo, e *Cryptosporidia*, [consultar, o pedido de patente US 2004/0018215A1, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente].

Adjuvantes

- Adjuvantes são úteis também para melhorar a resposta imunológica e/ou aumentar a estabilidade de preparados da vacinas. Adjuvantes são tipicamente descritos como estimuladores não específicos do sistema imunológico, porém podem ser úteis também para direcionar ramificações específicas do sistema imunológico. Um ou mais compostos que possuam esta ação podem ser acrescentados à vacina. Portanto, vacinas específicas da presente invenção compreendem ainda um adjuvante. Exemplos de compostos químicos que podem ser utilizados como adjuvantes incluem, entre outros, compostos de alumínio (por exemplo, hidróxido de alumínio), óleos que podem ser metabolizados ou não, óleos minerais, incluindo derivados oleatos de manita em solução de óleo mineral (por exemplo, MONTANIDE ISA 70 da Seppic SA, França), e óleos minerais leves como DRAKEOL 6VR, polímeros em bloco, ISCOM (complexos estimuladores imunológicos), vitaminas e minerais (incluindo, entre outros: vitamina E, vitamina A, selênio e vitamina B12) e CARBOPOL®.

- Outros adjuvantes adequados, referidos às vezes como estimulantes imunológicos, incluem, entre outros: citocinas, fatores de crescimento, quemoquinas, sobrenadantes de culturas celulares de linfócitos, monócitos, células de órgãos linfóides, preparados de células e/ou extratos de plantas, bactérias ou parasitas (*Staphylococcus aureus* ou preparados de lipopolissacarídeos) ou mitogênicos.

- De maneira geral, um adjuvante é administrado ao mesmo tempo em que um antígeno da presente invenção. No entanto, adjuvantes podem também, ou alternativamente, ser administrados em um período de du-

as semanas anteriores à vacinação e/ou por um período de tempo posterior à vacinação, isto é, desde que o antígeno, por exemplo, um toxóide alfa, permaneça nos tecidos.

Preparo de Vacinas

- 5 São providos também processos para produção das vacinas da presente invenção. Em uma concretização, a vacina compreende a mistura de uma combinação imunologicamente eficaz de um antígeno da presente invenção, por exemplo, um sobrenadante de toxóide alfa contra um único Tipo de *C. perfringens* e um adjuvante farmacêuticamente aceitável. A quantidade de toxóide alfa pode ser quantificada para que contenha pelo menos 2 unidades de poder combinado total (TCP) por dose da vacina. O sobrenadante do toxóide alfa pode ser concentrado pra minimizar o tamanho de dose exigido para ser obtida pelo menos 4,0 unidades de antitoxina (A.U.) por ml de anti-soro de um animal vacinado. O acréscimo de outros agentes de modulação imunológica, farmacêuticamente aceitáveis, pode reduzir o TCP exigido para diminuição de menos de 2 unidades por dose, desde que a vacina resulte ainda nas 4,0 A.U. requeridas de anticorpo antitoxina alfa por ml de anti-soro do animal vacinado. Em certas concretizações, o toxóide alfa contra *C. perfringens* é ainda purificado dos sobrenadantes contendo toxóide alfa por técnicas como, por exemplo, entre outras concentração/ultrafiltração, cromatografia e centrifugação.

Administração de Vacinas

- 25 As vacinas podem ser administradas sob forma líquida, de emulsão, pó dessecado e/ou em uma névoa por qualquer via parenteral, via intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, por escarificação, via subcutânea, intramuscular ou inoculada por mucosa, por exemplo, via oral, via intranasal, sob a forma de aerossol, gotas oculares, por administração em ovo ou implantada sob a forma de pó secado por congelamento.

Animais em Pesquisa

- 30 O termo "animal em pesquisa" refere-se a uma espécie de animal capaz de ser infectada por uma bactéria patogênica e em uma concretização específica inclui seres humanos. Animais sujeitos apropriados incluem

também aqueles existentes em ambiente selvagem, doméstico (por exemplo, criados para corte, fornecimento de leite, manteiga, ovos, pele, couro, penas e/ou lã), animais de carga, animais de pesquisa, animais de estimação, bem como aqueles criados para/em zoológicos, habitat selvagem e/ou

5 circos.

Em uma concretização específica, um animal em pesquisa da invenção é um animal "produtor de alimento". Para fins da presente invenção, o termo animal "produtor de alimento" será entendido de forma a incluir todos os animais criados para consumo (por exemplo, perus, galinhas alojadas) ou para produtos de consumo (por exemplo, vacas leiteiras, galinhas poedeiras e similares) por seres humanos e/ou outros animais. Uma lista não abrangente destes animais inclui aves, como aves domésticas, ou seja, galinhas, perus, ganso, avestruz, etc., bovinos (por exemplo, gado, vacas leiteiras, búfalo), ovinos (por exemplo, cabras ou ovelhas), suínos (por exemplo, suíno, leitões e porcos) e eqüinos (por exemplo, cavalos), etc.

Em outra concretização, o animal em pesquisa é um animal de estimação. Para fins da presente invenção, o termo animal "de estimação" será entendido de forma a incluir gatos domésticos (felino), cachorros (canino), espécies de coelho, cavalos (eqüino), roedores (por exemplo, cobaias, esquilos, ratos, camundongos, gerbil e hamsters), primatas (por exemplo, macacos) e aves, como pombos, papagaios, periquitos, araras, canários e similares.

Outros animais também contemplados para se beneficiarem das vacinas da invenção, incluem marsupiais (como cangurus), répteis (como tartarugas de criação), aves de caça, cisnes, ratitas e outros animais domésticos de valor econômico.

