



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 498**

51 Int. Cl.:
A61K 39/002 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00991286 .6**
86 Fecha de presentación : **20.12.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1248646**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54 Título: **Composiciones y vacunas que contienen uno o más antígenos de *Cryptosporidium parvum* y de otro patógeno entérico.**

30 Prioridad: **21.12.1999 US 171399 P**

73 Titular/es: **MERIAL**
29, avenue Tony Garnier, BP 7123
69358 Lyon Cédex 07, FR

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

72 Inventor/es: **Audonnet, Jean-Christophe y**
Gallo, Guillermo

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y vacunas que contienen uno o más antígenos de *Cryptosporidium parvum* y de otro patógeno entérico.

Campo de la invención

La invención se refiere a antígenos/epítomos de *Cryptosporidium parvum* y de patógenos entéricos (tales como otros patógenos entéricos), a composiciones y procedimientos que comprenden o que utilizan dichos antígenos/epítomos para inducir una respuesta inmunológica contra infecciones por *Cryptosporidium parvum* y/o entéricas o para la prevención, tratamiento o control de las mismas, y a usos de los mismos.

También se mencionan en la presente invención procedimientos y/o composiciones, y/o usos de dichas composiciones o de componentes de las mismas en la formulación de dichas composiciones, para inducir una respuesta inmunológica y/o para la prevención y/o el tratamiento y/o el control de infecciones entéricas en animales, por ejemplo mamíferos, tales como bovinos, felinos, caninos o equinos o especies de los mismos.

La invención también se refiere a composiciones y/o a usos de dichas composiciones o a componentes de los mismos en la formulación de dichas composiciones, para inducir una respuesta inmunológica y/o para la prevención y/o el tratamiento y/o el control de la infección por *Cryptosporidium parvum*.

También se indica en la presente invención la utilización concurrente de una vacuna monovalente de *Cryptosporidium parvum* con vacunas entéricas, por ejemplo vacunas entéricas bovinas (por ejemplo rotavirus/coronavirus, *E. coli*) y/o la utilización de una vacuna de combinación que contiene *Cryptosporidium parvum*+rotavirus/coronavirus, *E. coli*, así como la prevención, control o tratamiento, o inducción de una respuesta inmunológica para reducir la exacerbación de enfermedades entéricas, por ejemplo entéricas bovinas, debidas a la coinfección con *Cryptosporidium parvum*. La inmunidad inducida por la vacunación contra *Cryptosporidium parvum* puede reducir significativamente la severidad de enfermedades inducidas por patógenos entéricos mencionados en la presente invención. Resulta útil una vacuna de combinación que contiene *Cryptosporidium parvum* para una prevención más completa de enfermedades entéricas multi-etiológicas en animales neonatos, tales como bovinos, causados por rotavirus y coronavirus y *E. coli* K99 y F41.

También se indica en la presente invención los efectos de la coinfección de *Cryptosporidium parvum* sobre otros patógenos entéricos, por ejemplo entéricos bovinos. Se encuentra *Cryptosporidium parvum* se encuentra comúnmente en las heces de animales neonatos, tales como mamíferos, por ejemplo bovinos. *Cryptosporidium parvum* es capaz de producir signos clínicos de enfermedad entérica por sí mismo, con independencia de la presencia o ausencia de otros virus y bacterias potencialmente patógenos en el tubo digestivo. Algunos virus, tales como los coronavirus, y bacterias, tales como *E. coli*, por ejemplo F41, que han sido reconocidos en la técnica como muy patógenos, no son capaces de causar signos clínicos de enfermedad importantes en modelos experimentales de reto. De esta manera, la invención puede referirse a tratar la coinfección de vacas con *Cryptosporidium parvum*, debido a que la coinfección puede exacerbar la enfermedad causada por otros patógenos entéricos, tales como coronavirus, rotavirus y *E. coli*, por ejemplo F41.

Se citan diversos documentos en el presente texto. Las citaciones en el texto pueden ser a modo de citación de un documento en la lista de referencias, por ejemplo a modo de citación de autor o autores y documento año, de un documento listado en la lista de referencias, o a modo de citación completa en el texto de un documento que también puede encontrarse listado o no en la lista de referencias.

No se admite que ninguno de los diversos documentos citados en el presente texto constituyan técnica anterior respecto a la presente invención. Cualquier documento que presente como autor o inventor una o varias personas denominadas inventores en la presente memoria es un documento el autor del cual no es diferente del autor de la entidad inventiva de la presente memoria.

Antecedentes de la invención

La enfermedad entérica bovina es el resultado de una infección intestinal enteropatógena que con frecuencia se manifiesta en alguna forma de diarrea. Esta enfermedad, también denominada comúnmente diarrea neonatal bovina, es responsable de una pérdida económica sustancial en la industria ganadera. La morbilidad de los bovinos, conjuntamente con la necesidad de intervención terapéutica y los posibles efectos perjudiciales de largo plazo sobre los animales son los factores principales responsables de la carga económica sobre el ganadero. Una estimación indica que la diarrea neonatal bovina es responsable de aproximadamente 75% de las muertes de vacas lecheras de menos de 3 semanas de edad (Radostits, O.M. *et al.*, Herd Health Food Animal Production Medicine, 2a edición, Saunders, Philadelphia, páginas 184 a 213, 1994). El control de la diarrea neonatal bovina resulta difícil por múltiples motivos, entre los más importantes de los cuales se incluyen: (1) la implicación de múltiples agentes en la patogénesis de la enfermedad, (2) la no especificidad de los signos clínicos, (3) la observación de que algunas infecciones pueden ser asintomáticas, y (4) la implicación de factores del huésped, tales como la nutrición y la inmunidad endógena (Moon, H.W. *et al.*, JAVMA 173(5):577-583, 1978; Viring, S. *et al.*, Acta Vet. Scand. 34:217-279, 1999).

El desarrollo de una estrategia para prevenir o tratar la enfermedad entérica bovina ha resultado muy difícil debido a que, aunque es conocido que se encuentran presentes múltiples enteropatógenos durante la infección, no se sabe qué patógenos o combinación de patógenos es realmente responsable de la enfermedad. Algunos estudios epidemiológicos en los Estados Unidos, así como en otras partes del mundo, muestran que entre los enteropatógenos más prevalentes asociados a la diarrea neonatal bovina se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, *Cryptosporidium parvum*, rotavirus, coronavirus y *E. coli*. Aunque en la mayoría de casos, se aíslan varios de estos enteropatógenos de brotes de la enfermedad, la prevalencia de cada uno de los agentes no es consistente dentro de una población enferma individual o entre múltiples manadas infectadas. Tradicionalmente, los estudios han encontrado que los rotavirus son el enteropatógeno más prevalente en los bovinos con diarrea. Por ejemplo, en un estudio de bovinos con diarrea en el Reino Unido, se detectaron rotavirus y *Cryptosporidium parvum* en 42% y 23% de la población, respectivamente. Veinte por ciento de los bovinos se encontraban infectados por más de un patógeno. Sin embargo, informes más recientes indican que *Cryptosporidium parvum* es el patógeno predominante en las infecciones bovinas entéricas. En un estudio reciente que evaluaba las infecciones por *Cryptosporidium parvum* e infecciones concurrentes por otros enteropatógenos principales en bovinos neonatos. *Cryptosporidium parvum* era el único enteropatógeno observado en 52,3% de la población, seguido de infecciones individuales por rotavirus en 42,7% (de la Fuente *et al.*, Preventive Veterinary Medicine 36:145-152, 1998). La infección concurrente por dos agentes se produjo en 21,6% de dicho grupo de estudio, mientras que la infección con tres y cuatro patógenos se observó en 6% y 0,5%, respectivamente. La infección mixta más común en el presente estudio fue una combinación de *Cryptosporidium*-rotavirus. Existe información limitada disponible sobre el papel de los patógenos entéricos individuales en la diarrea neonatal bovina. Además, la combinación de mecanismos de patogénesis vírica, bacteriana y protozoaria subyacentes a la enfermedad entérica bovina en los animales neonatos se entiende todavía menos. Sin embargo, con independencia de que se desconozca el mecanismo de la patogénesis, la infección por más de un patógeno tiende a conducir a un resultado clínico más severo que las infecciones causadas por un solo enteropatógeno.

En la actualidad, no existe un procedimiento de tratamiento que proporciona protección adecuada frente a la diarrea neonatal bovina. No existe un solo fármaco o combinación de agentes quimioterapéuticos que resulten útiles en el tratamiento de esta enfermedad. Aunque se encuentran disponibles vacunas que presentan como diana la enfermedad entérica bovina, han tenido un éxito y aceptación limitados. Se encuentran disponibles en la actualidad vacunas que contienen antígenos contra tres enteropatógenos que se ha observado que se encuentran asociados con la enfermedad: rotavirus, coronavirus y *E. coli*. La eficacia de los componentes individuales de estas vacunas entéricas bovinas disponibles comercialmente (rota/corona, *E. coli*) se ha demostrado que resulta protectora en modelos experimentales de reto. A pesar de la disponibilidad de estas vacunas, bajo condiciones de campo, la diarrea neonatal, diarrea bovina y disentería invernal continúan afectando a operaciones ganaderas con vacas, de engorde y con bovinos. Los productores cuestionan permanentemente la eficacia de las vacunas entéricas actuales que contienen *E. coli* K99, rotavirus y coronavirus bajo condiciones de campo, tal como se refleja en la baja utilización de las vacunas entéricas de combinación en el mercado estadounidense (sólo 4% de los animales en estado se vacunan anualmente con este producto).

Más recientemente, se ha desarrollado una vacuna experimental monovalente contra *Cryptosporidium parvum* y se ha demostrado que protege frente al reto experimental con *Cryptosporidium parvum*. Sin embargo, los múltiples enteropatógenos implicados en la enfermedad entérica no pueden superarse mediante el tratamiento con una vacuna de *Cryptosporidium parvum* por sí sola. Además, la infección enteropatógena aparentemente es universal; se encuentra en todo el mundo y la mayoría de vertebrados son susceptibles a esta infección. Por lo tanto, la necesidad de combatir la infección enteropatógena no se encuentra limitada a las especies bovinas. Además, la enfermedad entérica resulta difícil de controlar: probablemente es multifactorial; *Cryptosporidium parvum* podría ser un factor, aunque hasta el momento no existe prueba definitiva de que *Cryptosporidium parvum* en efecto potencie la enfermedad entérica o que la utilización del mismo en una composición de combinación inmunogénica, inmunológica o de vacuna potencie la prevención de la enfermedad entérica.

Además, un problema durante la preparación y utilización de las vacunas de combinación es el fenómeno denominado "interferencia en la eficacia", en la que la eficacia de un antígeno en la combinación disminuye o se reduce, se cree que debido a la dominancia de otro antígeno en la vacuna de combinación: ver Paoletti *et al.*, patente US nº 5.843.456. Este fenómeno se ha observado en vacunas de combinación que utilizan uno o más antígenos de *E. coli*; por ejemplo, pueden interferir una o más especies de bacteria con otros antígenos en las vacunas de combinación.

De esta manera, se cree que hasta el momento no se ha dado a conocer o sugerido la existencia del problema de que *Cryptosporidium parvum* contribuye a infecciones y a síntomas entéricos, o la manera en que este problema se trata en la presente invención, por ejemplo con composiciones de combinación que incluyen uno o más antígenos o epítomos de interés de *Cryptosporidium parvum* conjuntamente con por lo menos un antígeno o epítomo adicional de interés procedente de un patógeno que causa infección y/o síntomas entéricos y/o uno o más recombinantes y/o vectores y/o plásmidos que expresan dicho antígeno o antígenos o epítomo o epítomos de interés y la administración de estas composiciones a mamíferos en estado, tales como vacas en estado y/o mamíferos neonatos o jóvenes, tales como bovinos dentro del primer mes, y tratar cualquier problema potencial de interferencia en la eficacia.

Objetivos y descripción resumida de la invención

Un objetivo de la invención son las composiciones inmunológicas o de vacuna, especialmente aquéllas que pueden utilizarse en el campo de la veterinaria, por ejemplo para mamíferos, tales como bovinos, caninos, felinos o equinos o especies de los mismos.

Otro objetivo de la invención pueden ser composiciones inmunológicas o de vacuna que pueden utilizarse eficazmente para inmunizar animales neonatos y/o jóvenes, de manera que se inmunicen animales neonatos, por ejemplo mamíferos, tales como bovinos, caninos, felinos o equinos o especies de los mismos, ventajosamente bovinos.

5 Todavía otro objetivo de la invención pueden ser composiciones inmunológicas o de vacuna mejoradas contra *Cryptosporidium parvum*, por particulares para el campo veterinario, tales como para la utilización con mamíferos, por ejemplo caninos, felinos o equinos o especies de los mismos, especialmente bovinos o especies de los mismos.

10 En la presente memoria se mencionan procedimientos para inmunizar neonatos y/o animales jóvenes, tal como inmunizar pasivamente animales neonatos, por ejemplo mamíferos, tales como caninos, felinos o equinos o especies de los mismos, especialmente bovinos o especies de los mismos.

15 Además, se mencionan en la presente invención procedimientos para inducir una respuesta inmunológica contra *Cryptosporidium parvum* o contra patógenos entéricos, incluyendo *Cryptosporidium parvum*, o para controlar, prevenir y/o tratar infecciones y/o síntomas entéricos, incluyendo *Cryptosporidium parvum*, por ejemplo comprendiendo la administración de una composición de la invención, así como procedimientos para preparar dichas composiciones, usos de componentes de dichas composiciones para formular dichas composiciones, *inter alia*.

20 Se proporciona, en un aspecto de la presente invención, una composición combinada entérica inmunológica o de vacuna, que comprende:

un primer antígeno o epítipo de interés de *Cryptosporidium parvum* y/o un vector que expresa el primer antígeno o epítipo de interés,

25 y un segundo antígeno o epítipo de interés de otro patógeno entérico y/o el primer vector que expresa el primer antígeno o epítipo de interés también expresa el segundo antígeno o epítipo de interés y/o un segundo vector que expresa el segundo antígeno o epítipo de interés,

y un vehículo farmacéuticamente aceptable,

30 en la que el antígeno del patógeno entérico se selecciona de entre el grupo que consiste de los antígenos de *E. coli*, rotavirus, coronavirus y mezclas de los mismos.

35 La presente invención proporciona, en otro aspecto, una composición según la presente invención en la que dicha composición se utiliza como composición combinada entérica inmunológica o de vacuna bovina, canina, felina o equina.

40 En otro aspecto de la presente invención se proporciona la utilización de una composición según la presente invención en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento y/o control de *Cryptosporidium parvum* y/o infecciones entéricas en animales.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento para preparar una composición según la presente invención, que comprende mezclarlos antígenos o epítipos o vectores y un portador.

45 En otro aspecto, se proporciona un kit para preparar una composición según la presente invención, que comprende los antígenos, epítipos o vectores, cada uno en un recipiente o recipientes separados, opcionalmente empaquetados conjuntamente, y además opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o administración.

50 La presente invención proporciona, en otro aspecto, la utilización de una composición según la presente invención en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento y/o el control de infecciones por *Cryptosporidium parvum* y/o entéricas en animales.

55 La vacunación o inmunización contra patógenos entéricos, tales como patógenos entéricos entre los que se incluyen *Cryptosporidium parvum*, de manera inesperada mejora considerablemente mediante la utilización de una composición inmunológica o de vacuna, incluyendo una combinación de por lo menos dos antígenos o epítipos de *Cryptosporidium parvum* de la misma y/o uno o más vectores que expresan por lo menos dos antígenos o epítipos de *Cryptosporidium parvum* de los mismos, por ejemplo P1 o un epítipo del mismo y/o un vector que expresa P21 o un epítipo del mismo o Cp23 o un epítipo del mismo y/o un vector que expresa Cp23 o un epítipo del mismo, y Cp15/60 o un epítipo del mismo y/o un vector que expresa Cp15/60 (por ejemplo una composición que contiene por lo menos un epítipo de Cp23 y por lo menos un epítipo de Cp15/60; y se indica que el antígeno Cp23 o proteína Cp23 puede incluir P21). La combinación de ambos antígenos (o epítipo o epítipos de interés y/o vectores que expresan los antígenos y/o epítipo o epítipos) conduce a un efecto sinérgico con una producción mejorada o útil de una respuesta inmunológica, por ejemplo anticuerpos, respuestas celulares, o ambos, contra la infección por *Cryptosporidium parvum* y/o entérica, o patógenos o síntomas, tales como una producción muy elevada de anticuerpos contra *Cryptosporidium parvum*. Ello también permite la preparación de composiciones inmunológicas o de vacuna eficaces, útiles para proteger animales o mamíferos neonatos o jóvenes, por ejemplo caninos, felinos o equinos o especies de los mismos, especialmente bovinos. Por ejemplo, pueden utilizarse ventajosamente composiciones que contienen antígenos y/o epítipo o epítipos de interés en la inoculación de hembras o hembras gestantes, por ejemplo para inducir una

respuesta inmunológica que puede pasarse a la progenie todavía no nacida y a animales neonatos o jóvenes a través de la leche o el calostro durante el destete, y composiciones que contienen uno o más vectores que expresan antígenos y/o epítipo o epítopos pueden utilizarse ventajosamente en la inoculación de machos y hembras de todas las edades, por ejemplo tales como aquellos que no se encuentran en estado y/o neonatos o animales jóvenes, y la inoculación de animales neonatos o jóvenes puede realizarse sola o ventajosamente junto con la inoculación de hembras o hembras gestantes, por ejemplo para permitir que se generen respuestas inmunológicas conjuntamente con la inoculación de hembras o hembras gestantes, por ejemplo para generar respuestas inmunológicas en los animales jóvenes o neonatos, recibiendo también anticuerpos u otros agentes inmunológicos a través de la leche o del calostro durante la lactancia.

La combinación en una composición inmunológica o de vacuna de uno o más antígenos y/o epítopos de interés contra *Cryptosporidium parvum* con por lo menos un antígeno o epítipo adicional de interés contra por lo menos un patógeno entérico adicional de la especie animal (y ventajosamente una pluralidad de antígenos y/o epítopos de interés de una pluralidad de patógenos, por ejemplo patógenos entéricos) puede incrementar significativamente la protección frente a las patologías entéricas.

Una composición inmunológica o de vacuna especialmente ventajosa de la invención puede ser una composición contra *Cryptosporidium parvum* y puede comprender: (i) por lo menos un antígeno Cp23 o epítipo de interés del mismo y/o por lo menos un vector que expresa por lo menos un antígeno Cp23 o epítipo de interés del mismo o por lo menos un antígeno P21 o epítipo de interés del mismo y/o por lo menos un vector que expresa por lo menos un antígeno P21 o epítipo de interés del mismo, e (ii) por lo menos un antígeno Cp15/60 o epítipo de interés del mismo y/o por lo menos un vector que expresa por lo menos un antígeno Cp15/60. La composición además comprende ventajosamente por lo menos un antígeno o epítipo adicional de interés procedente de otro patógeno entérico y/o un vector que expresa por lo menos un antígeno adicional (que puede ser el mismo vector que expresa el antígeno o epítipo de interés de Cp23 o de P21, y/o el antígeno o epítipo de interés de Cp15/60, por ejemplo la composición puede comprender un vector que coexpresa el antígeno o epítipo de interés de Cp23 o de P21 y el antígeno o epítipo de interés de Cp15/60, y opcionalmente el antígeno o epítipo de interés adicional opcional).

Otro antígeno de *Cryptosporidium parvum* es el antígeno CP41 indicado en Mark C. Jenkins *et al.*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, nov. 1999, 6, 6:912-920. Las composiciones inmunológicas o de vacuna según la invención pueden comprender este antígeno o un epítipo de interés del mismo y/o un vector que expresa dicho antígeno o un epítipo del mismo, posiblemente y preferentemente en asociación con por lo menos otro *Cryptosporidium parvum*, tal como se describe en la presente invención, tal como Cp23, P21 y Cp15/60, por ejemplo en combinación con Cp23 o P21 y/o Cp15/60. Para la expresión de este antígeno, puede añadirse un codón de inicio cadena arriba de la secuencia de nucleótidos que aparece en la figura 2 de la presente publicación, y un codón de parada cadena debajo de dicha secuencia.

Una composición inmunológica o de vacuna eficaz contra la enteritis también se produce mediante la utilización de únicamente uno de entre Cp23 o un epítipo del mismo, un vector que expresa el antígeno o epítipo, P21 o un epítipo del mismo, un vector que expresa el antígeno o epítipo, Cp15/60 o un epítipo del mismo, un vector que expresa el antígeno o un epítipo del mismo, CP41 o un epítipo del mismo o un vector que expresa el antígeno o epítipo, como antígeno o epítipo de interés de *Cryptosporidium parvum*, ventajosamente en combinación con por lo menos otro antígeno o epítipo de interés de *Cryptosporidium parvum* o con un vector que expresa dicho antígeno o epítipo de interés, y esta composición puede comprender además por lo menos un antígeno adicional o epítipo de interés de otro patógeno entérico y/o un vector que expresa por lo menos un antígeno adicional (y este vector puede coexpresar uno o más antígenos y/o uno o más epítopos).

En la presente invención se mencionan procedimientos para inducir una respuesta inmunológica o protectora (vacuna) o para controlar, prevenir y/o tratar patógenos entéricos o infecciones entéricas o síntomas entéricos, incluyendo *Cryptosporidium parvum*, por ejemplo comprendiendo la administración de una composición de la invención.

Puede administrarse una composición de la invención a un mamífero gestante, tal como un bovino o una vaca (en lo sucesivo denominada "vaca"), perro, gato o caballo durante el periodo de gestación, por ejemplo una o dos veces durante el periodo de gestación típico (para una vaca, típicamente un periodo de gestación de 9 meses, o 170 días), tal como una primera administración de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2,5, o aproximadamente 3, meses antes del parto, y una segunda o única administración poco tiempo antes del parto, por ejemplo en las últimas 3 semanas antes del parto, preferentemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 días antes del parto. De esta manera, la hembra puede transferir pasivamente inmunidad al neonato, por ejemplo a los bovinos tras el nacimiento mediante la leche o el calostro. Ventajosamente, las composiciones que comprenden uno o más antígenos y/o uno o más epítopos de interés (en contraposición a composiciones que comprenden uno o más vectores, uno o más recombinantes y/o uno o más plásmidos de ADN) se administran a los mamíferos gestantes debido a que se desea la inducción de una respuesta de anticuerpos. En contraste, las composiciones que comprenden uno o más vectores, recombinantes y/o plásmidos de ADN que expresan el antígeno o antígenos y/o el epítipo o epítopos de interés se administran *in vivo* ventajosamente a un mamífero neonato o muy joven (por ejemplo un mamífero susceptible a enfermedad entérica, tal como un bovino durante aproximadamente el primer mes de vida y otros mamíferos durante períodos análogos de la vida), debido a que la respuesta celular y/o de anticuerpos puede resultar útil para prevenir, tratar y/o controlar las condiciones, infecciones o síntomas entéricas en dichos animales neonatos y/o muy jóvenes. Los animales neonatos y/o muy jóvenes pueden recibir un refuerzo de una composición antigénica y/o epitópica y/o de vector/recombinante/plásmido de ADN durante el periodo de susceptibilidad, y la madre, opcional y ventajosamente,

también puede haber sido vacunada durante el embarazo, tal como se describe en la presente invención, de manera que el animal neonato y/o muy joven pueda recibir una respuesta inmunológica por medio de la administración directa al mismo y pasivamente.

- 5 Una composición inventiva particular puede comprender uno o más antígenos de *E. coli* (por ejemplo *E. coli* inactivados que portan fimbrias, tales como K99, Y, 31A y/o F41, y/o estas fimbrias en forma de subunidad o expresadas recombinantemente *in vivo*) y/o uno o más antígenos de rotavirus (por ejemplo rotavirus ventajosamente inactivados) y/o o más antígenos de coronavirus (por ejemplo antígeno de coronavirus bovino, ventajosamente por ejemplo coronavirus inactivados), en combinación con uno o más antígenos de *Cryptosporidium parvum*, tales como P21 y/o
10 Cp23 y/o Cp15/60 (y, tal como se ha indicado anteriormente, uno o más de estos antígenos pueden ser un epítipo de interés contenido en el antígeno, y uno o más de estos antígenos o epítopos de interés puede expresarse *in vivo* en un recombinante o en un plásmido).

- De esta manera, una composición inventiva particular puede comprender: (i) uno o más antígenos de *Cryptosporidium parvum*, tales como P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, y ventajosamente P21 y/o Cp23 y Cp15/60, e (ii) por lo menos un antígeno de *E. coli* (por ejemplo por lo menos uno o todos de entre K99, Y, 31A, F41 y/o otras fimbrias de *E. coli* inactivadas o en forma de subunidades o expresados *in vivo*; K99 y/o F41 preferentemente se encuentran presentes e Y y/o 31A ventajosamente también se encuentran presentes) y/o antígeno de coronavirus y/o de rotavirus, tal como uno o más antígenos de *C. parvum*, tal como P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, y ventajosamente P21 y/o Cp23 y Cp15/60, y uno o más antígenos de rotavirus, tal como rotavirus inactivados, o uno o más antígenos de *C. parvum*, tales como P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, y ventajosamente P21 y/o Cp23 y Cp15/60, y uno o más antígenos de coronavirus, tales como coronavirus inactivados, por ejemplo coronavirus bovinos inactivados, o uno o más antígenos de *C. parvum*, tales como P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, y ventajosamente P21 y/o Cp23 y Cp15/60, y uno o más antígenos de *E. coli*, tales como K99, Y, 31A, F41 y/o otras fimbrias de *E. coli* inactivados, o en forma de subunidades o expresados *in vivo*, por ejemplo una combinación de K99, Y, 31A y/o F41. Un antígeno de *E. coli* ejemplar en la invención pueden ser fimbrias, debido a que las fimbrias de *E. coli* pueden evitar la interferencia en la eficacia. Una composición ejemplar puede comprender uno o más antígenos de *C. parvum*, tales como P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, y ventajosamente P21 y/o Cp23 y Cp15/60 y por lo menos un antígeno de *E. coli*, y por lo menos un antígeno de coronavirus, y por lo menos un antígeno de rotavirus, por ejemplo P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, y ventajosamente P21 y/o Cp23 y Cp15/60 y rotavirus inactivados, y coronavirus inactivados, y por lo menos un antígeno de *E. coli*, ventajosamente fimbrias o preferentemente por lo menos uno o más de entre K99, Y, 31A y F41, o una combinación de K99, Y, 31A y F41 (y, tal como se ha indicado anteriormente, uno o más de estos antígenos puede ser un epítipo de interés contenido en el antígeno, y uno o más de estos antígenos o epítopos de interés pueden ser expresados por un recombinante o un plásmido). Con respecto a la potencial interferencia en la eficacia por bacterias individuales o múltiples, los inventores han descubierto que mediante el incremento de la cantidad de otros antígenos presentes en una vacuna de combinación, se evita cualquier potencial interferencia en la eficacia y que la utilización de fimbrias a modo de antígeno de *E. coli* también evita la interferencia en la eficacia.

- En dichas composiciones de la invención, en una sola dosis puede encontrarse el antígeno de *E. coli* (o cada antígeno de *E. coli* en el caso de múltiples antígenos de *E. coli*) en una cantidad habitualmente presente en vacunas contra patógenos entéricos, tal como una cantidad suficiente para obtener un título sérico en cobayas de por lo menos 0,9 log10; el antígeno de rotavirus puede encontrarse presente en una cantidad típicamente observada en vacunas contra patógenos entéricos, tal como una cantidad para obtener un título sérico en cobayas de por lo menos 2,0 log10, y el antígeno de coronavirus puede encontrarse presente en una cantidad típicamente observada en vacunas contra patógenos entéricos, tal como una cantidad suficiente para obtener un título sérico en cobayas de por lo menos 1,5 log10, y las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante, tal como hidróxido de aluminio, que pueden encontrarse presentes en una dosis individual en una cantidad típicamente observada en vacunas, tal como preferentemente una cantidad de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 0,9 mg.

- Por consiguiente, en un aspecto la invención proporciona composiciones combinadas entéricas inmunológicas, inmunogénicas o de vacuna que comprenden un primer antígeno o epítipo de interés procedente de *Cryptosporidium parvum* y/o un primer vector que expresa el primer antígeno o epítipo de interés, y un segundo antígeno o epítipo de interés procedente de otro patógeno entérico y/o el primer vector que expresa el primer antígeno o epítipo de interés también expresa el segundo antígeno o epítipo de interés y/o un segundo vector que expresa el segundo antígeno o epítipo de interés, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- La composición puede comprender antígeno que puede ser de *Cryptosporidium parvum* y un antígeno de otro patógeno entérico. La composición puede comprender un antígeno de *Cryptosporidium* y un antígeno de otro patógeno entérico de una especie bovina, o de una especie canina, o de una especie felina, o de una especie equina. El antígeno del patógeno entérico puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de los antígenos de *E. coli*, rotavirus, coronavirus, *Clostridium* spp. y mezclas de los mismos. El patógeno entérico puede ser *E. coli*. El antígeno de *E. coli* puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de *E. coli* que porta el antígeno K99, *E. coli* que porta el antígeno F41, *E. coli* que porta el antígeno Y, *E. coli* que porta el antígeno 31A, antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y, antígeno 31A y mezclas de los mismos.

- Se menciona en la presente invención una composición en la que el patógeno entérico puede comprender coronavirus bovino y/o rotavirus bovino y/o *Clostridium perfringens*. El antígeno del patógeno entérico puede comprender toxoides de *Clostridium perfringens* tipo C y D. Se menciona en la presente invención una composición en la que el

patógeno entérico puede comprender *E. coli*, rotavirus bovino, coronavirus bovino y *Clostridium perfringens* o *E. coli*, rotavirus bovino o coronavirus bovino.

Además, se menciona en la presente invención una composición en la que el patógeno entérico comprende antígenos de *E. coli* seleccionados de entre el grupo que consiste de *E. coli* que porta antígeno K99, *E. coli* que porta antígeno F41, *E. coli* que porta antígeno Y, *E. coli* que porta antígeno 31A, antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y, antígeno 31A y mezclas de los mismos, coronavirus bovino inactivado, rotavirus bovino inactivado y toxoides de *Clostridium perfringens* tipo C y D, o antígenos de *E. coli* seleccionados de entre el grupo que consiste de *E. coli* que porta antígeno K99, *E. coli* que porta antígeno F41, *E. coli* que porta antígeno Y, *E. coli* que porta antígeno 31A, antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y, antígeno 31A y mezclas de los mismos, coronavirus bovino inactivado y rotavirus bovino inactivado.

La composición de la invención ventajosamente puede comprender antígenos de subunidad de *Cryptosporidium parvum* seleccionados de entre el grupo que consiste de P21, Cp23, Cp15/60, CP41 y mezclas de los mismos, tales como Cp23 y Cp15/60 o P21 y Cp15/60.

En las composiciones de la invención que asocian antígenos de *Cryptosporidium parvum* y por lo menos otro patógeno entérico adicional, el antígeno de *Cryptosporidium parvum* también puede comprender o estar constituido por oocistos inactivados o vivos atenuados, o subunidades obtenidas a partir de oocistos.

Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante, tal como saponina o hidróxido de aluminio y las composiciones de la invención pueden encontrarse en la forma de emulsión de aceite en agua.

Se menciona en la presente invención una composición inmunológica, inmunogénica o de vacuna contra *Cryptosporidium parvum*, que comprende un primer antígeno que comprende un antígeno P21 o Cp23 o un epítipo de los mismos o un primer vector que expresa el primer antígeno y un segundo antígeno que comprende antígeno Cp15/60 o antígeno del mismo o el primer vector en el que el primer vector expresa tanto el primer como el segundo antígenos o un segundo vector que expresa el segundo antígeno, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender los antígenos Cp23 y Cp15/60 que se encuentran en la forma de proteínas de fusión separadas. La composición puede comprender un vector que expresa Cp23 y Cp15/60. La composición puede comprender un primer vector recombinante que expresa Cp23 y un segundo vector recombinante que expresa Cp15/60. Además, la composición puede comprender P21 y Cp15/60. Estas composición pueden comprender además un adyuvante.

Además, se menciona en la presente invención una composición inmunológica, inmunogénica o de vacuna contra *Cryptosporidium parvum*, que comprende un primer antígeno que comprende un antígeno P21 o Cp23 o Cp15/60 o Cp41 o un epítipo del mismo o un primer vector que expresa el primer antígeno y un segundo antígeno que comprende un segundo antígeno o epítipo del mismo procedente de *Cryptosporidium parvum* o el primer vector en el que el primer vector expresa tanto el primer como el segundo antígeno o un segundo vector que expresa el segundo antígeno, en el que el primer y el segundo antígenos son diferentes, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se menciona en la presente invención un procedimiento de inmunización bovina de un bovino neonato contra la enfermedad entérica, que comprende administrar una composición de la invención a una vaca gestante antes del parto, de manera que el bovino neonato recibe anticuerpos maternos contra *Cryptosporidium parvum* a través del calostro y/o leche. El procedimiento puede comprender además alimentar el bovino neonato con calostro y/o leche de una o más vacas que han recibido la composición durante el periodo de gestación. El procedimiento puede comprender administrar la composición al bovino neonato. La composición administrada a la hembra gestante puede comprender antígenos o epítopos de los mismos y la composición administrada a la vaca puede comprender vectores. De esta manera, también se menciona en la presente invención un procedimiento de inmunización activa de bovinos adultos y neonatos, que comprende administrar a los mismos una composición de la invención.