Os exemplos a seguir são fornecidos somente a título de exemplificação da presente invenção e não devem ser interpretados de forma a limitar de forma alguma o escopo da invenção.

Exemplos

Exemplo 1

Eficácia da vacina em galinhas alojadas, vacinas por via subcutânea

Sumário

5 A vacinação de galinhas alojadas por via subcutânea, utilizando uma vacina compreendendo toxóide alfa de um único Tipo de *C. perfringens* (Tipo A) resulta em

(i) resposta imunogênica nas galinhas alojadas vacinadas, (ii) uma quantidade expressiva de anticorpo antitoxóide alfa nos ovos das galinhas alojadas vacinadas e (iii) proteção passiva da ninhada nascida subsequentemente das galinhas alojadas vacinadas.

10

Materiais

 Toxóide alfa contra *C. Perfringens* Tipo A: O toxóide alfa contra *C. perfringens* Tipo A é preparado da forma como segue: A cultura de *C. perfringens* Tipo A é cultivada sob condições anaeróbicas em meio de fermentação em larga escala (5000 litros) a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$. Durante a fermentação, é acrescentado hidróxido de sódio para manter o nível de pH em $7,8 \pm 2$. Carboidrato (dextrina) é acrescentado também durante a fermentação (até 1% p/v) para promover o crescimento. São concedidas de 3-6 horas para que a cultura cresça. No final do período de crescimento, é acrescentada uma solução de formaldeído ao meio de fermentação até um nível que final que não exceda 0,5%. As células são removidas por centrifugação e o sobrenadante resultante é filtrado em um filtro de profundidade com poros de tamanho que variam de $0,25 - 2,0 \mu\text{m}$. Durante esse processo, a temperatura é mantida em $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante inativado da cultura é em seguida submetido à diafiltração e concentrado de 10-30 vezes, por ultrafiltração em filtros, cujo limite superior de peso molecular é 20.000. O sobrenadante concentrado é armazenado em $2-8^{\circ}\text{C}$ para mistura futura em vacinas. Antes da mistura, é efetuada a análise do sobrenadante concentrado, quanto à potência, pelo teste de poder combinado (TCP), descrito acima. A potência de cada batelada de toxóide é designada em unidades de TCP por ml.

15

20

25

30

Vacina: O sobrenadante com o toxóide alfa contra *C. perfringens* tipo A é misturado a uma emulsão água em óleo, contendo 4 Unidades de Poder Combinado (TCP) em mol. A emulsão é preparada com 70% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.

5 A fase oleosa é preparada da forma como segue:

Óleo mineral	89,20%
Span 80	10,00%
Álcool benzílico	0,75%
Trietanolamina	0,05%

10 A fase aquosa é preparada da forma como segue:

Toxóide contra <i>C. perfringens</i> tipo A + solução salina	88%
33% de Tween 80/solução salina	12%

No total, 30% de solução aquosa são adicionados lentamente a 70% de fase oleosa e emulsionados com um homogeneizador Silverson (Podem ser utilizados também outros homogeneizadores em linha). A duração da homogeneização depende do volume da emulsão, sendo determinada pela viscosidade, tamanho de partículas e estabilidade da emulsão por pelo menos três dias em 37°C. Gentamicina é acrescentada à fase aquosa de forma que o volume subsequente atinja uma concentração final de até 30 µg/ml. Timerosol é acrescentado à fase aquosa de forma que o volume subsequente atinja uma concentração final de até 0,01%.

25 Vacinação: As galinhas jovens são vacinadas com 0,5 ml por dose da vacina misturada por via subcutânea. A primeira dose é administrada em 14 semanas de vida e a segunda, em 20 semanas de vida. Vinte galinhas são vacinadas com a vacina misturada descrita acima, contendo 1 TCP por dose. Um segundo grupo de vinte galinhas jovens são vacinadas com a vacina descrita acima, contendo 2 TCP por dose. Um terceiro grupo de vinte galinhas jovens são utilizadas como controle e não são vacinadas. No total, 2-3 galos são reunidos a cada grupo de frangas para produção de ovos fertilizados.

Imunidade passiva

São coletados ovos de galinhas controle e vacinadas de 32, 52 e

65 semanas de vida. Os pintos da progênie saídos destes ovos são utilizados para avaliar a proteção passiva conforme relacionado na Tabela 1.

Tabela 1

Número de pintos da progênie utilizados em cada instante

<u>Idade das</u> <u>galinhas</u>	<u>Pintos da progênie</u> <u>no grupo vacinado</u>	<u>Pintos da progênie no</u> <u>grupo de controle testado</u>
32 semanas	9	9
52 semanas	30	20
65 semanas	14	18

- 5 Os pintos foram alimentados com uma dieta rica em proteína sem medicação durante as primeiras duas semanas e, em seguida, esta foi trocada por uma ração normal pelo restante da experiência. A reação de cada ave foi provocada por administração por via oral de *C. perfringens* Tipo A do tipo virulento que expressa a toxina alfa e a toxina beta 2. A dose para esta reação provocada contém $6,3 \times 10^7$ a $6,3 \times 10^8$ de unidades formadoras de colônia por ml, em uma dose de 3 ml. Por 3 dias consecutivos, a reação das aves foi provocada, tendo o teste iniciado quando estas contavam com 18 ou 19 dias de vida. Dois dias após o teste, as aves foram sacrificadas e examinadas em seguida para detecção de lesões de enterite necrótica. Os resultados de eficácia para os pintos da progênie estão relacionados individualmente nas Tabelas 2-4, estipulando o status de vacinação da mãe de cada pinto e a extensão de suas lesões de enterite necrótica, se existentes, de acordo com a Escala de Pontuação fornecida abaixo. A Tabela 2 representa pintos da progênie de galinhas com 32 semanas de vida, a Tabela 3 representa pintos da progênie de galinhas com 52 semanas de vida e a Tabela 4 de pintos da progênie de galinhas com 65 semanas de vida. A Tabela 5 apresenta a pontuação média para pintos da progênie de galinhas que foram vacinadas com 2 TCP por dose. Conforme apresentado, a progênie das galinhas vacinadas está significativamente protegida contra a bactéria administrada do teste em relação à progênie de galinhas não vacinadas.