También se menciona en la presente invención un procedimiento de inmunización bovina de un bovino neonato, que comprende alimentar el bovino neonato con calostro y/o leche procedente de vacas que habían recibido la composición durante la gestación. De manera similar, en un sentido más amplio, se menciona en la presente invención un procedimiento de inmunización de un mamífero neonato que comprende alimentar al neonato con calostro y/o leche procedente de un mamífero hembra que ha recibido la composición durante la gestación, y el mamífero es ventajosamente un bovino, un felino, un canino o un equino. Además, la invención puede abarcar un procedimiento para preparar una composición de la invención que comprende mezclar los antígenos o epítopos o vectores y el portador.

Además, la invención puede incluir un kit para preparar una composición de la invención que comprende los antígenos, epítopos o vectores, cada uno de ellos en uno o más recipientes separados (algunos antígenos, epítopos o vectores pueden encontrarse juntos en un recipiente, por ejemplo los antígenos, epítopos o vectores de *Cryptosporidium parvum* pueden encontrarse juntos en un recipiente, y los otros antígenos, epítopos o vectores pueden encontrarse en uno o más recipientes adicionales, o el portador, diluyente y/o adyuvante pueden encontrarse en recipientes separados), opcionalmente empaquetados juntos, y además opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o la administración.

El término “comprendiendo” en la presente exposición puede referirse a “incluyendo” o puede presentar el significado proporcionado comúnmente al término “comprendiendo” en la legislación de patentes estadounidense.

Otros aspectos de la invención se describen o resultan evidentes a partir de (y se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención) la exposición siguiente.

Breve descripción de las figuras

La descripción detallada siguiente, proporcionada a título de ejemplo, y que no pretende limitar la invención a realizaciones específicas descritas, puede entenderse conjuntamente con las figuras adjuntas, que se incorporan en la presente memoria como referencia, en la que:

- la figura 1 muestra un mapa físico y de restricción del plásmido pJCA155,
- la figura 2 muestra un mapa físico y de restricción del plásmido pJCA156,
- la figura 3 muestra un mapa físico y de restricción del plásmido pJCA157,
- la figura 4 muestra un mapa físico y de restricción del plásmido pJCA158,
- la figura 5 muestra un mapa físico y de restricción del plásmido pJCA159,
- la figura 6 muestra un mapa físico y de restricción del plásmido pJCA160,
- la figura 7 muestra comparativamente los recuentos de oocistos en heces de bovinos retados por *C. parvum* o por rotavirus bovino, o ambos, o no retados (Ejemplo 12),
- la figura 8 muestra comparativamente la excreción de rotavirus en heces de bovinos según el Ejemplo 12,
- la figura 9 muestra comparativamente la condición general de los bovinos según el Ejemplo 12,
- la figura 10 muestra comparativamente el estado de deshidratación animal de los bovinos según el Ejemplo 12,
- la figura 11 muestra comparativamente el recuento en heces líquidas de los bovinos según el Ejemplo 12,
- la figura 12 muestra comparativamente el estado de anorexia de los bovinos según el Ejemplo 12, y
- la figura 13 muestra comparativamente la evolución de la temperatura rectal de los bovinos según el Ejemplo 12.

Descripción detallada

Un aspecto de la invención es, de esta manera, una composición entérica combinada inmunológica, inmunogénica o de vacuna que comprende por lo menos uno de entre un antígeno o epítipo de interés procedente de por lo menos una *Cryptosporidium* spp., incluyendo preferentemente *Cryptosporidium parvum*, y por lo menos un antígeno de por lo menos un patógeno entérico adicional, ventajosamente un patógeno que infecta la especie animal que debe protegerse, tal como una especie canina, felina, equina o bovina y más ventajosamente una especie bovina, y/o uno o más vectores y/o uno o más recombinantes y/o uno o más plásmidos que expresan el antígeno o epítipo de interés de *Cryptosporidium* spp., y/o por lo menos uno de entre el antígeno o antígenos, o el epítipo o epítipos de interés del otro patógeno entérico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se encuentran contempladas composiciones inmunológicas, inmunogénicas o de vacuna universales debido a que los patógenos entéricos con frecuencia infectan varias (más de una) especie animal.

Una composición inmunológica induce una respuesta inmunológica, local o sistémica. Una composición inmunogénica de la misma manera induce una respuesta inmunológica local o sistémica. Una composición de vacuna induce una respuesta protectora local o sistémica. Por consiguiente, las expresiones “composición inmunológica” y “composición inmunogénica” incluye una “composición de vacuna” (debido a que los dos primeros términos pueden ser composiciones protectoras).

Los antígenos de *Cryptosporidium parvum* que pueden utilizarse en la presente invención comprenden preferentemente:

- (1) Una proteína de 148 aminoácidos denominada Cp15/60 (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.591.434). Esta proteína se encuentra representada en la patente US nº A-5.591.434 en la SEC ID nº 2 con 10 aminoácidos adicionales en el extremo 5', cadena arriba de la metionina (Met). Se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención utilizar un antígeno que comprende o que consiste esencialmente de la secuencia de 148 aminoácidos de Cp15/60 o de una secuencia de aminoácidos más larga que incluya estos 148 aminoácidos, por ejemplo la secuencia completa representada en la SEC ID nº 2 en el documento US nº A-5.591.434 o cualquier polipéptido que comprende un fragmento de las secuencias de 148 ó 158 aminoácidos que comprende un epítipo del mismo, ventajosamente un epítipo inductor de protección o un epítipo que presenta la inmunogenicidad de la secuencia de longitud completa) y/o

(2) Cp23 y/o P21. Cp23 es un antígeno de aproximadamente 23 kDa, ver Perryman *et al.*, Molec. Biochem. Parasitol. 80:137-147, 1996; documento WO n° A-9807320 y L.E. Perryman *et al.*, Vaccine 17:2142-2149, 1999. La parte principal de esta proteína (187 aminoácidos) se denomina en la presente invención P21 y presenta una secuencia de aminoácidos homóloga de la secuencia de aminoácidos de la proteína C7 que se da a conocer como SEC ID n° 12 en el documento WO n° A-98 07320. Para expresarse, pueden añadirse uno, dos o más aminoácidos, en el extremo de P21, tal como Met- o Met-Gly- o aminoácidos similares. Se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención utilizar un antígeno que comprende o que consiste esencialmente, o que consiste, de la secuencia de 187 aminoácidos que comprende un epítipo del mismo, ventajosamente un epítipo inductor de protección o un epítipo que presenta la inmunogenicidad de la secuencia de longitud completa. La secuencia completa de aminoácidos de Cp23 y la secuencia de nucleótidos correspondiente resulta fácil de obtener. La proteína P21 representa la parte principal y el extremo C-terminal de Cp23. La secuencia de nucleótidos de P21 puede utilizarse como sonda para cribar una biblioteca de ADN, por ejemplo una biblioteca tal como se da a conocer en el Ejemplo 1. Esta metodología es bien conocida por el experto en la materia. Basándose en el peso molecular de Cp23, puede afirmarse que faltan aproximadamente 25 a 35 aminoácidos en el extremo N-terminal de P21 para presentar la secuencia de aminoácidos completa de Cp23. Esta información proporciona al experto en la materia el medio para encontrar con facilidad el codón de inicio y de esta manera el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de Cp23 y la secuencia N-terminal de aminoácidos.

Los antígenos o epítopos de interés pueden utilizarse individualmente o en combinación en composiciones de la invención, por ejemplo una composición de la invención puede incluir (1) o (2) o ambos.

Otro posible antígeno es el antígeno de Cp41 tal como se da a conocer *supra*.

Según una realización preferente, dichos antígenos o epítopos de interés se incorporan en las composiciones como proteínas o antígenos de subunidad. Pueden producirse mediante síntesis química o mediante expresión *in vitro*. Los ejemplos describen cómo obtener las secuencias codificantes de Cp15/60 y P21, y cómo construir vectores que expresan los mismos. Estas secuencias pueden clonarse en vectores de clonación o de expresión adecuados. A continuación, estos vectores se utilizan para transfectar células huésped adecuadas. Los antígenos codificados por la secuencia de nucleótidos que se inserta en el vector, por ejemplo Cp23 y/o P21 y/o Cp15/60, son producidos por células huésped en crecimiento transformadas con los vectores de expresión bajo condiciones en las que se produce el antígeno. Esta metodología es bien conocida por el experto ordinario en la materia. Las células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas, por ejemplo *Escherichia coli* (*E. coli*), levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, células animales, en particular líneas celulares animales. El experto en la materia conoce los vectores que pueden utilizarse con un célula huésped dada. Los vectores pueden seleccionarse de manera que se produzca una proteína de fusión que puede utilizarse seguidamente para recuperar con facilidad el antígeno.

Además, con respecto a las secuencias, entre las secuencias de ácidos nucleicos útiles para expresar el antígeno o epítipo de interés de *C. parvum* pueden incluirse secuencias de ácidos nucleicos que son capaces de hibridarse bajo condiciones de astringencia elevadas o aquellas que presentan una homología elevada con moléculas de ácidos nucleicos utilizadas en la invención (por ejemplo moléculas de ácido nucleico en los documentos mencionados en la presente memoria), y la expresión "hibridante bajo condiciones de astringencia elevada" puede ser sinónima a "condiciones de hibridación astringentes", un término bien conocido en la técnica; ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989; "Nucleic Acid Hybridisation, A Practical Approach", Hames y Higgins, editores, IRL Press, Oxford, 1985.

Con respecto a las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos que pueden utilizarse en la práctica de la invención, las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos ventajosamente presentan una homología o una identidad de por lo menos aproximadamente 75% o más, ventajosamente de 80% o más, más ventajosamente de 85% o más, tal como por lo menos aproximadamente 85% o aproximadamente 86% o aproximadamente 87% o aproximadamente 88% o aproximadamente 89%, por ejemplo por lo menos aproximadamente 90% o más, tal como por lo menos aproximadamente 91% o aproximadamente 92% o aproximadamente 93%, o aproximadamente 94%, más ventajosamente de por lo menos aproximadamente 95% a 99% o más, tal como por lo menos aproximadamente 95% o más, por ejemplo por lo menos aproximadamente 96% o aproximadamente 97% o aproximadamente 98% o aproximadamente 99%, o incluso aproximadamente 100%, o entre aproximadamente 75%, ventajosamente entre aproximadamente 85%, y aproximadamente 100%, o entre aproximadamente 90% y aproximadamente 99% o aproximadamente 100%, o entre aproximadamente 95% y aproximadamente 99% o aproximadamente 100%, con respecto a secuencias indicadas en documentos citados en la presente memoria (incluyendo subsecuencias de las mismas comentadas en la presente invención), y de esta manera, la invención incluye un vector codificante de un epítipo o región epitópica de un aislado de *C. parvum*, y procedimientos para preparar y utilizar dichos vectores y composiciones, por ejemplo la invención también incluye que estas moléculas de ácido nucleico y polipéptidos puedan utilizarse de la misma manera que las moléculas de ácido nucleico, fragmentos de las mismas y polipéptidos mencionados en la presente invención.

La homología de secuencias de nucleótidos puede determinarse utilizando el programa "Align" de Myers y Miller ("Optimal Alignments in Linear Space", CABIOS 4:11-17, 1988, incorporada en la presente invención como referencia) y disponible en NCBL. Alternativamente o adicionalmente, el término "homología" o "identidad", por ejemplo, con respecto a una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, puede indicar una medida cuantitativa de homología entre dos secuencias. El porcentaje de homología de secuencias puede calcularse como $(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) * 100 / N_{\text{ref}}$, donde

N_{dif} es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando se encuentran alineadas y donde N_{ref} es el número de residuos en una secuencia de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC presentará una similitud de secuencia de 75% con la secuencia AATCAATC ($N_{\text{ref}}=8$; $N_{\text{dif}}=2$).

5 Alternativamente o adicionalmente, los términos “homología” o “identidad” con respecto a las secuencias pueden referirse al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, en el que la alineación de las dos secuencias puede determinarse de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman, PNAS USA 80:726, 1983), por ejemplo utilizando una longitud de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización de hueco de 4, y el análisis y la interpretación de los datos de secuencias asistidos por ordenador pueden llevarse a cabo convenientemente utilizando programas disponibles comercialmente (por ejemplo Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc., CA). En el caso de que se indique las secuencias de ARN son similares, o que presentan un grado de identidad o de homología de secuencia con secuencias de ADN, se considera que la timidina (T) en la secuencia de ADN es igual a la de uracilo (U) en la secuencia de ARN. Las secuencias de ARN comprendidas dentro del alcance de la invención 10 pueden derivarse de secuencias de ADN, considerando que la timidina (T) en la secuencia de ADN es igual a la de uracilo (U) en las secuencias de ARN.

Adicionalmente o alternativamente, la similitud o identidad u homología de secuencia de aminoácidos puede determinarse utilizando el programa BlastP (Altschul *et al.*, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402), disponible de NCBI 20 (utilizando en la determinación de la homología de secuencias, tal como se muestra en el Apéndice I; ver también los Ejemplos). Las referencias siguientes también proporcionan algoritmos para comparar la identidad u homología relativas de los residuos aminoácidos de dos proteínas, y adicionalmente o alternativamente con respecto a lo anteriormente expuesto, las enseñanzas en dichas referencias pueden utilizarse para determinar el porcentaje de homología o de identidad: Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., “A general method applicable to the search of similarities in the amino acid sequence of two proteins”, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970; Smith, T.F. y Waterman, M.S., “Comparison of Bio-sequences”, Advances in Applied Mathematics 2:482-489, 1981; Smith, T.F., Waterman, M.S. y Sadler, J.R., “Statistical characterization of nucleic acid sequence functional domains”, Nucleic Acids Res. 11:2205-2220, 1983; Feng, D.F. y Dolittle, R.F., “Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees”, J. of Molec. Evol. 25:351-360, 1987; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., “Fast and sensitive multiple sequence alignment on a microcomputer”, CABIOS 5:151-153, 1989; Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J., “ClusterW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice”, Nucleic Acids Res. 22:4673-480, 1994; y Devereaux, J., Haeblerle, P. y Smithies, O., “A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX”, Nucl. Acids Res. 12:387-395, 1984.

35 Además, respecto a las moléculas de ácido nucleico utilizadas en la presente invención (por ejemplo tal como en los documentos citados en la presente invención), la invención incluye la utilización de moléculas de ácido nucleico de codón equivalente. Por ejemplo, si la invención incluye la proteína “X” (por ejemplo P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41) que presenta la secuencia de aminoácidos “A” y codificada por la molécula de ácido nucleico “N”, la invención incluye moléculas de ácido nucleico que también codifican la proteína X mediante uno o más codones diferentes que 40 en la molécula N de ácido nucleico.