Escala de pontuação para lesões de enterite necrótica (EN)

0 = Sem lesões evidentes de enterite necrótica no intestino del-

gado; intestino com elasticidade normal (enrola-se após ter sido aberto).

- 5 1 = Parede intestinal fina e flácida (intestino permanece plano quando aberto, não se enrolando de novo para a posição normal); muco excessivo ou espessado cobrindo a membrana mucosa ou hiperemia leve focal ou multifocal da mucosa ou congestão dos vasos de serosas.
- 10 2 = Áreas isoladas ou algumas áreas multifocais de hiperemia e edema da parede intestinal; áreas isoladas ou algumas áreas multifocais de ulceração ou necrose da mucosa intestinal.
- 15 3 = Áreas extensas multifocais de necrose e ulceração da mucosa intestinal $\pm$ hemorragia significativa ou camada de fibrina ou de resíduos necróticos sobre a superfície da mucosa (aspecto de toalha turca).
- 4 = Animal morto com lesões evidentes de enterite necrótica de pontuação 2 ou acima.

Tabela 2

Pontuação individual de lesões de enterite necrótica em pintos da progênie de galinhas com 32 semanas de vida

<u>Controles não</u> <u>vacinados e não</u> <u>provocados</u>	<u>Controle não</u> <u>vacinados</u> <u>provocados</u>	<u>Vacina com</u> <u>1 TCP por dose</u>	<u>Vacina com 2 TCP</u> <u>por 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

Tabela 2 -continuação-

<u>Controles não</u> <u>vacinados e não</u> <u>provocados</u>	<u>Controle não</u> <u>vacinados</u> <u>provocados</u>	<u>Vacina com</u> <u>1 TCP por dose</u>	<u>Vacina com 2 TCP</u> <u>por dose</u>
	4	1	4
		3	
		1	
		1	
		1	
Média= 0	2,0	1,8	1,0
Mediana = 0	2,00	1,0	1,0

Tabela 3

Pontuação individual de lesões de enterite necrótica em pintos da progênie de galinhas com 52 semanas de vida

<u>Controles não</u> <u>vacinados e não</u> <u>provocados</u>	<u>Controle não</u> <u>vacinados</u> <u>provocados</u>	<u>Vacina com</u> <u>2 TCP por 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

Tabela 3 -continuação-

<u>Controles não</u> <u>vacinados e não</u> <u>provocados</u>	<u>Controle não</u> <u>vacinados</u> <u>provocados</u>	<u>Vacina com</u> <u>2 TCP por dose</u>
	1	1
	2	2
	2	0
	1	1
	2	0
	1	0
	1	0
		0
		2
		1
		0
		1
		0
		1
		0
		2
		0
Média= 0	1,7	0,6
Mediana = 0	1,5	0,5

Tabela 4

Pontuação individual de lesões de enterite necrótica em pintos da progênie de galinhas com 65 semanas de vida

<u>Controles não vacinados</u> <u>e não provocados</u>	<u>Controles não</u> <u>vacinados provocados</u>	<u>Vacina com</u> <u>2 TCP por dose</u>
0	4	0
0	0	0
0	0	0
0	2	2

Tabela 4 -continuação-

<u>Controles não vacinados</u> <u>e não provocados</u>	<u>Controles não</u> <u>vacinados provocados</u>	<u>Vacina com</u> <u>2 TCP por dose</u>
	0	2
	0	0
	3	0
	3	3
	2	0
	0	2
	3	0
	2	0
	0	0
	0	0
	0	
	2	
	3	
	3	
Média= 0	1,5	0,6
Mediana = 0	2,0	0,0

Tabela 5

Pontuação mediana em pintos da progênie de galinhas vacinadas com uma dose de 2 TCP

<u>Grupos de</u> <u>tratamento</u>	<u>Pontuação mediana de lesões de enterite</u> <u>necrótica de progênie de galinhas</u>		
	<u>32 semanas</u> <u>de vida</u>	<u>52 semanas</u> <u>de vida</u>	<u>65 semanas</u> <u>de vida</u>
Grupo vacinado	1	0.5	0
Grupo controle	2	1.5	2

Títulos de anticorpos

Soro: Foram coletadas amostras de sangue das galinhas quando estas contavam com 33 e 78 semanas de vida. O sangue é deixado para coagular por 2-4 horas em temperatura ambiente e, em seguida, o soro é obtido após centrifugação. O soro é armazenado em -10°C ou mais frio até que testado em relação ao título de anticorpos. O título de anticorpos para toxina alfa do *C. perfringens* é avaliado por um ensaio de inibição de hemólise, utilizando diluições seriadas e hemácias de ovelhas da forma como segue: Para cada amostra testada, são efetuadas diluições em série (duas vezes) em uma placa de microtitulação com fundo em V. Uma quantidade conhecida de toxina alfa é acrescentada a cada poço contendo uma diluição da amostra. As placas são em seguida incubadas por uma hora em $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para permitir que os anticorpos obtidos do soro formem complexos com a toxina alfa. Após esta incubação, uma solução de hemácias de ovelha a 0,5% é acrescentada aos poços e as placas são incubadas por três horas em $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de forma a permitir que a toxina alfa que não está incluída em um complexo efetue a lise das hemácias. As placas são verificadas em seguida quanto à ausência de hemólise. O valor inverso da diluição mais alta da amostra testada que não apresentou hemólise é considerado o objetivo final. Os títulos de anticorpos são apresentados nas Tabelas 6-8.

Gemas de ovo: As gemas de ovo são processadas para determinar o título de anticorpos. Resumidamente, a gema é separada e misturada com um tampão de extração comercial (Promega EGGstract System, Nº de Catálogo da Promega G1531 e G2610, Madison, Wisconsin). Após a extração, uma pelota de IgY é obtida, a qual é em seguida novamente suspendida ao volume original da gema com solução salina de tampão fosfato. O extrato de gema de ovo é reunido de pelo menos 5 ovos e testado para título de anticorpos usando um ensaio de inibição de hemólise (HI), conforme descrito acima para o soro. Dessa forma, é efetuada a avaliação do título de anticorpos, presentes em gemas de ovos, coletados de posturas em 40, 52 e 65 semanas de vida. Os títulos de anticorpos para as gemas de ovo são apresentados na Tabela 9.

Tabela 6

Título individual de anticorpos de soro de galinha contra toxina alfa do *C. Perfringens* Tipo A em 33 semanas de vida

<u>Galinhas vacinadas</u> (2 TCP/Dose)	<u>Galinhas de controle*</u>
1024	1
8192	2
256	1
1024	2
1024	2
256	2
256	2
1024	2
512	1
64	1

Média geométrica = 588

Média geométrica ≤ 2

*Valores < 2 foram considerados como 1 para o cálculo da média geométrica

5 Tabela 7

Título individual de anticorpos de soro de galinha contra toxina alfa do *C. Perfringens* Tipo A em 78 semanas de vida

<u>Galinhas vacinadas</u> (2 TCP/Dose)	<u>Galinhas de controle*</u>
512	2
32	2
128	2
512	2
128	1
16	1
1024	1
512	2
8192	2
128	4

Tabela 7 -continuação-

<u>Galinhas vacinadas</u> (2 TCP/Dose)	<u>Galinhas de controle*</u>
64	2
512	8
64	16
1024	
256	
128	

Média geométrica = 235

Média geométrica = 2

*Valores < 2 foram considerados como 1 para o cálculo da média geométrica

Tabela 8

5 Média geométrica de título de inibição de hemólise em soro de galinhas em vários instantes

<u>Grupos de tratamento</u>	<u>Título em soro</u> (Idade na coleta de amostra)	
	33 semanas	78 semanas
Grupo vacinado (2 TCP/DOSE)	588	235
Grupo de controle	≤2	2

Tabela 9

Título de inibição de hemólise em gema de ovo de galinhas, coletado em vários instantes

<u>Grupos de tratamento</u>	<u>Título em gema de ovo</u> (Idade na coleta de amostra)		
	40 semanas	52 semanas	65 semanas
Grupo vacinado	515	2048	64
Grupo de controle	≤2	2	≤2

Exemplo 2

Eficácia de vacina em galinhas alojadas, vacinas por via intramuscular

Resumo

5 A vacinação de galinhas alojadas por via intramuscular, utilizando uma vacina compreendendo toxóide alfa de um único Tipo de *C. perfringens* (Tipo A), resultou também em (i) resposta imunogênica nas galinhas alojadas vacinadas, (ii) anticorpo significativo antitoxóide alfa nos ovos das galinhas alojadas vacinadas e (iii) proteção passiva para a ninhada nascida subseqüentemente das galinhas alojadas vacinadas.

10 Imunidade passiva

No total, 14 galinhas jovens são vacinadas por via intramuscular com duas doses de 0,5 ml da vacina do Exemplo 1 acima, contendo 2 TCP. Um grupo adicional de 40 galinhas jovens é utilizado como controle. Três galos são reunidos a cada grupo de galinhas jovens, conforme descrito acima. 15 A primeira dose da vacina é administrada em 10 semanas de vida e a segunda dose, em 23 semanas de vida. Os ovos são recolhidos das galinhas em 32 semanas de vida e chocados para determinar proteção passiva nos pintos da progênie, após um desafio experimental *C. perfringens*.

A Tabela 10 apresenta a incidência de enterite necrótica e a 20 pontuação mediana para suas lesões correspondentes, conforme determinadas pela Escala de Pontuação do Exemplo 1 acima, para os pintos da progênie de galinhas vacinadas e de controle. A Tabela 11 demonstra a pontuação mediana para as lesões de enterite necrótica para cada pinto da progênie. A Tabela 12 lista os títulos de anticorpos contra toxina alfa de *C. perfringens* Tipo de cada pinto da progênie, enquanto que, os títulos de anticorpos 25 para as gemas de ovos de ovos coletados das galinhas vacinadas e de controle, em 32 semanas de vida, são fornecidos na Tabela 13.