El antígeno o epítipo de interés utilizado en la práctica de la invención pueden obtenerse a partir de uno o más patógenos particulares, por ejemplo *C. parvum*, *E. coli*, rotavirus, coronavirus y similares, o pueden obtenerse a partir de la expresión recombinante *in vitro* y/o *in vivo* de uno o más genes o partes de los mismos. Los procedimientos para 45 preparar y/o utilizar vectores (o recombinantes) para la expresión pueden ser iguales o análogos a los procedimientos dados a conocer en: las patentes US nº 4.603.112, nº 4.769.330, nº 5.174.993, nº 5.505.941, nº 5.338.683, nº 5.494.807, nº 4.722.848, nº 5.942.23, las publicaciones PCT nº WO 94/16716, nº WO 96/39491. Paoletti, “Applications of pox virus vectors to vaccination: An update”, PNAS USA 93:11349-11353, octubre de 1996; Moss, “Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination and safety”, PNAS USA 93:11341-11348, octubre de 1996; Smith *et al.*, patente US nº 4.745.051 (baculovirus recombinante); Richardson, C.D. (editor), Methods in Molecular Biology 39, “Baculovirus Expression Protocols” (1995, Humana Press Inc.); Smith *et al.*, “Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector”, Molecular and Cellular Biology, Diciembre de 1983, vol. 3, nº 12, páginas 2156-2165; Pennock *et al.*, “Strong and Regulated Expression of *Escherichia coli* B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector”, Molecular and Cellular Biology, marzo de 1984, vol. 4, nº 3, páginas 399-406; EP nº A-0 370 573, publicación de patente EP nº 265785, patente US nº 4.769.331 (herpesvirus recombinante); Roizman, “The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors”, PNAS USA 93:11307-11312, octubre de 1996; Andreansky *et al.*, “The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors”, PNAS USA 93:11313-11318, octubre de 1996; Robertson *et al.*, “Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes”, PNAS USA 93:11334-11340, octubre de 1996; Frolov *et al.*, “Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications, PNAS USA 93:11371-11377, octubre de 1996; Kitson *et al.*, J. Virol. 65:3068-3075, 1991; patentes US nº 5.591.439, nº 5.552.143, nº 6.156.567 y nº 6.090.393, adenovirus recombinantes); Grunhaus *et al.*, 1992, “Adenovirus as cloning vectors”, Seminars in Virology (vol. 3), páginas 237-52, 1993; Ballay *et al.*, EMBO Journal, vol. 4, páginas 3861-65; Graham, Tibtech 8:85-87, abril de 1990; Prevec *et al.*, J. Gen. Virol. 70:429-434, PCT nº WO91/11525; 65 Felgner *et al.*, J. Biol. Chem. 269:2550-2561, 1994; Science 259:1745-49, 1993, y McClements *et al.*, “Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease”, PNAS USA 93:11414-11420, octubre de 1996, y patentes US nº 5.591.639, nº 5.589.466 y nº 5.580.859 referentes a vectores de expresión de ADN, *inter alia*. Ver también la patente

WO n° 98/33510; Ju *et al.*, Diabetologia 41:736-739, 1998 (sistema de expresión lentivírico); Sanford *et al.*, patente US n° 4.945.050; Fischbach *et al.* (Intracel), patente WO n° 90/01543; Robinson *et al.*, seminars in IMMUNOLOGY, vol. 9, páginas 271-283, 1997 (sistemas de vector de ADN); Szoka *et al.*, patente US n° 4.394.448 (procedimiento para insertar ADN en células vivas); McCormick *et al.*, patente US n° 5.677.178 (utilización de virus citopáticos);
 5 patente US n° 5.928.913 (vectores para el transporte génico) y Tartaglia *et al.*, patente US n° 5.990.091 (vectores que presentan expresión incrementada), así como otros documentos citados en la presente invención. Un vector vírico, por ejemplo seleccionado de entre virus herpes, adenovirus, poxvirus, especialmente virus vaccinia, poxvirus aviar, poxvirus del canario, así como vectores de ADN (plásmidos de ADN), se utiliza ventajosamente en la práctica de la invención, especialmente para la expresión *in vivo* (mientras que los sistemas bacterianos y de levadura se utilizan
 10 ventajosamente para la expresión *in vitro*).

Si la combinación de huésped-vector conduce a la producción de antígeno sin excreción, para conveniencia de la producción y recuperación del mismo, estos antígenos preferentemente se encuentran en forma de proteínas de fusión (por ejemplo una etiqueta HIS). En otras palabras, el antígeno puede comprender el antígeno *per se* y aminoácidos
 15 foráneos.

Pueden utilizarse técnicas para la purificación y/o aislamiento de proteínas a partir de la presente exposición y documentos citados en la presente invención, *inter alia*, y de esta manera comprendidos dentro de los conocimientos del experto en la materia, sin necesidad de experimentación excesiva, con el fin de purificar y/o aislar productos de
 20 expresión recombinantes o de vector y/o uno o más antígenos, en la práctica de la invención, y entre dichas técnicas, en general, pueden incluirse: la precipitación, aprovechando la solubilidad de la proteína de interés a concentraciones salinas variables, la precipitación con solventes orgánicos, polímeros y otros materiales, la precipitación por afinidad y la desnaturalización selectiva; la cromatografía de columna, incluyendo la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, de inmutafinidad o de pigmento-ligando; la inmuta-
 25 precipitación y la utilización de filtración en gel, los procedimientos electroforéticos, la ultrafiltración y el enfoque isoelectrico, *inter alia*.

Tal como se indica en la presente invención, según otro aspecto, la invención incluye que los antígenos y/o epítomos de interés no se encuentra incorporados en forma de subunidades en la composición, sino que se expresan *in vivo*, por
 30 ejemplo la invención incluye que la composición comprende uno o más vectores recombinantes que expresan los antígenos *in vivo* cuando se administran al animal. El vector puede comprender un vector plásmido de ADN, un herpesvirus, un adenovirus, un poxvirus, incluyendo un virus vaccinia, un poxvirus aviar, un poxvirus del canario y un poxvirus del cerdo y similares. Las composiciones en vectores pueden comprender un vector que contiene y expresa una secuencia de nucleótidos del antígeno que debe expresarse, por ejemplo Cp15/60 y/o Cp23 para *Cryptosporidium*
 35 *parvum*.

La palabra plásmido pretende incluir cualquier unidad de transcripción de ADN en la forma de una secuencia polinucleótida que comprende la secuencia que debe expresarse. Ventajosamente el plásmido incluye elementos necesarios para la expresión de dicha secuencia; por ejemplo para la expresión *in vivo*. La forma de plásmido circular,
 40 superenrollada o en otra forma, resulta ventajosa y la forma lineal también se encuentra comprendida dentro del alcance de la invención. El plásmido puede ser un plásmido desnudo o un plásmido formulado, por ejemplo, en el interior de lípidos o liposomas, por ejemplo liposomas catiónicos (ver, por ejemplo, las patentes WO n° A-90 11082, n° A-92 191183, n° A-96 21797 y n° A-95 20660). La composición inmunológica o de vacuna en plásmido puede administrarse por medio de una pistola génica, o intramuscular o nasalmente, o mediante cualquier otro medio que
 45 permita la expresión *in vivo*, y ventajosamente, una respuesta inmunológica o protectora.

Se han presentado solicitudes que incluyen vacunas de ADN y/o de vector, o composiciones inmunogénicas o inmunológicas para felinos, caninos, bovinos y equinos, y las composiciones de la invención pueden incluir vacunas de ADN y/o de vector o composiciones inmunogénicas o inmunológicas de dichas solicitudes, y/o pueden prepararse
 50 y/o formularse y/o administrarse composiciones de la invención de una manera análoga a las composiciones de dichas solicitudes.

Pueden prepararse composiciones para la utilización en la invención según técnicas estándares bien conocidas por los expertos en las técnicas veterinarias o farmacéuticas o médicas. Dichas composiciones pueden administrarse en
 55 dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas veterinarias, considerando factores tales como la edad, el sexo, el peso, la condición y el tratamiento particular del animal, y la vía de administración. Los componentes de las composiciones de la invención pueden administrarse individualmente o pueden coadministrarse o administrarse secuencialmente con otras composiciones (por ejemplo el antígeno o antígenos y/o epítomo o epítomos de *C. parvum* pueden administrarse individualmente, y después administrarse secuencialmente uno o más antígenos y/o
 60 uno o más epítomos de otros patógenos entéricos, o composiciones que comprende uno o más antígenos o uno o más epítomos entéricos pueden incluir vectores o recombinantes o plásmidos que también expresan uno o más antígenos o uno o más epítomos entéricos del mismo patógeno o de patógenos diferentes) o con otras composiciones profilácticas o terapéuticas (por ejemplo otras composiciones inmunogénicas, inmunológicas o de vacuna). De esta manera, la invención proporciona composiciones multivalentes o de "cóctel" o de combinación, y procedimientos que utilizan los
 65 mismos. Los ingredientes y el modo de administración (secuencial, por ejemplo como parte de un régimen de primado-refuerzo, o como parte de un programa de refuerzo en el que la composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna se administra periódicamente durante la vida del animal, tal como un programa de refuerzo anual, estacional, bianual y similar, o la coadministración), así como las dosis, pueden determinarse considerando factores tales como la edad,

el sexo, el peso, la condición y el tratamiento particular del animal, por ejemplo una vaca, y la vía de administración. A este respecto, se hace referencia a la patente US nº 5.843.456 y a composiciones y composiciones de combinación para la rabia y usos de las mismas.

Las composiciones de la invención pueden utilizarse para la administración parenteral o mucosa, preferentemente por vías intradérmica, subcutánea o intramuscular. Cuando se utiliza la administración mucosa, resulta posible utilizar las vías oral, nasal o vaginal.

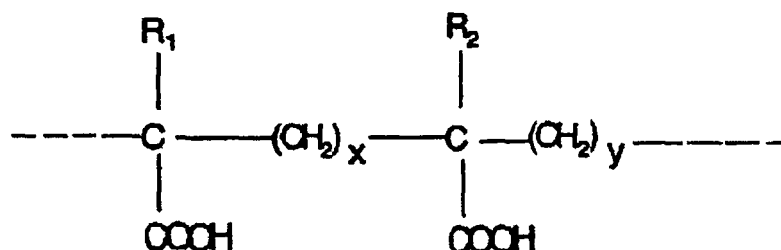
En dichas composiciones, el vector o vectores, o el antígeno o antígenos o el epítipo o epítipos de interés pueden encontrarse en una mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similar. Las composiciones también pueden encontrarse liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes tamponadores del pH, adyuvantes, conservantes, excipientes polímero utilizados para las vías mucosales, y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada.

Pueden consultarse textos convencionales, tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17a edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin necesidad de experimentación excesiva. Las dosis adecuadas también pueden basarse en el texto de la presente invención y en los documentos citados en la presente memoria.

Los adyuvantes son sustancias que incrementan la respuesta inmunológica frente a antígenos. Los adyuvantes pueden incluir el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, las saponinas, por ejemplo Quil A, emulsiones de aceite mineral, polímeros plurónicos con emulsión en aceite mineral o metabolizable, el adyuvante de agua-en-aceite, el adyuvante de aceite-en-agua, los polímeros sintéticos (por ejemplo homopolímeros y copolímeros de ácido láctico y glicólico, que se han utilizado para producir microesferas para encapsular antígenos, ver Eldridge *et al.*, Mol. Immunol. 28:287-294, 1993, por ejemplo las microesferas biodegradables), los copolímeros en bloque no iónicos, los copolímeros de bajo peso molecular en emulsiones de base aceite (ver Hunter *et al.*, The Theory and Practical Application of Adjuvants (editor Stewart-Tull, D.E.S.), John Wiley and Sons, NY, páginas 51 a 94, 1995), copolímeros de elevado peso molecular en formulaciones acuosas (Todd *et al.*, Vaccine 15:564-570, 1997), citoquinas, tales como IL-2 y IL-12 (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.334.379) y GM-CSF (factor estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos; ver de manera general las patentes US nº 4.999.291 y nº 5.461.663, ver también Clark *et al.*, Science 230:1229, 1987; Grant *et al.*, Drugs 53:516, 1992), ventajosamente GM-CSF procedente de especies animales que deben vacunarse, *inter alia*. Determinados adyuvantes pueden expresarse *in vivo* con uno o más antígenos y/o uno o más epítipos; por ejemplo citoquinas, GM-CSF (ver, por ejemplo, CR. Maliszewski *et al.*, Molec. Immunol. 25(9):843-50, 1988; S.R. Leong, Vet. Immunol. and Immunopath. 21:261-78, 1989, referente a GM-CSF bovino. Puede modificarse un plásmido codificante de GM-CSF para que contenga y exprese ADN codificante de un antígeno de un patógeno bovino para la utilización según la invención y/o un epítipo del mismo opcionalmente también con ADN codificante de un antígeno y/o epítipo de otro patógeno bovino, o puede utilizarse conjuntamente con dicho plásmido).

Un ejemplo adicional de adyuvante es un compuesto seleccionado de entre polímeros de ácido acrílico o metacrílico y de los copolímeros de anhídrido maleico y derivado alquénico. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico metacrílico que se encuentran entrecruzados, especialmente con éteres polialquénico de azúcares o de polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término "carbómero" (Pharmeuropa vol. 8, nº 2, junio de 1996). Los expertos en la materia también pueden hacer referencia a la patente US nº 2.909.462, que describe dichos polímeros acrílicos entrecruzados con un compuesto polihidroxilado que presenta por lo menos 3 grupos hidroxilados, preferentemente no más de 8, sustituyéndose los átomos de hidrógeno de por lo menos tres hidroxilos por radicales alifáticos insaturados que presentan por lo menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferentes son aquellos que contienen entre 2 y 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden ellos mismos contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados bajo la denominación Carbopol® (B.F. Goodrich, Ohio, USA) resultan particularmente apropiados. Se encuentran entrecruzados con alil-sacarosa o con alil-pentaeritritol. Entre ellos pueden mencionarse Carbopol® 974P, 934P y 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado alquénico, resultan preferentes los copolímeros EMA® (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno, lineales o entrecruzados, por ejemplo entrecruzados con éter divinílico. Puede hacerse referencia a J. Fields *et al.*, Nature 186:778-780, 4 de junio de 1960.

Desde el punto de vista de su estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros EMA® preferentemente se encuentran formados de unidades básicas que presentan la fórmula siguiente:



en la que:

R_1 y R_2 , idénticos o diferentes, representan H o CH_3 ,

$x=0$ ó 1 , preferentemente $x=1$, y

$y=1$ ó 2 , donde $x+y=2$.

Para los copolímeros EMA[®], $x=0$ e $y=2$. Para los carbómeros, $x=y=1$.

La disolución de dichos polímeros en agua conduce una solución ácida que se neutraliza, preferentemente hasta el pH fisiológico, con el fin de proporcionar la solución adyuvante en la que se incorporará la composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna misma. Los grupos carboxilo del polímero se encuentran en este caso en forma de COO^- .

Preferentemente, se prepara una solución de adyuvante según la invención, especialmente de carbómero, en agua destilada, preferentemente en presencia de cloruro sódico, siendo la solución obtenida de pH ácido. Esta solución madre se diluye mediante adición de la misma a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada), o a una parte sustancial de la misma, de agua cargada con NaCl, preferentemente solución salina fisiológica (NaCl 9 g/l) de una vez en varias partes con neutralización concomitante o posterior (pH 7,3 a 7,4), preferentemente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico se utiliza sin tratamiento para la mezcla con la vacuna, que puede almacenarse especialmente en forma liofilizada, líquida o congelada.

La concentración de polímero en la composición de vacuna final puede ser de 0,01% a 2% p/v, por ejemplo 0,06 a 1% p/v, tal como 0,1 a 0,6% p/v.

También pueden prepararse composiciones inmunogénicas y de vacuna adyuvantes mediante la formulación de las mismas en la forma de emulsiones, en particular de emulsiones de aceite-en-agua, por ejemplo una emulsión, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 en "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", editado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press, 1995, o la emulsión MF59, descrita en la página 183 en la misma obra. En particular, la emulsión de aceite-en-agua puede basarse en aceite de parafina líquida ligera (según la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide, tal como escualano, escualeno, aceite obtenido mediante oligomerización de alquenos, en particular de isobutileno o de deceno; ácidos o ésteres de alcohol con grupos alquilo lineales, particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerol, dioleato de propilenglicol, ésteres de ácido grasos o alcoholes ramificados, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsiones preferentemente son surfactantes no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, ésteres de manida, ésteres de glicerol, ésteres de poliglicerol, ésteres de propilenglicol o ésteres de ácido oleico, de ácido isosteárico, de ácido ricinoleico, de ácido hidroxisteárico, posiblemente copolímeros en bloque etoxilados, tales como polioxipropilen-polioxietileno, en particular los productos denominados Pluronic, (en particular Pluronic L121).

A partir la presente exposición y de los conocimientos de que dispone la técnica, el experto en la materia puede seleccionar un adyuvante adecuado, si se desea, y la cantidad del mismo para la utilización en una composición inmunológica, inmunogénica o de vacuna según la invención sin necesidad de experimentación excesiva.

Las composiciones inmunológicas o de vacuna según la invención pueden asociarse a por lo menos una vacuna viva, atenuada, inactividad o de subunidad, o vacuna recombinante (por ejemplo poxvirus como plásmido vector o plásmido de ADN) que expresa por lo menos un inmunógeno, antígeno o epítipo de interés de otro patógeno.

Las composiciones en formas para diversas vías de administración se encuentran contempladas por la invención. Y nuevamente, la dosis y vía de administración eficaces se encuentran determinadas por factores conocidos, tales como la edad y el peso. Las dosis de cada agente activo, por ejemplo de cada antígeno o epítipo de *C. parvum* de interés y/o de cada antígeno o epítipo de cada patógeno entérico pueden ser tal como en los documentos citados en la presente memoria o tal como se mencionan de otra manera en la presente memoria y/o pueden ser de entre un microgramo o unos cuantos microgramos y unos cuantos cientos o miles de microgramos, por ejemplo 1 μg a 1 mg, para una composición de subunidad inmunogénica, inmunológica o de vacuna, y de 10^4 a 10^{10} TCID₅₀, ventajosamente 10^6 a 10^8 TCID₅₀, antes de la inactivación, para una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna inactivada.

Pueden administrarse recombinantes o vectores en una cantidad adecuada para obtener la expresión *in vivo* correspondiente a las dosis indicadas en la presente invención y/o en los documentos citados en la presente memoria. Por ejemplo, pueden determinarse empíricamente intervalos adecuados para las suspensiones víricas. El vector vírico o recombinante para la utilización en la composición de la invención puede administrarse en el animal o infectarse o transfectarse en células en una cantidad de aproximadamente por lo menos 10^3 pfu, más preferentemente de entre aproximadamente 10^4 pfu y aproximadamente 10^{10} pfu, por ejemplo de entre aproximadamente 10^5 pfu y aproximadamente 10^9 pfu, por ejemplo de entre aproximadamente 10^6 pfu y aproximadamente 10^8 pfu, con dosis generalmente comprendidas entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{10} , preferentemente aproximadamente 10^{10} pfu/dosis, y ventajosamente de aproximadamente 10^8 pfu por dosis de entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 5 ml, ventajosamente de aproximadamente 2 ml. Además, si se expresa más de un producto génico en más de un recombinante, cada recombinante puede administrarse en dichas cantidades, o cada recombinante puede administrarse de

manera que la cantidad es, en combinación, de una suma de recombinantes que comprende dichas cantidades. En las composiciones de plásmido utilizadas en la invención, las dosis pueden ser tales como las descritas en los documentos citados en la presente memoria o tales como las descritas en la presente memoria. Ventajosamente, la dosis debe ser una cantidad suficiente de plásmido para inducir una respuesta análoga a dosis en dichas composiciones, o para que presenta una expresión análoga a la expresión obtenida *in vivo* por las composiciones recombinantes. Por ejemplo, las cantidades adecuadas de cada plásmido de ADN en composiciones de plásmido puede ser de entre 1 μ g y 2 mg, preferentemente de entre 50 μ g y 1 mg. El experto en la materia puede consultar los documentos citados en la presente memoria con respecto a los vectores plásmido de ADN con el fin de determinar otras dosis adecuadas para el vector plásmido de ADN para la utilización en composiciones de la invención, sin necesidad de experimentación excesiva.

Sin embargo, la dosis de la composición o composiciones, la concentración de los componentes en las mismas y la temporización de la administración de la composición o composiciones, que inducen una respuesta inmunológica adecuada, pueden determinarse mediante procedimientos tales como mediante titulaciones de anticuerpos de sueros, por ejemplo mediante ELISA y/o análisis de ensayo de seroneutralización y/o de seroprotección. Estas determinaciones no requieren experimentación excesiva, a partir de los conocimientos del experto en la materia, la presente exposición y de los documentos citados en la presente memoria. Además, los tiempos para las administraciones secuenciales pueden determinarse de la misma manera mediante procedimientos determinables a partir de la presente exposición, y a partir de los conocimientos de la técnica, sin necesidad de experimentación excesiva.

Preferentemente, la composición entérica combinada inmunológica o de vacuna comprende ambos antígenos de *Cryptosporidium parvum* tal como se ha definido anteriormente.

Los antígenos o epítomos de patógenos entéricos ventajosamente combinados con uno o más antígenos o epítomos de *Cryptosporidium* (ventajosamente P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, tales como P21 o Cp23 y Cp15/60, o uno o más epítomos de los mismos) pueden comprender uno o más antígenos o epítomos de interés de *E. coli* y/o de rotavirus y/o de coronavirus, y/o de *Clostridium* spp., tal como *Cl. perfringens*; por ejemplo, por lo menos un antígeno o epítomo de interés de *E. coli*, rotavirus y coronavirus. Entre los antígenos de *E. coli* preferentemente se incluyen uno, preferentemente varios (más de uno), más preferentemente la totalidad, de los antígenos denominados K99, F41, Y y 31A y/o epítomos de los mismos. Son antígenos preferentes K99 y F41. Una composición de esta manera comprende ventajosamente uno de entre K99 y F41, y preferentemente ambos. También resulta preferente que una composición comprenda también Y y/o 31A, ventajosamente Y y 31A. Por ejemplo, estos antígenos pueden incorporarse como subunidades o pueden ser transportados por bacterias *E. coli*. Preferentemente las composiciones según la invención comprenden por lo menos un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* que porta el antígeno K99, *E. coli* que porta el antígeno F41, *E. coli* que porta el antígeno Y, *E. coli* que porta el antígeno 31A, antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y, antígeno 31A y cualquier mezcla de los mismos.

Tal como se menciona en la presente memoria, *E. coli* puede utilizarse para producir antígenos o epítomos de *Cryptosporidium parvum*. Los antígenos o epítomos de *Cryptosporidium parvum* pueden expresarse en una cepa de *E. coli* que expresa por lo menos uno de los antígenos de *E. coli* de manera que se lleva a cabo la expresión simultánea de antígenos de *E. coli* y de *Cryptosporidium parvum*. Para la expresión *in vitro*, seguidamente las células pueden romperse de manera convencional y recuperarse los antígenos o epítomos de *E. coli* y de *Cryptosporidium parvum*; ventajosamente, si la expresión de los antígenos o epítomos es interna o no superficial, los antígenos o epítomos se expresan en forma de proteínas de fusión o con etiquetas, por ejemplo etiquetas HIS. Para la expresión *in vivo*, ventajosamente las moléculas de ácido nucleico codificante de los antígenos o epítomos se ligan a una secuencia de señal de manera que se produzca la expresión extracelular de los antígenos o epítomos, y ventajosamente, *E. coli* es no patógeno. De esta manera, *E. coli* puede ser, en determinadas realizaciones, el antígeno o epítomo de interés.

A título de información, los antígenos de *Clostridium perfringens* preferentemente son toxoides de tipo C y/o D, más preferentemente toxoides de tipo C y D.

Se menciona en la presente invención una composición entérica combinada inmunológica, inmunogénica o de vacuna para especies bovinas, que comprende por lo menos un antígeno o epítomo de por lo menos una especie de *Cryptosporidium*, incluyendo *Cryptosporidium parvum*, ventajosamente P21 y/o Cp23 y/o Cp15/60 y/o CP41, tal como P21 o Cp23 y Cp15/60 y/o un epítomo de interés de los mismos, y por lo menos un antígeno o epítomo de por lo menos un patógeno entérico bovino adicional, tal como *E. coli*, rotavirus bovino, coronavirus bovino y *Clostridium perfringens*, o combinaciones de los mismos, y preferentemente incluyendo por lo menos un antígeno o epítomo de cada uno de dichos patógenos o por lo menos un antígeno o epítomo de *E. coli*, rotavirus y coronavirus. Con respecto a un epítomo de interés de un antígeno deseado y de cómo determinar qué parte de un antígeno es un epítomo de interés, se hace referencia a las patentes US n° 5.990.091, n° 6.090.393 y n° 6.156.576. A partir de la exposición de la presente invención y de los conocimientos de la técnica, tal como en los documentos citados en la presente memoria, no se requiere experimentación excesiva para determinar un epítomo de interés, o para formular una composición en la invención que comprenda uno o más antígenos y/o epítomos y/o vectores que expresen uno o más antígenos y/o epítomos.

Según una realización preferente, la invención proporciona una composición entérica bovina inmunológica o de vacuna que comprende antígenos de *E. coli* tal como se comenta en la presente invención, tales como los antígenos K99, F41, Y y 31A, así como coronavirus bovino inactivado y rotavirus bovino inactivado. Esta composición además puede incluir toxoides de *Clostridium perfringens* tipo C y D. Preferentemente, la valencia de *E. coli* comprende *E.*

ES 2 301 498 T3

coli inactivados que portan antígeno K99, *E. coli* inactivados que portan antígeno F41, *E. coli* inactivados que portan antígeno Y y *E. coli* inactivados que portan antígeno 31A o antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y y antígeno 31A.

Otro aspecto de la presente invención es una composición inmunológica o de vacuna contra *Cryptosporidium parvum*, que comprende los antígenos Cp23 o P21 y Cp15/60 o epítomos de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según una realización ventajosa, dichos antígenos se incorporan en la composición como proteínas o antígenos de subunidad. Pueden producirse mediante síntesis química o mediante expresión *in vitro*. Para una producción conveniente mediante expresión en un huésped adecuado, y su recuperación, estos antígenos preferentemente se encuentran en forma de proteína de fusión (por ejemplo con etiqueta HIS). En otras palabras, el antígeno puede comprender el antígeno *per se* y aminoácidos foráneos.

Según otra realización, estos antígenos no se incorporan como subunidades en la composición, sino que la composición comprende un vector recombinante que expresa Cp23 o P21 y Cp15/60 o un epítomo de los mismos o un vector recombinante que expresa Cp23 o P21 o un epítomo de los mismos y un vector recombinante que expresa Cp15/60 o un epítomo del mismo, en el que estos vectores expresan el antígeno o antígenos o el epítomo o epítomos *in vivo* cuando se administran en el animal. La composición puede contener un antígeno o epítomo y un vector que expresa el otro antígeno o epítomo.

Se mencionan en la presente invención procedimientos de vacunación en los que se administra en un animal diana una composición entérica combinada inmunológica o de vacuna o una composición inmunológica o de vacuna contra *Cryptosporidium parvum* según la invención. Se comenta en la presente invención un procedimiento de inmunización de un bovino neonato contra enfermedades entéricas, que comprende administrar una composición inmunológica o de vacuna que comprende antígenos de *Cryptosporidium parvum* Cp23 o P21 y Cp15/60 o epítomos de los mismos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una vaca o ternera gestante antes del parto, de manera que el bovino neonato presente anticuerpos maternos contra *Cryptosporidium parvum*. Preferentemente, el procedimiento comprende la alimentación del bovino neonato con calostro y/o leche procedente de una vaca, por ejemplo la madre, que ha sido vacunada de esta manera. Para la vacunación o inmunización contra enfermedades entéricas puede utilizarse no sólo una vacuna combinada o una composición inmunogénica o inmunológica que contenga las diversas valencias, sino también composiciones separadas de vacuna, inmunogénicas o inmunológicas que pueden administrarse separadamente, por ejemplo secuencialmente, o que pueden mezclarse antes de la utilización.

Los antígenos y epítomos de interés útiles en las composiciones y procedimientos de la invención pueden producirse utilizando cualquier procedimiento disponible para el experto en la materia y, por ejemplo, utilizando los procedimientos en las patentes US nº A-5.591.434 y WO nº A-9807320. Además, pueden obtenerse antígenos de otros patógenos entéricos de fuentes disponibles comercialmente, tales como TRIVACTON®6, por ejemplo Cp23 y/o P21 y/o Cp15/60 o un epítomo de los mismos, por ejemplo P21 o Cp23 y Cp15/60 o un epítomo de los mismos, o puede añadirse un vector que expresa este antígeno o antígenos o epítomo o epítomos a TRIVACTON®6 en cantidades especificadas en la presente invención. Pueden añadirse toxoides C y D de *Clostridium perfringens* a TRIVACTON®6. Además, pueden sustituirse en TRIVACTON®6 los *E. coli* inactivados que portan fimbrias por fimbrias aisladas. También se mencionan en la presente invención dicha composición de vacuna, inmunogénica o inmunológica (con *E. coli* inactivados o con fimbrias aisladas) a la que se añaden uno o más antígenos o epítomos de *C. parvum* o uno o más antígenos o epítomos de *Clostridium perfringens* y procedimientos para preparar y utilizar dicha composición y kits para la misma.

Además, respecto a la valencia de *E. coli* y/o el antígeno o antígenos y/o epítomo o epítomos que resultan útiles en la práctica de la invención, se hace referencia a los documentos EP nº A-80.412, nº A-60.129, GB nº A-2.094.314 y patentes US nº 4.298.597, nº 5.804.198, nº 4.788.056, nº 3.975.517, nº 4.237.115, nº 3.907.987, nº 4.338.298, nº 4.443.547, nº 4.343.792, nº 4.788.056 y nº 4.311.797. Respecto al antígeno o antígenos y/o epítomo o epítomos de rotavirus, se hace referencia a P.S. Paul y Y.S. Lyoo, Vet. Microb. 37:299-317, 1993, y a las patentes US nº 3.914.408 y nº 5.620.896. Con respecto al antígeno o antígenos y/o epítomo o epítomos de coronavirus, se hace referencia a las patentes WO nº A-98 40097, nº A-96 41874 y a las patentes U nº 3.914.408 y nº 3.919.413. Para el antígeno o antígenos y/o epítomo o epítomos de *Clostridium*, por ejemplo de *Cl. perfringens*, se hace referencia a las patentes WO nº A-94 22476, EP nº A-734.731, WO nº A-98 27964, GB nº A-2.050.830, GB nº A-1.128.325, D. Calmels y Ph. Desmetre, IV Symposium of the Commission for the study of animal diseases caused by anaerobes, Paris, 16-18 nov., 1982, patentes US nº 5.178.860, nº 4.981.684 y nº 4.292.307 y a IMOTOXAN® (MERIAL, Lyon, Francia) (que contiene *Cl. perfringens* tipos B, C, D, toxoides procedentes de *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. tetani* y cultivo de *Cl. chauvoei*). Además de TRIVACTON®6 pueden utilizarse otras vacunas combinadas comerciales a las que puede añadirse valencia de *C. parvum*, por ejemplo SCOURGUARD 3(K)/C® (SmithKline Beecham) que contenga rotavirus y coronavirus bovinos inactivados, bacterina de *E. coli* K99 y toxoide de *Cl. perfringens* tipo C.

Un procedimiento preferente de obtención de antígenos o epítomos de interés es clonar la secuencia de ADN codificante del antígeno o epítomo de interés en un plásmido de fusión o no de fusión y expresarla en *E. coli*. Los plásmidos de fusión (por ejemplo que expresan el antígeno o antígenos o epítomo o epítomos con una etiqueta, tal como una etiqueta His) resultan preferentes debido a que permiten recuperar fácilmente el antígeno producido. Se describen plásmidos adecuados en los ejemplos. Se menciona en la presente invención la producción de antígenos mediante síntesis química.

Se mencionan en la presente invención procedimientos para utilizar antígenos o epítomos o vectores comentados en la presente invención que expresan dichos antígenos o epítomos para la preparación de una composición de vacuna, inmunológica o inmunogénica, por ejemplo contra *C. parvum* o contra enfermedades entéricas, por ejemplo mediante mezcla de los antígenos, epítomos o vectores con un portador o diluyente adecuado o aceptable y opcionalmente también con un adyuvante. Las composiciones pueden liofilizarse para después reconstituirse. La invención además incluye un kit para la preparación de una composición de la invención. El kit puede comprender el antígeno o antígenos, el epítomo o epítomos y/o el vector o vectores, portador y/o diluyente y opcionalmente adyuvante; los ingredientes pueden encontrarse en recipientes separados. Los recipientes que contienen los ingredientes pueden encontrarse en el interior de uno o más paquetes, y el kit puede incluir instrucciones para la mezcla de los ingredientes y/o para la administración de la composición de vacuna, inmunogénica o inmunológica.

También se describe en la presente invención la producción de calostro y/o leche hiperinmunológica; por ejemplo mediante hiperinmunización del mamífero hembra gestante (tal como la vaca) mediante por lo menos 1, ventajosamente por lo menos 2, y más ventajosamente por lo menos 3, administraciones de la composición o composiciones de la invención (por ejemplo una composición de *C. parvum* o una composición entérica combinada según la invención). Opcionalmente, aunque ventajosamente, el calostro y/o leche producida de esta manera seguidamente puede tratarse para concentrar las inmunoglobulinas y para eliminar los componentes del calostro o de la leche que no contribuyen a la respuesta inmunológica, inmunogénica y/o de vacuna deseada o al valor nutricional del calostro o de la leche. Este tratamiento puede comprender ventajosamente la coagulación del calostro o de la leche, por ejemplo con renina, y recuperarse la fase líquida que contiene las inmunoglobulinas. Se menciona en la presente invención calostro o leche o una mezcla de los mismos hiperinmunológica y/o composiciones que comprenden el calostro o leche o mezcla de los mismos hiperinmunológica. Además, se describe en la presente invención la utilización del calostro o leche o mezcla de ambos hiperinmunológica o de una composición que comprende los mismos para prevenir o tratar la infección por *C. parvum* y/o entérica en un animal joven, tal como un neonato, por ejemplo un bovino.

Por consiguiente, la invención se describe adicionalmente mediante los Ejemplos siguientes, proporcionados a título ilustrativo y que no deben interpretarse como limitativos de la invención.