Tabela 10

Incidência de doença e de lesão de enterite necrótica

<u>Grupos de</u> <u>tratamento</u>	<u>Número de</u> <u>aves</u>	<u>% de</u> <u>incidência</u>	<u>Pontuação</u> <u>mediana</u>	<u>Pontuação</u> <u>média</u>
Grupo vacinado	8	0 (0/8)	0	0
Grupo de controle	29	76 (22/29)	2	1,7

Tabela 11Pontuação individual de lesões de enterite necrótica em pintos da progênie5 de galinhas com 32 semanas de vida

<u>Controles não vacinados,</u> <u>não testados</u>	<u>Controles não</u> <u>vacinados,</u> <u>testados</u>	<u>Vacina com</u> <u>2 TCP por 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	

Tabela 11 -continuação-

<u>Controles não vacinados,</u> <u>não testados</u>	<u>Controles não</u> <u>vacinados,</u> <u>testados</u>	<u>Vacina com</u> <u>2 TCP por dose</u>
	1	
	3	
	0	
	2	
	0	
	0	
	3	
	2	
	4	
	4	
Média = 0,0	1,7	0,0
Mediana = 0,0	2,0	0,0

Tabela 12

Título individual de anticorpos no soro de galinhas com 35 semanas de idade²

<u>Galinhas vacinadas</u> <u>(2 TCP/Dose)</u>	<u>Galinhas de controle³</u>
128	1
512	1
65536	1
4096	1
1024	1
512	1
2048	1
1024	1
512	2

² Anticorpos contra Toxina Alfa de *C. perfringens* Tipo A, conforme determinados por Ensaio de Inibição de Hemólise descrito no Exemplo 1 acima.

³ Valores < 2 foram considerados 1 para o cálculo da média geométrica.

Tabela 12 - continuação-Galinhas vacinadas(2 TCP/Dose)Galinhas de controle³

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

Tabela 12 - continuação-

<u>Galinhas vacinadas</u> <u>(2 TCP/Dose)</u>	<u>Galinhas de controle</u> ³
	1
	2
	1
	1
	1
Média geométrica = 681	≤ 2

Tabela 13

Título de anticorpos em gema de ovo, coletado de galinhas com 32 semanas de vida

<u>Grupos de tratamento</u>	<u>Título de inibição de hemólise</u>
Grupo vacinado	512
Grupo de controles	<2

5 Exemplo 3

Sorologia em galinhas jovens Leghorn brancas SPF, vacinas por via subcutânea

Títulos de anticorpos

- Os títulos de anticorpos são avaliados em galinhas jovens Leghorn brancas SPF, vacinadas por via subcutânea com a vacina do Exemplo 1 acima, contendo 1, 2 ou 3 TCP. As galinhas jovens são vacinadas com 15 semanas de vida com 0,5 ml da vacina, e uma dose de reforço é administrada 4 semanas após a vacina inicial. Amostras de sangue são coletadas 6 semanas depois da vacina de reforço. É efetuada a avaliação do título de anticorpos presente no soro de cada ave pelo ensaio de inibição de hemólise, conforme descrito acima no Exemplo 1.

Tabela 14

Título individual de anticorpos contra toxina alfa de *C. Perfringens* Tipo A, presentes no soro de galinhas jovens

1 TCP/DOSE		2 TCP/DOSE		3 TCP/DOSE		Controles	
Ident. da ave	Título	Ident. da ave	Título	Ident. da ave	Título	Ident. da ave	Título*
923	4096	932	1024	922	1024	921	4
924	1024	938	8192	927	64	928	<2
925	4	940	512	931	2048	929	2
926	2048	942	1024	935	4096	933	2
930	512	943	2048	945	1024	937	2
941	1024	948	2048	947	2048	946	2
953	32	949	2048	952	1024	957	2
954	2	950	2048	956	128	966	<2
955	32	951	512	959	512		
962	512	958	512	960	64		
965	4096	961	512	963	2048		
967	512	964	2048	968	2048		
Média geométrica	242		1290		724		≤2

* Títulos de <2 são considerados 1 para determinação de média geométrica

5 do título

É efetuada a avaliação do título de anticorpos nos ovos coletados em 25 semanas de vida, de posturas de galinhas Leghorn brancas, por titulação de inibição de hemólise. Os resultados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15

Título de anticorpos de reunião de gemas de ovo contra toxina alfa de *C. perfringens* Tipo A

Grupo	Vacina	Título de anticorpos
1	1 TCP	512
2	2 TCP	512
3	3 TCP	512
4	Controles	<2

Determinação de título de neutralização de toxina (TNT) em soro reunido de

5 galinhas Leghorn brancas

O título de antitoxina contra toxina alfa de *C. perfringens* Tipo A, presente no soro reunido das galinhas, é avaliado utilizando camundongos. A titulação de antitoxina é efetuada por teste do soro reunido, utilizando um método conforme descrito no Código de Normas Federais, Serviço de Inspeção de Animais e Plantas, Departamento de Agricultura. Os métodos utilizados para medir a antitoxina foram semelhantes ao do 9 CFR §113.111 (c), versão corrente, exceto que toxina alfa e reagentes antitoxina são utilizados em vez de toxina beta e antitoxina. São utilizados os seguintes reagentes de teste para determinar o título de antitoxina:

15 1) Antitoxina alfa contra *C. perfringens* Tipo A: IRP 426 (obtida do Centro de Biologia Veterinária, USDA).

2) Toxina alfa de *C. perfringens* Tipo A IRP 446 (obtida do Centro de Biologia Veterinária, USDA).

Resumidamente, antitoxina diluída padrão ou soro são combinados com uma quantidade conhecida de toxina alfa padrão. A presença de toxina não neutralizada é, em seguida, detectada por injeção da mistura em camundongos. A comparação, em relação aos efeitos de quantidades conhecidas de antitoxina alfa padrão sobre a atividade da toxina, é em seguida avaliada pela determinação da diluição do soro padrão ou em teste que protege os camundongos contra morte em um ensaio biológico. O título de antitoxina, no soro reunido de galinhas jovens Leghorn brancas, é apresentado na Tabela 16 abaixo.