Ejemplos

Lista de secuencias

35	SEC ID n° 1	oligonucleótido JCA295
	SEC ID n° 2	oligonucleótido JCA296
	SEC ID n° 3	oligonucleótido JCA297
40	SEC ID n° 4	oligonucleótido JCA298
	SEC ID n° 5	oligonucleótido JCA299
45	SEC ID n° 6	oligonucleótido JCA300
	SEC ID n° 7	oligonucleótido JCA301
	SEC ID n° 8	oligonucleótido JCA302
50	SEC ID n° 9	oligonucleótido JCA303
	SEC ID n° 10	oligonucleótido JCA304

La totalidad de los constructos plásmido se han preparado utilizando técnicas estándares de biología molecular (clonación, digestión de restricción, reacción en cadena de polimerasa (PCR)) tal como se describen en Sambrook, J. *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). La totalidad de los fragmentos de restricción de ADN generados y utilizados para la presente invención, así como los fragmentos de PCR, fueron aislados y purificados utilizando el kit "GeneClean[®]" (BIO101 Inc., La Jolla, CA).

ES 2 301 498 T3

Ejemplo 1

Clonación de los genes de P21 y de Cp15/60 de *C. parvum*

Se aislaron oocistos de *Cryptosporidium parvum* a partir de un bovino infectado y se purificaron a partir de muestras fecales bovinas tal como describen Sagodira, S. *et al.* (Vaccine 17:2346-2355, 1999). A continuación, los oocistos purificados se reservaron en agua destilada a 4°C. Para la utilización como molde para las reacciones de PCR, se liberó el ADN genómico de los oocistos purificados tal como describen Lochmann, S. *et al.* (Microbial Pathogenesis 26:307-315, 1999).

Una fuente alternativa de ADN de *C. parvum* son las bibliotecas genómicas EcoRI de los aislados de *Cryptosporidium parvum* Iowa (A), Iowa (I), KSU-1 y KSU-2, disponibles de la American Tissue Culture Collection (ATCC números 87667, 87668, 87439 y S7664, respectivamente). Los genes de P21 y de Cp15/60 específicos se aislaron de la manera siguiente:

La secuencia codificante de la proteína P21 se amplificó mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando ADN de *C. parvum* y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA295 (35-mero), SEC ID nº 1

5' TTT TTT CCA TGG GGC TCG AGT TTT CGC TTG TGT TG 3'

y oligonucleótido JCA296 (33-mero), SEC ID nº 2

5' TTT TTT GAA TTC TTA GGC ATC AGC TGG CTT GTC 3'

Dicho PCR genera un fragmento de aproximadamente 585 pb. A continuación, este fragmento de PCR se digiere con los enzimas de restricción NcoI y EcoRI con el fin de aislar, tras electroforesis en gel de agarosa y recuperación con el kit GeneClean (BIO101 Inc.), un fragmento de restricción NcoI-EcoRI de 575 pb (=fragmento A). La secuencia de este fragmento codifica una proteína homóloga a la secuencia indicada como SEC ID nº 12 en la solicitud de patente WO nº 98/07320 (PCT/US97/14834).

Se corre un segundo PCR con el fin de amplificar la secuencia codificante de la proteína Cp15/60 y con el fin de añadir sitios de restricción convenientes en los extremo 5' y 3' para la clonación adicional. La PCR se lleva a cabo utilizando ADN de *C. parvum* y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA297 (35-mero), SEC ID nº 3

5' TTT TTT CTC GAG ATG GGT AAC TTG AAA TCC TGT TG 3'

y el oligonucleótido JCA298 (42-mero), SEC ID nº 4

5' TTT TTT GAA TTC TTA GTT AAA GTT TGG TTT GAA TTT GTT TGC 3'

Dicho PCR genera un fragmento de aproximadamente 465 pb. Este fragmento se purifica y después se digiere con XhoI y EcoRI con el fin de obtener, tras electroforesis en gel de agarosa y la recuperación con el kit GeneClean (BIO101 Inc.), el fragmento XhoI-EcoRI de 453 pb (=fragmento B). La secuencia amplificada es homóloga a la secuencia definida entre los nucleótidos nº 31 y nº 528 de la SEC ID nº 1 en la patente US nº 5.591.434 y a las secuencias depositadas en GenBank bajo los números de acceso U22892 y AAC47447.

Ejemplo 2

Construcción del plásmido pJCA155

(Proteína de fusión GST-P21 en el vector pBAD/HisA)

Las secuencias requeridas para expresar la proteína de fusión GST-P21 se amplificaron mediante PCR con el fin de generar 2 fragmentos que pueden clonarse fácilmente en el vector plásmido de expresión pBAD/HisA (nº de cat. V430-01 InVitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008, USA). La primera PCR se lleva a cabo utilizando el plásmido pGEX-2TK (nº de cat. 27-4587-01, Amersham-Pharmacia Biotech) y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA299 (35-mero), SEC ID nº 5

5' TTT TTT CCA TGG GGT CCC CTA TAC TAG GTT ATT GG 3'

y el oligonucleótido JCA300 (45-mero), SEC ID nº 6

5' TTT TTT CTC GAG CCT GCA GCC CGG GGA TCC AAC AGA TGC ACG ACG 3'

ES 2 301 498 T3

Dicho PCR genera un fragmento de aproximadamente 720 pb codificante del grupo GST con la adición de un sitio de restricción NcoI en el extremo 5' con fines de clonación en pBAD/HisA; esta modificación añade un codón glicina a la proteína de fusión GST-P21). Este fragmento de PCR después se digirió con NcoI y XhoI con el fin de obtener, tras electroforesis en gel de agarosa y recuperación con el kit GeneClean (BIO101 Inc.), el fragmento NcoI-XhoI de 710 pb (=fragmento C).

Se llevó a cabo la segunda PCR utilizando ADN de *C. parvum* y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA301 (33-mero), SEC ID nº 7

5' TTT TTT CTC GAG TTT TCG CTT GTG TTG TAC AGC 3'

y el oligonucleótido JCA296 (33-mero), SEC ID nº 2

Dicha PCR generó un fragmento de aproximadamente 580 pb codificante del grupo P21 con la adición de los sitios de restricción XhoI y EcoRI en los extremo 5' y 3', respectivamente. A continuación, este fragmento de PCR se digirió con XhoI y EcoRI con el fin de obtener, tras electroforesis en gel de agarosa y recuperación con el kit GeneClean (BIO101 Inc.), el fragmento XhoI-EcoRI de 572 pb (=fragmento D).

Se digirió el plásmido pBAD/HisA (nº de cat. V430-01, InVitrogen Corp.) con NcoI y EcoRI. Los fragmentos digeridos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa con el fin de recuperar (kit GeneClean, BIO101 Inc.) el fragmento de restricción NcoI-EcoRI de 3.960 pb (=fragmento E).

A continuación, se ligaron los fragmentos C, D y E, generando el plásmido pJCA155. Este plásmido presenta una longitud total de 5.243 pb (figura 1) y codifica una proteína de fusión GST-P21 de 425 aminoácidos.

Ejemplo 3

Construcción del plásmido pJCA156

(Proteína de fusión His6-P21 en el vector pBAD/HisA)

Se digirió el vector pBAD/HisA (nº de cat. V430-01, InVitrogen) con NcoI y EcoRI y el fragmento de restricción NcoI-EcoRI de 3.960 pb (=fragmento E) se recuperó y se aisló tal como se describe en el Ejemplo 2.

Se llevó a cabo una PCR con el fin de amplificar la secuencia codificante de la proteína de fusión His6-P21 y con el fin de añadir los sitios de restricción NcoI y EcoRI en los extremo 5' y 3', respectivamente, con el fin de subclonar este fragmento de PCR en el vector plásmido pBAD/HisA.

Se llevó a cabo una PCR utilizando ADN de *C. parvum* y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA302 (65-mero), SEC ID nº 8

5' TTT TTT CCA TGG GGG GTT CTC ATC ATC ATC ATC ATG GTC TCG AGT TTT CGC TTG TGT TGT AC 3'

y el oligonucleótido JCA296 (33-mero), SEC ID nº 2

Dicha PCR generó un fragmento de aproximadamente 610 pb. Este fragmento se purificó y después se digirió con NcoI y EcoRI con el fin de aislar, tras electroforesis en gel de agarosa y recuperación con el kit GeneClean (BIO101 Inc.), el fragmento NcoI-EcoRI de 600 pb (=fragmento F).

Se ligaron los fragmentos E y F, generando el plásmido pJCA156. Este plásmido presenta un tamaño total de 4.562 pb (figura 2) y codifica una proteína de fusión His-6/P21 de 199 aminoácidos.

Ejemplo 4

Construcción del plásmido pJCA157

(Proteína P21 sola en el vector pBAD/HisA)

Se digirió el vector pBAD/HisA (nº de cat. V430-01, InVitrogen Corp.) con NcoI y EcoRI y se aisló y se recuperó el fragmento de restricción NcoI-EcoRI de 3.960 pb (=fragmento E) tal como se describe en el Ejemplo 3.

ES 2 301 498 T3

Se llevó a cabo una PCR con el fin de amplificar la secuencia codificante de la proteína P21 y con el fin de añadir los sitios de restricción NcoI y EcoRI en los extremo 5' y 3', respectivamente, con el fin de subclonar dicho fragmento de PCR en el vector plásmido pBAD/HisA. La PCR se llevó a cabo utilizando ADN de *C. parvum* y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA295 (35-mero), SEC ID nº 1

y el oligonucleótido JCA296 (33-mero), SEC ID nº 2

con el fin de obtener, tal como se describe en el Ejemplo 1, un fragmento NcoI-EcoRI de 575 pb (fragmento A)

Se ligaron los fragmentos E y A con el fin de generar el plásmido pJCA157. Este plásmido presenta una longitud total de 4.535 pb (figura 3) y codifica 189 aminoácidos que incluyen la proteína P21.

Ejemplo 5

Construcción del plásmido pJCA158

(Proteína de fusión GST-Cp15/60 en el vector pBAD/HisA)

Se llevó a cabo una PCR con el fin de amplificar la secuencia codificante de la proteína GST y con el fin de añadir sitios de restricción convenientes en los extremo 5' y 3' con el fin de subclonar el fragmento de PCR en el vector plásmido final pBAD/HisA. La PCR utilizaba el ADN del plásmido pGEX-2TK (nº de cat. 27-4587-01, Amersham-Pharmacia Biotech) como molde y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA299 (35-mero), SEC ID nº 5

y el oligonucleótido JCA300 (45-mero), SEC ID nº 6

con el fin de obtener, tal como se describe en el Ejemplo 2, un fragmento NcoI-XhoI de 710 pb (=fragmento C)

Se digirió el vector pBAD/HisA (nº de cat. V430-01, InVitrogen) con NcoI y EcoRI y se recuperó y se aisló el fragmento de restricción NcoI-EcoRI de 3.960 pb (=fragmento E) tal como se describe en el Ejemplo 2.

Se ligaron los fragmentos C, E y B (Ejemplo 1) con el fin de generar el plásmido pJCA158. Este plásmido presenta una longitud total de 5.132 pb (figura 4) y expresa una proteína de fusión GST-Cp15/60 de 388 aminoácidos.

Ejemplo 6

Construcción del plásmido pJCA159

(Proteína de fusión His6-Cp15/60 en el vector pBAD/HisA)

Se digirió el vector pBAD/HisA (nº de cat. V430-01, InVitrogen Corp.) con NcoI y EcoRI y se recuperó y se aisló el fragmento de restricción NcoI-EcoRI de 3.960 pb (=fragmento E) tal como se describe en el Ejemplo 2.

Se corrió una PCR con el fin de amplificar la secuencia codificante de la fusión His6-Cp15/60 y con el fin de añadir sitios de restricción convenientes en los extremos 5' y 3' con el fin de subclonar dicho fragmento de PCR en el vector plásmido pBAD/HisA. Se llevó a cabo la PCR utilizando ADN de *C. parvum* y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA303 (64-mero), SEC ID nº 9

5' TTT TTT CCA TGG GGG GTT CTC ATC ATC ATC ATC ATG GTA TGG GTA ACT TGA AAT
CCT GTT G 3'

y el oligonucleótido JCA298 (42-mero), SEC ID nº 4

Dicha PCR generó un fragmento de aproximadamente 495 pb. Este fragmento se purificó y después se digirió con NcoI y EcoRI con el fin de obtener, tras la electroforesis en gel de agarosa y la recuperación con el kit GeneClean (BIO101 Inc.), el fragmento NcoI-EcoRI de 483 pb (=fragmento G).

ES 2 301 498 T3

Se ligaron los fragmentos E y G con el fin de generar el plásmido pJCA159. Este plásmido presenta una longitud total de 4.445 pb (figura 5) y expresa una proteína de fusión His-6/Cp15/60 de 159 aminoácidos.

5 Ejemplo 7

Construcción del plásmido pJCA160

(Proteína Cp15/60 sola en el vector pBAD/HisA)

Se digirió el vector pBAD/HisA (nº de cat. V430-01, InVitrogen Corp.) con NcoI y EcoRI y se recuperó y se aisló el fragmento de restricción NcoI-EcoRI de 3.960 pb (=fragmento E) tal como se describe en el Ejemplo 2.

Se corrió una PCR con el fin de amplificar la secuencia de la proteína Cp15/60 y con el fin de añadir sitios de restricción convenientes en los extremos 5' y 3' con el fin de clonar dicho fragmento PCR en el vector plásmido pBAD/HisA.

Se llevó a cabo la PCR utilizando ADN de *C. parvum* y los cebadores siguientes:

oligonucleótido JCA304 (31-mero), SEC ID nº 10

5' TTT TTT CCA TGG GTA ACT TGA AAT CCT GTT G 3'

y el oligonucleótido JCA298 (42-mero), SEC ID nº 4

Dicha PCR generó un fragmento de aproximadamente 460 pb. Este fragmento se purificó y después se digirió con NcoI y EcoRI con el fin de obtener, tras electroforesis en gel de agarosa y la recuperación con el kit GeneClean (BIO101 Inc.), el fragmento NcoI-EcoRI de 450 pb (=fragmento H).

Se ligaron los fragmentos E y H con el fin de generar el plásmido pJCA160. Este plásmido presenta una longitud total de 4.412 pb (figura 6) y expresa una proteína Cp15/60 de 148 aminoácidos.

35 Ejemplo 8

Cultivo de clones recombinantes de E. coli e inducción de proteínas recombinantes

Se transformó ADN de plásmido (Ejemplos 2 a 7) en *Escherichia coli* DH5 α (o en cualquier otra cepa *E. coli* K12 bien conocida por los expertos en la materia, tal como *E. coli* TOP10 (nº de cat. C4040-03, InVitrogen Corp.) y se cultivo en placas de ágar con medio Luria-Bertani (LB) con 50 μ g/ml de ampicilina. Se recogió una colonia de cada población de *E. coli* transformada con plásmido y se introdujo en 10 ml de medio LB con ampicilina (u otro antibiótico apropiado) para el crecimiento durante la noche. Se añadió un ml del cultivo de la noche a un litro de medio LB y se cultivó a +30°C hasta que la DO_{600nm} alcanzó aproximadamente 3.0.

Se indujo la producción de proteínas con diferentes concentraciones finales de DL-arabinosa (nº de cat. A9524, Sigma, St. Louis, MO) (intervalo de entre 0,002% y 0,2% para determinar la concentración de rendimiento óptimo) añadidas al cultivo e incubación a +30°C durante 4 a 6 horas.

50 Ejemplo 9

Extracción y purificación de las proteínas de fusión recombinantes

Al finalizar la inducción (Ejemplo 8), las células se recolectaron mediante centrifugación (3.000xg, 10 minutos, +4°C) y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, PMSF 1 μ M, 1 mg/ml de lisozima) y se sonicaron 25 veces con pulsos de 30 segundos y pausas de 1 minuto entre pulsos. Se añadió Triton X-100 hasta una concentración final de 0,1%. Se separaron los residuos mediante centrifugación.

En caso necesario, pueden utilizarse técnicas alternativas (conocidas por los expertos en la materia) para la lisis de las células bacterianas.

9.1. Proteínas recombinantes de fusión de GST

Se purificaron por afinidad proteínas recombinantes de fusión de GST (producidas por *E. coli* transformadas con plásmido pJCA155 o pJCA158) a partir de los lisados bacterianos, preparados tal como se describe en el Ejemplo 8, utilizando una columna de glutatión-agarosa (nº de cat. G4510, Sigma) o de glutatión-sefarosa 4B (nº de cat. 17-0756-01, Amersham-Pharmacia Biotech). Los lisados bacterianos y la glutatión-agarosa se incubaron durante 4 horas

ES 2 301 498 T3

a +4°C. A continuación, las proteínas de fusión de GST se eluyeron de la agarosa en por lotes con glutatión forma reducida 10 mM (n° de cat. G4705, Sigma) bajo condiciones moderadas (K. Johnson y D. Smith, Gene 67:31-40, 1988) (referencia: anónima. Sistema de fusión de gen GST: manual técnico, 3a edición, Arlington Heights, IL: Amersham-Pharmacia Biotech, 1997). Cualquier experto en la materia puede conseguir el escalado de este procedimiento para la purificación de grandes cantidades de proteínas GST-fusión a partir de la presente exposición y de los conocimientos de la técnica, sin necesidad de experimentación excesiva.

9.2. Proteínas recombinantes de fusión de His6

Se prepararon y se purificaron proteínas recombinantes de fusión de His6 utilizando la resina quelante de níquel ProBond™ (n° de cat. R801-15, InVitrogen Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de lisado celular nativo de *E. coli* (proteína recombinante soluble): se recolectaron mediante centrifugación (3.000 g durante 5 minutos) las células bacterianas a partir de un cultivo de 1 litro de *E. coli* (transformado con plásmido pJCA156 o pJCA159). A continuación, el pellet resuspendido se incubó con lisozima de huevo a una concentración final de 100 µg/ml durante 15 minutos en hielo. Esta mezcla seguidamente se sonicó con 2 a 3 pulsos de 10 segundos a intensidad media manteniendo la suspensión en hielo. A continuación, la mezcla se sometió a una serie de ciclos de congelación/descongelación para completar la lisis y los residuos insolubles finalmente se separaron mediante centrifugación a 3.000 g durante 15 minutos. El lisado se clarificó mediante pase a través de un filtro de 0,8 µm y se almacenó en hielo o a -20°C hasta la purificación.

La proteína recombinante soluble de fusión de His6 presente en el lisado clarificado se unió por lotes a una columna de resina preequilibrada de 50 ml ProBond™ (n° de cat. R640-50 y R801-15, InVitrogen Corp.) con dos alícuotas de lisado de 100 ml. La columna se agitó suavemente durante 10 minutos para mantener la resina resuspendida y para permitir la unión completa de la proteína etiquetada con polihistidina. La resina sedimentó por gravedad o mediante centrifugación a baja velocidad (800xg) y se aspiró cuidadosamente el sobrenadante. Se repitió un ciclo idéntico con la segunda alícuota.

Lavado y elución de la columna

Se realizaron 4 etapas consecutivas siguiendo las instrucciones del fabricante (anónimo. Xpress™ System Protein Purification - A Manual of Methods for Purification of Polyhistidine - Containing Recombinant Proteins. InVitrogen Corp. Editor, versión D, 1998):

1. La columna se lavó con 100 ml de tampón de unión nativo, pH 7,8, mediante resuspensión de la resina, agitando durante 2 minutos y después separando la resina del sobrenadante por gravedad o mediante centrifugación. Este procedimiento se repitió 2 veces más (total de 3 lavados)
2. La columna se lavó con 100 ml de tampón de lavado nativo, pH 6,0, mediante resuspensión de la resina, agitando durante 2 minutos y después separando la resina del sobrenadante por gravedad o mediante centrifugación. Este procedimiento se repitió por lo menos 3 veces más hasta que la DO₂₈₀ era inferior a 0,01.
3. La columna se lavó con 100 ml de tampón de lavado nativo, pH 5,5, mediante resuspensión de la resina, agitación durante 2 minutos y después separando la resina del sobrenadante por gravedad o mediante centrifugación. Este procedimiento se repitió una vez (total de 2 lavados).
4. A continuación, la columna se fijó en posición vertical y se abrió el extremo inferior. La proteína recombinante se eluyó con 150 ml del tampón de elución de pH nativo. Se recogieron fracciones de 10 ml. Se realizó un seguimiento de la elución tomando lecturas de DO₂₈₀ de las fracciones.

En caso necesario, la proteína recombinante eluida puede concentrarse mediante diálisis o mediante precipitación con sulfato amónico.

Se midió la concentración final del lote de proteína recombinante a partir de las lecturas de DO₂₈₀.

Cualquier experto en la materia puede conseguir el escalado de dicho procedimiento para la purificación de grandes cantidades de proteínas de fusión de His6 a partir de la presente exposición y de los conocimientos de la técnica sin necesidad de experimentación excesiva.

Ejemplo 10

Extracción y purificación de C. parvum

5 *Proteínas P21 y Cp15 recombinantes no de fusión*

Se cultivaron células bacterianas de *E. coli* (transformadas con plásmido pJCA157 o pJCA160) en 4 litros del medio mínimo M9 (suplementado con los aminoácidos apropiados) (Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989) a 30°C hasta que la DO_{600nm} alcanzó aproximadamente 3,0 y se indujeron tal como se describe en el Ejemplo 8. A continuación, se rompieron las células bacterianas pasándolas por un homogeneizador RANNIE de alta presión Mini-Lab tipo 8.30 H con un caudal máximo de 10 litros por hora y presión de trabajo de entre 0 y 1.000 barios. El lisado se clarificó mediante filtración a través de un filtro CUNO Zeta plus tipo LP, y después se concentró 50 veces en un ultrafiltro PALL Filtron (referencia OS010G01) UF de 10 kDa. Se cargó el concentrado de suspensión de proteínas en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño con gel de alta resolución Sephacryl S-100 bajo un volumen correspondiente a 2%-3% del volumen de la columna. Se realizó la elución con tampón PBS. Las fracciones recogidas correspondientes al peso molecular esperado para las proteínas de vacuna de subunidad se concentraron 10 veces en un cartucho de fibras huecas A/G Technology tipo Midgee, modelo de cartucho UFP-10-B-MB01 (o modelo UFP-10-C-MB01 o modelo UFP-10-E-MB01). A continuación, las muestras concentradas se almacenaron a -70°C hasta la utilización. Las proteínas recombinantes de *C. parvum* específicas seguidamente pueden mezclarse en las proporciones apropiadas con la vacuna asociada final (ver el Ejemplo 11).

Ejemplo 11

25 *Formulación de vacunas; vacunación de vacas gestantes; inmunización pasiva y experimento de reto en bovinos neonatos*

Se administró producto (adyuvado o no) por vía intramuscular (IM), subcutánea (SQ) o intradérmica (ID) con el fin de inducir respuestas de anticuerpos séricos contra *C. parvum*. Al administrarlo dos veces a animales gestantes indujo una respuesta sérica de anticuerpos que se transfirió pasivamente a los neonatos a través del calostro y la leche. El protocolo de vacunación para animales gestantes puede comprender 2 dosis administradas entre el momento del diagnóstico de embarazo y el parto, tal como entre aproximadamente 1 mes antes del parto y aproximadamente 3 a 5 días antes del parto, o entre 2 meses antes del parto (que coincide con el momento del secado de las vacas lecheras) y un refuerzo antes del parto (por ejemplo en cualquier momento entre 3 semanas y 1 semana antes del parto), dependiendo de las prácticas de gestión (sin embargo, estos programas favorecen la eficacia máxima). Las prácticas de gestión actuales favorecen que los productos se administren en el último trimestre. El volumen del producto puede encontrarse comprendido entre 1 ml y 5 ml, tal como 2 ml. Las vacunas de combinación pueden presentar una parte liofilizada y una parte líquida que pueden mezclarse previamente a la inyección. Con el fin de proporcionar la máxima protección bajo condiciones de campo, el antígeno de *Cryptosporidium* puede añadirse como componente de una vacuna de combinación de *E. coli*/rotavirus/coronavirus.

Se llevaron a cabo los estudios siguientes:

45 *Estudio A*

C. parvum incrementa la patogenicidad de los virus y/o bacterias entéricas

Reto experimental utilizando 3 bovinos neonatos por grupo de la manera siguiente:

- 50 1. Coronavirus únicamente
2. Coronavirus más *C. parvum*
- 55 3. *E. coli* F41 únicamente
4. *E. coli* F41 más *C. parvum*
- 60 5. *C. parvum* únicamente
6. Controles no retados

Se retaron bovinos dentro de las primeras 24 horas del nacimiento, por la vía oral. La cantidad de material de reto utilizada era la necesaria para producir signos clínicos (depresión, diarrea, deshidratación) y podía depender del tipo de animal (gnotobiótico criado artificialmente o lactancia convencional). Se registraron los signos clínicos habituales (temperatura, comportamiento, hidratación, puntuación de diarrea, etc.). Se recogió información adicional serológica y de dispersión.

Resultados

Los retos experimentales monovalentes con coronavirus o *E. coli* F41 no produjeron signos clínicos de enfermedad entérica en bovinos neonatos. El reto dual con coronavirus o *E. coli* F41 con *C. parvum* a una dosis de *C. parvum* que normalmente no causa enfermedad clínica, produjo signos clínicos significativos de enfermedad entérica.

Estudio B

*Vacuna de combinación (*E. coli* K99/F41, rotavirus y coronavirus) que contenía *C. parvum* proporciona protección incrementada frente a enfermedades entéricas causadas por la infección concurrente de múltiples virus y/o bacterias entéricas en bovinos neonatos*

Los grupos de tratamiento eran 30 vacas gestantes vacunadas con:

1. Combinación (rotavirus y coronavirus, *E. coli* K99 y F41), 8 animales;
2. Combinación más *Crypto*, 8 animales;
3. Controles no vacunados, 14 animales.

El reto experimental se realizó de la manera siguiente:

1. Reto múltiple (coronavirus y F41 más *C. parvum* a nivel subclínico);
2. Animales centinela,
3. No retados.

Los bovinos recibieron calostro (se alimentaron manualmente o se dejó que los terneros se alimentasen de las madres) y aquellos retados se retaron dentro de las 24 horas del nacimiento, por vía oral. La cantidad de material de reto fue la cantidad necesaria para producir signos clínicos (por ejemplo tal como se determinó en el Estudio A; además, tal como se menciona en el Estudio A, puede variar dependiendo del tipo de animal utilizado (por ejemplo, gnotobiótico criado artificialmente o lactancia convencional de los neonatos con las madres)). Se registraron los signos clínicos habituales (temperatura, comportamiento, puntuaciones de diarrea). Se recogió información adicional serológica y de dispersión.

Diseño

Se retaron 6 bovinos nacidos de vacas vacunadas (combinación y combinación más *Crypto*) o vacas de control con un reto que contenía 3 componentes (coronavirus y F41 más *C. parvum*) y 3 bovinos (de vacas de control no vacunadas) como centinelas.

Resultados

La utilización de una vacuna de combinación que contenía *C. parvum* produjo una mejor protección que una vacuna de combinación sola bajo una situación de reto múltiple (coronavirus y *E. coli* F41 con *C. parvum* a una dosis subclínica).

Ejemplo 12

*Efecto de la infección dual con *C. parvum* y rotavirus bovino en un modelo de reto experimental en bovinos neonatos*

El presente estudio se diseñó para comparar la severidad de los signos clínicos y la excreción fecal en bovinos tras el reto monovalente con *C. parvum* o rotavirus bovino y tras un reto dual con rotavirus bovino más *C. parvum*.

Se utilizaron cuatro grupos de seis bovinos con el fin de obtener suficientes datos para poder detectar diferencias en la incidencia de signos clínicos entre grupos.

Se alojaron individualmente vacas en recintos o potreros. Los bovinos neonatos se separaron de sus madres tan pronto como resultó posible tras el nacimiento, se inspeccionaron para eliminar las heces o los residuos sobre el bovino y se sumergió el cordón umbilical de los mismos en solución de yodo aproximadamente al 7%. A continuación, se transfirieron inmediatamente a recintos de contención y se alojaron individualmente en jaulas metabólicas. Los bovinos se retaron dentro de las 6 horas del nacimiento.

ES 2 301 498 T3

Los bovinos se alimentaron con 1 a 2 cuartos de galón por alimentación o por 10% de peso corporal, dos veces diariamente durante el ensayo completo utilizando un sustituto comercial de leche bovina con 30% de sustituto del calostro. Se procuró especialmente evitar la administración de leche dentro de las 2 horas anteriores y posteriores al reto.

La vía de infección natural es la oral; por lo tanto, todos los retos se administraron oralmente utilizando un tubo esofágico.

Grupo A: bovinos de control no retados.

Grupo B: $1-3 \times 10^5$ oocistos de *C. parvum* (cepa Beltsville) diluidos en 60 ml de leche de soja comercial libre de antibióticos.

Grupo C: coinoculación de $1-3 \times 10^5$ oocistos de *C. parvum* (cepa Beltsville) diluidos en 60 ml de leche de soja comercial libre de antibióticos y de 10 ml de inóculo de rotavirus bovino (cepa IND BRV G6P5) diluidos en 40 ml de PBS.

Grupo D: 10 ml de filtrado fecal procedente de bovinos infectados por rotavirus bovino (cepa IND BRV G6P5) diluidos en 40 ml de PBS.

Se recogieron muestras fecales de la bandeja colectora una vez al día tras mezclar uniformemente para asegurar la obtención de una muestra representativa.

Se separaron los oocistos de las heces bovinas mediante centrifugación en sacarosa y recuento utilizando una cámara de recuento de células (hemocitómetro) bajo un microscopio. Para medir la dispersión de los rotavirus, las heces se diluyeron en tampón y se cuantificó el antígeno de rotavirus utilizando un kit ELISA de Le Centre d'Economie Rurale (CER), 1 rue du Carmel, B6900 Marloie, Bélgica.

Se observaron los bovinos para signos clínicos previamente al reto y después dos veces al día durante 10 días después del reto. Entre las observaciones se incluyeron la temperatura rectal, la condición general, la presencia de anorexia, diarrea, deshidratación y el número de muertes.

Se clasificó la depresión, la diarrea y la deshidratación de la manera siguiente:

Condición general

Buena	El bovino se encuentra bien, alerta y reactivo
Apática	El bovino se encuentra quieto, alerta y reactivo
Depresión	El bovino se encuentra tendido lateralmente, reticente a incorporarse y poco reactivo
Postración	El bovino se encuentra encogido o postrado y no es reactivo

Deshidratación

Nula	No hay deshidratación
Moderada	Arrugas persistentes en la piel, boca seca y ojos hundidos
Choque	Estado de choque

Diarrea

Nula	Heces normales
Ligera	Heces pastosas o mucosas
Líquida	Heces líquidas

La anorexia se determinó basándose en si el bovino bebe menos de 2 litros de leche. Durante las primeras 48 horas de vida, los bovinos pueden ser alimentados mediante un tubo esofágico. La puntuación se deriva para cada bovino cada día basándose en la presencia (puntuación: 1) o ausencia (puntuación: 0) de signos clínicos en cada categoría de enfermedad.

La temperatura rectal se midió en grados Fahrenheit.

Dos bovinos murieron en el Grupo C los días 7 y 8, dos en el Grupo B el día 7, ninguno en el Grupo D y uno en el Grupo A el día 3. Se muestran los resultados en las figuras 7 a 13.

Se observó un efecto sinérgico sobre los signos clínicos y la excreción de microorganismos en las heces al administrar ambos microorganismos en comparación con las administraciones separadas.

Referencias

Tzipori S. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med*, 290:103-206. 1985.

Angus K W. Cryptosporidiosis in Ruminants. In: Cryptosporidiosis of man and animals (Edited by Dubey J P, Speer C A & Fayer R), pp 83-103. CRC Press, Boston. 1990.

De la Fuente R; Luzón M; Ruiz-Santa-Quiteria JA; García A; Cid D; Orden JA; García S; Sanz R; Gómez-Bautista M. Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet Parasitol*, 80(3):179-85. 1999.

Moon HW; McClurkin AW; Isaacson RE; Pohlenz J; Skartvedt SM; Gillette KG; Baetz AL. Pathogenic relationships of rotavirus, *Escherichia coli*, and other agents in mixed infections in calves. *J Am Vet Med Assoc*, 173(5 Pt 2): 577-83 1978 Sep 1.

Viring S; Olsson SO; Aleni'us S; Emanuelsson U; Jacobsson SO; Larsson B; Linde N; Uggla A. Studies of enteric pathogens and gamma-globulin levels of neonatal calves in Sweden. *Acta Vet Scand*, 34(3):271-9 1993.

Perryman LE, Kapil SJ, Jones ML, Hunt EL, "Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein" *Vaccine* 17(17):2142-9 (1999, April 23).

Wakelin, D. "Immune response to intestinal parasites: protection, pathology and prophylaxis" *Parassitologia* 39 (4): 269-74 (1997, December).

Iochmann, S. et al., "Comparison of the humoral and cellular immune responses to two preparations of *Cryptosporidium parvum* CP15/60 recombinant protein" *Microb. Pathog.* 26(6):307-15 (1999 June).

Sagodira, S. et al., "Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA" *Vaccine* 17(19):2346-55 (1999, May 14).

Enriquez FJ et al., "Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection" *Infect Immun* 66(9):4469-73 (1998 September).

Harp JA et al., "Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves" *J. Dairy Sci* 81(1):289-94 (1998 January).