Tabela 16

Título de neutralização de toxina (TNT) em galinhas jovens vacinadas e de controle

Grupo	Vacina	Título de antitoxina em soro	
		Pré-vacinação	Pós-vacinação
1	1 TCP	<1	≥2 e <4
2	2 TCP	<1	≥4
3	3 TCP	<1	≥4
4	Controles	<1	<1

Exemplo 4

- 5 Sorologia em galinhas jovens Leghorn brancas SPF, vacinas por via intra-muscular

Títulos de anticorpos

- São avaliados títulos de anticorpos em galinhas jovens Leghorn brancas SPF, vacinadas duas vezes por via intramuscular com a vacina do
- 10 Exemplo 1 acima, contendo 1, 2 ou 3 TCP. As galinhas jovens são vacinadas em dez semanas de vida com 0,5 ml da vacina, e uma dose de reforço é fornecida quatro semanas após a vacina inicial. Amostras de sangue são coletadas, sete semanas após a vacina de reforço. É efetuada a avaliação individual de título de anticorpos no soro reunido por ensaio de inibição de
- 15 hemólise, conforme descrito no Exemplo 1 acima, e apresentados nas Tabelas 17 e 18 abaixo.

Tabela 17

Título individual de anticorpos, presente no soro de galinhas jovens, contra toxina alfa de *C. Perfringens* Tipo A

1 TCP		2 TCP		3 TCP		Controles	
Ident. da ave	Título	Ident. da ave	Título	Ident. da ave	Título	Ident. da ave	*Título
951	256	631	1024	646	4096	661	<2
952	128	632	2048	647	4096	662	<2
953	1024	633	2048	648	2048	663	8

Tabela 17 -continuação-

1 TCP		2 TCP		3 TCP		Controles	
Ident. da ave	Título	Ident. da ave	Título	Ident. da ave	Título	Ident. da ave	*Título
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
Média geom.	540		1024		2580		3

* Títulos <2 são considerados 1 para determinação da média geométrica do título

- 5 O título de neutralização de toxina (TNT), no soro reunido de galinhas, é avaliado utilizando o procedimento conforme descrito no Exemplo 3 acima, e os resultados são fornecidos na Tabela 18 abaixo.

Tabela 18

Título de neutralização de toxina (TNT) em galinhas jovens vacinadas e de controle

Grupo	Vacina	Título de antitoxina em soro	
		Pré-vacinação	Pós-vacinação
1	1 TCP	<1	≥4
2	2 TCP	<1	≥4
3	3 TCP	<1	≥4
4	Controles	<1	<1

O título de anticorpos nos ovos coletados em 25 semanas de vida, destas posturas de galinhas Leghorn brancas, é avaliado por titulação de inibição de hemólise, conforme descrita no Exemplo 1 acima. Os resultados estão resumidos na Tabela 19.

5 Tabela 19

Título de anticorpos de gema reunida de ovo contra toxina alfa de *C. Perfringens*

Grupo	Vacina	Título de anticorpos
1	1 TCP	512
2	2 TCP	256
3	3 TCP	512
4	Controles	<2

Exemplo 5

Comparação de uma vacina multivalente e monovalente de toxóide alfa contra *C. Perfringens* em suínos

10 Sumário

Os métodos são expostos para propiciar proteção passiva em porcos recém nascidos pela vacinação de porcas/fêmeas de javalis prenhas com vacinas de toxóide alfa contra *C. Perfringens* Tipo A da presente invenção. Os resultados revelam uma resposta de anticorpos em porcas que pode ser transferida para sua ninhada através de colostro.

Materiais

Toxóide alfa contra *C. perfringens* Tipo A: Foi preparado toxóide alfa contra *C. perfringens* Tipo A conforme descrito no Exemplo 1 acima.

Vacina: Uma vacina da presente invenção pode ser misturada a toxóide alfa inativado de *C. perfringens* tipo A, contendo > 2 Unidades de Poder Combinado Total. A vacina pode ser misturada a qualquer adjuvante exposto no presente, incluindo emulsão óleo em água, contendo sais minerais, óleos vegetais (óleo de amendoim, óleo de soja), esqualeno, esqualano e outros óleos que podem ser metabolizados. Outros adjuvantes como Seponina, CARBOPOL® e adjuvantes contendo alumínio (hidróxido de alumí-

nio, fosfato de alumínio) podem ser utilizados também no preparo da vacina. A vacina pode conter ainda outros antígenos, incluindo *E. coli* (K88, K99, 987P, Tipo 1), toxóides de *C. perfringens* e/ou toxóides de outras bactérias, incluindo *Clostridium difficile*, rotavírus e/ou *Cryptosporidia*.

5 Administração

As vacinas são administradas a porcas/fêmeas de javali prenhas, antes de parirem os leitões, por via intramuscular ou subcutânea, de forma a fornecerem proteção passiva à ninhada recém nascida, pela ingestão de colostro.

10 Resultados

O estudo é conduzido em porcas com 32 semanas de vida, comparando três vacinas:

Vacina nº 1: misturada com adjuvante hidróxido de alumínio, contendo 4 TCP de toxóide alfa contra *C. perfringens* Tipo A em uma dose de 2 ml.

Vacina nº 2: misturada com 4 TCP de toxóide alfa contra *C. perfringens* tipo A, *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P, *E. coli* Tipo 1 e toxóide beta contra *C. perfringens* tipo C em uma dose de 2 ml.

Vacina nº 3: preparada como vacina de placebo, sem conter toxóide alfa contra *C. perfringens* tipo A, porém contendo *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P, *E. coli* Tipo 1 e toxóide beta contra *C. perfringens* tipo C em uma dose de 2 ml.

Um grupo de dez porcas é vacinado por via intramuscular com 2 ml da Vacina nº 1. Um segundo grupo de dez porcas é vacinado por via intramuscular com 2 ml da Vacina nº 2. O terceiro grupo de sete porcas é vacinado com 2 ml da Vacina nº 3. Uma dose de reforço é fornecida 20 dias depois das vacinas iniciais. As amostras de soro são coletadas no dia da primeira vacina (Dia 0), 20 dias depois da vacina de reforço (Dia 40) e 41 dias depois da vacina de reforço (Dia 61). É efetuada em seguida a avaliação do título de anticorpos contra toxina alfa pelo ensaio de inibição de hemólise, descrito no Exemplo 1 acima. Os resultados para as três vacinas são apresentados individualmente nas Tabelas 20-22, respectivamente.

Tabela 20Vacina monovalente de toxóide alfa contra *C. Perfringens* Tipo A

Título de inibição de hemólise			
Ident. da porca	Dia 0 (Pré-vacina)	Dia 40	Dia 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
Média geom.	12	49	60

Tabela 21Vacina combinada de toxóide alfa contra *C. Perfringens* Tipo A e *E.Coli*-5 Toxóide beta contra *C. Perfringens* Tipo C

Título de inibição de hemólise			
Ident. da porca	Dia 0 (Pré-vacina)	Dia 40	Dia 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

Tabela 21 -continuação-

Título de inibição de hemólise			
Ident. da porca	Dia 0 (Pré-vacina)	Dia 40	Dia 61
10321	16	128	64
10330	4	64	64
Média geom.	8	79	74

Tabela 22

E. Coli – Toxóide beta contra C. Perfringens Tipo C

Título de inibição de hemólise			
Ident. da porca	Dia 0 (Pre-vac)	Dia 40	Dia 61
Grupo 3	Dia 0	Dia 40	Dia 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

Exemplo 6

- 5 Determinação de título de neutralização de toxina (TNT) em soro reunido de porcas vacinadas

Quatro porcas prenhas são separadas uniformemente em dois grupos de tratamento. Um grupo é vacinado por via intramuscular com 2,0 ml de vacina contendo 4 TCP, em uma dose de 2 ml da Vacina nº 1 do Exemplo 5 acima. O outro grupo é o de controle que não é vacinado. As porcas são vacinadas em aproximadamente 6-7 semanas antes de parirem a ninhada, e uma dose de reforço é fornecida três semanas mais tarde. Amostras de sangue são coletadas antes da vacina e imediatamente antes de pa-

rirem a ninhada. A Tabela 23 apresenta a avaliação das amostras de soro para título de antitoxina contra toxina alfa, utilizando um teste de neutralização de toxina (TNT), conforme descrito no Exemplo 3 acima.

Tabela 23

5 Título de TNT

Grupo de tratamento	Número da porca	Pré-vacinação (TNT)	Pós-Vacina de reforço (TNT)
Vacinada	10614	<1	>4 <8
Vacinada	10616	<1	>4 <8
Controle	10615	<2	<2
Controle	10617	<1	<2

O escopo da presente invenção não está restrito às concretizações específicas descritas no presente pedido. De fato, várias modificações da invenção, além daquelas descritas no presente, se tornarão aparentes para aqueles versados na técnica, a partir da descrição precedente. Há a
 10 intenção de que estas modificações enquadrem-se no escopo das reivindicações anexadas.

Deverá ainda ser entendido que todos os tamanhos de bases ou tamanhos de aminoácidos, além de todos os pesos moleculares e valores de massa, fornecidos para ácidos nucleicos ou polipeptídeos, são valores apro-
 15 ximados e fornecidos a título de descrição.

Várias publicações são citadas no presente, sendo a descrição das mesmas aqui incorporadas, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina compreendendo um antígeno selecionado do grupo consistindo em toxóide alfa contra *C. perfringens*, fragmento antigênico de toxóide alfa contra *C. perfringens*, fragmento antigênico inativo de toxina alfa de *C. perfringens* e qualquer combinação dos mesmos;
em que uma a duas doses de 0,25 – 0,6 ml, por dose da vacina, é suficiente para induzir a produção de, pelo menos, quatro unidades antitoxina (U.A.) de anticorpo antitoxina alfa, por ml de anti-soro, em uma galinha vacinada com a vacina.
2. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que o antígeno é um preparado livre de células.
3. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que o antígeno é um toxóide alfa em um sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens*.
4. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que o antígeno é um polipeptídeo recombinante.
5. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que o referido antígeno possui 2 ou mais TCP.
6. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que o referido antígeno é selecionado do grupo consistindo em um toxóide alfa Tipo A contra *C. perfringens* e um toxóide alfa Tipo C contra *C. perfringens*.
7. Vacina de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda um adjuvante.
8. Vacina de acordo com a reivindicação 7, em que uma emulsão água-em-óleo compreende o antígeno e o adjuvante.
9. Vacina de acordo com a reivindicação 8, em que a emulsão água-em-óleo foi preparada com 70% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.
10. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que o antígeno é um toxóide Tipo alfa contra *C. perfringens*; com a ressalva de que somente um único toxóide Tipo alfa contra *C. perfringens* está presente na referida vacina.
11. Vacina de acordo com a reivindicação 10, em que o referido toxóide alfa compreende um sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens*.

12. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que uma vacina multivalente compreende ainda uma ou mais das seguintes toxinas: toxina beta de *C. perfringens*, toxina beta 2 de *C. perfringens*, enteroxina de *C. perfringens*, toxina épsilon de *C. perfringens*, toxina iota de *C. perfringens*, toxina kapa de *C. perfringens*, toxina lâmbda de *C. perfringens*, toxina teta de *C. perfringens*, toxina C hemorrágica de *C. sordellii*, toxina letal de *C. sordellii*, toxina A de *C. difficile*, toxina B de *C. difficile*, toxina alfa de *C. septicum*, toxina alfa de *C. novyi* e toxina beta de *C. novyi*.

13. Vacina de acordo com a reivindicação 12, em que a vacina multivalente compreende ainda um ou mais antígenos virais, um ou mais antígenos bacterianos e um ou mais antígenos parasitários;

em que o único ou mais antígenos virais são provenientes de uma ou mais das seguintes fontes: vírus da doença infecciosa bursal, reovírus e vírus da doença de Newcastle;

em que o único ou mais antígenos bacterianos são provenientes de uma ou mais das seguintes fontes: *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*, e em que o único ou mais antígenos parasitários são provenientes de parasitas do gênero *Eimeria*.

14. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que uma vacina multivalente compreende ainda um ou mais antígenos adicionais;

em que o antígeno adicional é proveniente de uma ou mais das seguintes fontes: vírus da doença infecciosa bursal, reovírus, vírus da doença de Newcastle, *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* e parasitas do gênero *Eimeria*.

15. Vacina consistindo essencialmente em um antígeno selecionado do grupo consistindo em um único toxóide do Tipo alfa contra *C. perfringens*, um fragmento antigênico do toxóide alfa, um fragmento antigênico inativo de uma única toxina do Tipo alfa de *C. perfringens* e qualquer combinação dos mesmos;

em que o único toxóide do Tipo alfa contra *C. perfringens* e o fragmento antigênico inativo da única toxina alfa de *C. perfringens* são do mesmo Tipo; e

em que uma a duas doses de 0,25 – 0,6 ml, por dose, da vacina é suficiente para induzir a produção de, pelo menos, quatros unidades anti-toxina (U.A.), por ml de anti-soro, em uma galinha vacinada com a vacina.

5 16. Processo para prover imunidade passiva contra uma multiplicidade de doenças aviárias à prole de uma ave fêmea, compreendendo a administração da vacina de como definida na reivindicação 13, à ave fêmea, antes de sua postura de ovos que darão origem à prole; em que é provida imunidade passiva à prole contra uma multiplicidade de doenças.

10 17. Processo para prover imunidade passiva contra doença clostridiose à prole de uma ave fêmea, o referido processo compreendendo a administração da vacina como definida na reivindicação 1, à ave fêmea, antes de sua postura de ovos que darão origem à prole; em que é provida imunidade passiva à prole.

15 18. Processo de acordo com a reivindicação 17, em que a ave é uma galinha ou perua.

19. Processo de acordo com a reivindicação 17, em que a doença é clostridiose e esta clostridiose é uma doença entérica.

20 20. Processo de acordo com a reivindicação 19, em que a doença entérica da clostridiose é a enterite necrosante.

21. Processo de acordo com a reivindicação 17, em que a doença clostridiose é selecionada do grupo consistindo em colangiohepatite, dermatite gangrenosa e celulite.

22. Processo de produção de uma vacina toxóide alfa contra *C. perfringens*, compreendendo:

25 (a) cultivo celular de *C. perfringens* em um meio de cultura para produção de uma quantidade de células cultivadas; em que a referida quantidade de células cultivadas secretam uma toxina alfa de *C. perfringens* no meio celular;

30 (b) inativação da toxina alfa secretada para produção de toxóide alfa contra *C. perfringens*;

(c) remoção da maior parte das células cultivadas, do meio de cultura, para formar um sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens*; e

(d) ajuste da concentração do sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens*, de forma que este seja suficiente para induzir a produção de pelo menos quatro unidades antitoxina (U.A.) de anticorpo antitoxina alfa, por ml de anti-soro, em uma ave que foi vacina com uma ou duas doses de
5 0,25 - 0,6 ml, por dose, da referida vacina.

23. Processo de acordo com a reivindicação 22, compreendendo ainda a mistura do sobrenadante de toxóide alfa contra *C. perfringens* com uma emulsão água-em-óleo.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, em que a emul-
10 são água-em-óleo é preparada com 70% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.

25. Processo de acordo com a reivindicação 24, em que a célula com *C. perfringens* é uma célula com um único Tipo de *C. perfringens*.

26. Processo de acordo com a reivindicação 25, em que a referi-
15 da célula com um único Tipo de *C. perfringens* é selecionada do grupo consistindo em célula com *C. perfringens* Tipo A e célula com *C. perfringens* Tipo C.

RESUMO

Patente de Invenção: "**VACINA TOXÓIDE ALFA CONTRA *C. PERFRINGENS***".

A presente invenção refere-se a vacinas que compreendem toxóides tipo alfa contra *C. perfringens*, fragmentos antigênicos dos mesmos, fragmentos antigênicos inativados de toxinas alfa de *C. perfringens* ou qual-
5 quer combinação dos mesmos. A presente invenção descreve ainda processos de uso destas vacinas para proteção de animais contra clostridioses, doenças provocadas por bactérias do gênero *Clostridium*. A presente invenção descreve também processos para a produção destas vacinas.