Sreter T. et al., "Attempts to immunize chickens against *Cryptosporidium baileyi* with *C. parvum* oocysts and Paracoxvaccine" *Folia Parasitol (Praha)* 44(1):77-80 (1997).

Harp JA et al., "Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd" *Am J Vet Res* 57(11):1586-8 (1996 November).

- Jenkins M. *et al.*, "Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen" *Vaccine* 13(17):1658-64 (1995 December).
- 5 Tatalick LM *et al.*, "Attempts to protect severe combined immunodeficient (scid) mice with antibody enriched for reactivity to *Cryptosporidium parvum* surface antigen-1." *Vet Parasitol* 58(4):281-90 (1995 July).
- Harp JA *et al.*, "Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*" *J Parasitol* 81(1):54-7 (1995 February).
- 10 Dellert SF *et al.*, "Diarrheal disease. Established pathogens, new pathogens, and progress in vaccine development" *Gastroenterol Clin North Am* 23(4):637-54 (1994 December).
- Bellinzoni RC *et al.*, "Efficacy of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus vaccine in the control of calf diarrhoea in beef herds in Argentina" *Vaccine* 7(3):263-8 (1989 June).
- 15 Harp JA *et al.*, "Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd" *Am J Vet Res* 57(11):1586-8 (1996 November).
- 20 Harp JA *et al.*, "Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure" 58(7): 2237-40 (1990 July).
- Fayer R. *et al.*, "Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves" *J Parasitol* 75(3):393-7 (1989 June).
- 25 Mosier DA *et al.*, "Bovine humoral immune response to *Cryptosporidium parvum*" *J. Clinical Microbiol* 30 (12):3277-9 (1992 December).
- Sagodira S. *et al.*, "Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA" 17(19):2346-55 (1999 May 14).
- 30 Finch GR *et al.*, "Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice" *Appl Environ Microbiol* 59(11):3661-5 (1993 November).
- Jenkins MC *et al.*, "Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice" *Vaccine* 17(19):2453-60 (1999 May).
- 35 Avila FA *et al.*, "A comparative study of the efficiency of a pro-biotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil" *Rev Elev Med Vet pays Trop* 48(3):239-43 (1995).
- 40 Castrucci G., "Field trial evaluation of an inactivated rotavirus vaccine against neonatal diarrhea of calves" *Eur J Epidemiol* 3(1):5-9 (1987 March).
- Perryman LE *et al.*, "Immunotherapy of cryptosporidiosis in immunodeficient animal models" *J. Protozool* 38 (6):98S-100S (1991 Nov-Dec).
- 45 Yano T. *et al.*, "Determination of the efficiency of K99-F41 fimbrial antigen vaccine in newborn calves" *Braz J. Med. Biol. Res.* 28(6):651-4 (1995 June).
- 50 Kadel WL *et al.*, "Field-trial evaluation of a Pasteurella vaccine in preconditioned and nonpreconditioned light-weight calves" *Am. J. Vet. Res.* 46(9): 1944-8 (1985 September).
- Kharalambivev KhE *et al.*, "Attenuated vaccine against rota- and coronavirus enteritis in calves" *Vet. Med. Nauki* 23(10):26-31 (1986).
- 55 Thurber ET *et al.*, "Field trial evaluation of a reo-coronavirus calf diarrhea vaccine" *Can J. Comp Med* 41(2):131-6 (1977 April).
- Jeff B. Wilson *et al.*, "A Case-control Study of Selected Pathogens Including Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Calf Diarrhea on an Ontario Veal Farm" *Can J. Res* 56:184-188 (1992).
- 60 J. De Rycke *et al.*, "Prevalence of Various Enteropathogens in the Feces Of Diarrheic And healthy Calves" *Ann. Rech. Vet.* 17(2): 159-168 (1986).
- 65 D.J. Reynolds, *et al.*, "Microbiology of Calf diarrhoea in Southern Britain" *Veterinary Record* 119: 34-39 (1986).
- Jorge W. Lopez *et al.*, "Rotavirus and *Cryptosporidium* Shedding in Dairy Calf Feces and Its Relationship to Colostrum Immune Transfer" *J. Dairy Science* 71:1288-1294 (1988).

H.W. **Moon**, DVM, PhD. *et al.*, "Pathogenic Relationships of Rotavirus, *Escherichia coli*, and Other Agents in Mixed Infections in Calves" *JAVMA* (September 1, 1978).

S. **Virigng** *et al.*, "Studies of Enteric Pathogens and -Globulin Levels of Neonatal Calves in Sweden" *Acta Vet. Scand.* Vol. 34:271-279 (1993).

R. de la **Fuente** *et al.*, "Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-dayold diarrheic dairy calves in central Spain" *Veterinary Parasitology* 80:179-185 (1999).

F. **Bürki** *et al.*, "Reduction of Rotavirus-, Coronavirus- and *E. coli*-Associated Calf-Diarrheas in a Large-Size Dairy Herd" *J. Vet. Med. B.* 33, 241-252 (1986).

R. de la **Fuente** *et al.*, "Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain" *Preventive Veterinary Medicine* 36:145-152 (1998).

Saul **Tzipori**, "The Relative Imporatance of Enteric Pathogens Affecting Neonates of Domestic Animals" *Advances Veterinary Science and Comparative Medicine*, Vol. 29.

Kenneth W. **Angus**, "Cryptosporidiosis In Ruminants" *Cryptosporidiosis of Man and Animals*, Vol. 5.

Robert E. **Holland**, "Some Infectious Causes of Diarrhea in Young Farm Animals" *Clinical Microbiology Reviews*, p. 345-375 (1990 October).

Perryman *et al.*, "Neutralization-Sensitive Epitopes of *Cryptosporidium parvum*" PCT WO 98/07320.

Jenkins *et al.*, "DNA Sequence Encoding Surface Protein Of *Cryptosporidium Parvum*" U.S. Patent Number 5,591,434.

Referencias citadas en la descripción

La presente lista de referencias citadas por el solicitante se proporcionan únicamente para mayor conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque las referencias se han compilado cuidadosamente, no puede excluirse que se hayan producido errores u omisiones y la EPO se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5843456 A, Paoletti [0012] [0062]
- US 5591434 A [0046] [0046] [0046] [0089] [0101] [0163]
- WO 9807320 A [0046] [0046] [0089] [0099] [0163]
- US 4603112 A [0056]
- US 4769330 A [0056]
- US 5174993 A [0056]
- US 5505941 A [0056]
- US 5338683 A [0056]
- US 5494807 A [0056]
- US 4722848 A [0056]
- US 5942235 A [0056]
- WO 9416716 A [0056]
- WO 9639491 A [0056]
- US 4745051 A, Smith [0056]
- EP 0370573 A [0056]

ES 2 301 498 T3

- EP 265785 A [0056]
- US 4769331 A [0056]
- 5 • US 5591439 A [0056]
- US 5552143 A [0056]
- US 6156567 A [0056] [0083]
- 10 • US 6090393 A [0056] [0083]
- WO 9111525 A [0056]
- 15 • US 5591639 A [0056]
- US 5589466 A [0056]
- US 5580859 A [0056]
- 20 • WO 9833510 A [0056]
- US 4945050 A, Sanford [0056]
- 25 • WO 9001543 A, Fischbach [0056]
- US 4394448 A, Szoka [0056]
- US 5677178 A, McCormick [0056]
- 30 • US 5928913 A [0056]
- US 5990091 A, Tartaglia [0056] [0083]
- 35 • WO 9011082 A [0060]
- WO 9219183 A [0060]
- WO 9621797 A [0060]
- 40 • WO 9520660 A [0060]
- US 5334379 A [0066]
- 45 • US 4999291 A [0066]
- US 5461663 A [0066]
- US 2909462 A [0067]
- 50 • EP 80412 A [0090]
- EP 60129 A [0090]
- 55 • GB 2094314 A [0090]
- US 4298597 A [0090]
- US 5804198 A [0090]
- 60 • US 4788056 A [0090] [0090]
- US 3975517 A [0090]
- 65 • US 4237115 A [0090]
- US 3907987 A [0090]

ES 2 301 498 T3

- US 4338298 A [0090]
- US 4443547 A [0090]
- 5 • US 4343792 A [0090]
- US 4311797 A [0090]
- US 3914408 A [0090] [0090]
- 10 • US 5620896 A [0090]
- WO 9840097 A [0090]
- 15 • WO 9641874 A [0090]
- US 3919413 A [0090]
- WO 9422476 A [0090]
- 20 • EP 734731 A [0090]
- WO 9827964 A [0090]
- 25 • GB 2050830 A [0090]
- GB 1128325 A [0090]
- US 5178860 A [0090]
- 30 • US 4981684 A [0090]
- US 4292307 A [0090]
- 35 • US 9714834 W [0099]
- EP 0013387 W [0164]
- US 171399 A [0164]

Literatura no de patentes citada en la descripción

- **RADOSTITS**, OM *et al.* Herd Health Food Animal Production Medicine. *Sounders*, 1994, 184-213 [0008]
- 45 • **MOON**, HW *et al.* *JAVMA*, 1978, vol. 173 (5), 577-583 [0008]
- **VIRING**, S. *et al.* *Acta Vet. Scand.*, 1999, vol. 34, 271-279 [0008]
- DE LA FUENTE *et al.* *Preventive Veterinary Medicine*, 1998, vol. 36, 145-152 [0009]
- 50 • **MARK C. JENKINS** *et al.* *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 06 November 1999, vol. 6, 912-920 [0022]
- **PERRYMAN** *et al.* *Molec Biochem Parasitol*, 1996, vol. 80, 137-147 [0046]
- 55 • L. E. **PERRYMAN** *et al.* *Vaccine*, 1999, vol. 17, 2142-2149 [0046]
- **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. *CSH Press*, 1989 [0050]
- 60 • Nucleic Acid Hybridisation, A Practical Approach. *IRL Press*, 1985 [0050]
- **WILBUR; LIPMAN**. *PNAS*, 1983, vol. 80, 726 [0053]
- **ALTSCHUL** *et al.* *NucL Acids Res.*, vol. 25, 3389-3402 [0054]
- 65 • **NEEDLEMAN SB; WUNSCH CD**. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 444-453 [0054]

ES 2 301 498 T3

- **SMITH TF; WATERMAN MS.** Comparison of Bio-sequences. *Advances in Applied Mathematics*, 1981, vol. 2, 482-489 [0054]
- **SMITH TF; WATERMAN MS; SADLER JR.** Statistical characterization of nucleic acid sequence functional domains. *Nucleic Acids Res.*, 1983, vol. 11, 2205-2220 [0054]
- **FENG DF; DOLITTLE RF.** Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. of Molec. Evol.*, 1987, vol. 25, 351-360 [0054]
- **HIGGINS DG; SHARP PM.** Fast and sensitive multiple sequence alignment on a microcomputer. *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0054]
- **THOMPSON JD; HIGGINS DG; GIBSON TJ.** ClusterW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.*, 1994, vol. 22, 4673-480 [0054]
- **DEVEREUX J; HAEBERLIE P; SMITHIES O.** A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 387-395 [0054]
- **PAOLETTI.** Applications of pox virus vectors to vaccination: An update. *PNAS*, October 1996, vol. 93, 11349-11353 [0056]
- **MOSS.** Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *PNAS*, October 1996, vol. 93, 11341-11348 [0056]
- **Baculovirus Expression Protocols.** *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc, 1995, vol. 39 [0056]
- **SMITH et al.** Production of Huma Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Molecular and Cellular Biology*, December 1983, vol. 3 (12), 2156-2165 [0056]
- **PENNOCK et al.** Strong and Regulated Expression of *Escherichia coli* B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector. *Molecular and Cellular Biology*, March 1984, vol. 4 (3), 399-406 [0056]
- **ROIZMAN.** The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors. *PNAS*, October 1996, vol. 93, 11307-11312 [0056]
- **ANDREANSKY et al.** The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors. *PNAS*, October 1996, vol. 93, 11313-11318 [0056]
- **ROBERTSON et al.** Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes. *PNAS*, October 1996, vol. 93, 11334-11340 [0056]
- **FROLOV et al.** Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications. *PNAS*, October 1996, vol. 93, 11371-11377 [0056]
- **KITSON et al.** *J. Virol.*, 1991, vol. 65, 3068-3075 [0056]
- **GRUNHAUS et al.** Adenovirus as cloning vectors. *Seminars in Virology*, 1992, vol. 3, 237-52 [0056]
- **BALLAY et al.** *EMBO Journal*, vol. 4, 3861-65 [0056]
- **GRAHAM.** Tibtech, April 1990, vol. 8, 85-87 [0056]
- **PREVEC et al.** *J. Gen Virol.*, vol. 70, 429-434 [0056]
- **FELGNER et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 2550-2561 [0056]
- *Science*, 1993, vol. 259, 1745-49 [0056]
- **MCCLEMENTS et al.** Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *PNAS*, October 1996, vol. 93, 11414-11420 [0056]
- **JU et al.** *Diabetologia*, 1998, vol. 41, 736-739 [0056]
- **ROBINSON et al.** *IMMUNOLOGY*, 1997, vol. 9, 271-283 [0056]
- **REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE.** 1985 [0065]

- **ELDRIDGE** *et al.* *MoL Immunol.*, 1993, vol. 28, 287-294 [0066]
- **HUNTER** *et al.* The Theory and Practical Application of Adjuvants. *John Wiley and Sons*, 1995, 51-94 [0066]
- 5 • **TODD** *et al.* *Vaccine*, 1997, vol. 15, 564-570 [0066]
- **CLARK** *et al.* *Science*, 1987, vol. 230, 1229 [0066]
- **GRANT** *et al.* *Drugs*, 1992, vol. 53, 516 [0066]
- 10 • **C. R. MALISZEWSKI** *et al.* *Molec Immunol*, 1988, vol. 25 (9), 843-50 [0066]
- **S.R. LEONG**. *Vet Immunol and Immunopath*, 1989, vol. 21, 261-78 [0066]
- 15 • *Phameuropa*, June 1996, vol. 8 (2 [0067]
- **J. FIELDS** *et al.* *Nature*, 04 June 1960, vol. 186, 778-780 [0067]
- Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach. *Plenum Press*, 1995 [0073]
- 20 • **P.S. PAUL**; **Y.S. LYOO**. *Vet Microb*, 1993, vol. 37, 299-317 [0090]
- **D. CALMELS**; **PH. DESMETTRE**. IV Symposium of the Commission for the study of animal diseases caused by anaerobes, 16 November 1982 [0090]
- 25 • **SAMBROOK J.** *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0096] [0139]
- **SAGODIRA S** *et al.* *Vaccine*, 1999, vol. 17, 2346-2355 [0097]
- 30 • **IOCHMANN S.** *et al.* *Microbial Pathogenesis*, 1999, vol. 26, 307-315 [0097]
- **K. JOHNSON**; **D. SMITH**. *Gene*, 1988, vol. 67, 31-40 [0132]
- 35 • GST gene fusion system: technical manual. 1997 [0132]
- **TZIPORI S.** The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med*, 1985, vol. 290, 103-206 [0163]
- 40 • Cryptosporidiosis in Ruminants. **ANGUS K W.** Cryptosporidiosis of man and animals. *CRC Press*, 1990, 83-103 [0163]
- **DE LA FUENTE R**; **LUZÓN M**; **RUIZ-SANTA-QUITERIA JA**; **GARCÍA A**; **CID D**; **ORDEN JA**; **GARCÍA S**; **SANZ R**; **GÓMEZ-BAUTISTA M.** Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet Parasitol*, 1999, vol. 80 (3), 179-85 [0163]
- 45 • **MOON HW**; **MCCLURKIN AW**; **ISAACSON RE**; **POHLENZ J**; **SKARTVEDT SM**; **GILLETTE KG**; **BAETZ AL.** Pathogenic relationships of rotavirus, *Escherichia coli*, and other agents in mixed infections in calves. *J Am Vet Med Assoc*, 01 September 1978, vol. 173, 577-83 [0163]
- 50 • **VIRING S**; **OLSSON SO**; **ALENIUS S**; **EMANUELSSON U**; **JACOBSSON SO**; **LARSSON B**; **LINDE N**; **UGGLA A.** Studies of enteric pathogens and gamma-globulin levels of neonatal calves in Sweden. *Acta Vet Scand*, 1993, vol. 34 (3), 271-9 [0163]
- 55 • **PERRYMAN LE**; **KAPIL SJ**; **JONES ML**; **HUNT EL.** Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine*, 23 April 1999, vol. 17 (17), 2142-9 [0163]
- 60 • **WAKELIN, D.** Immune response to intestinal parasites: protection, pathology and prophylaxis. *Parassitologia*, December 1997, vol. 39 (4), 269-74 [0163]
- **IOCHMANN, S.** *et al.* Comparison of the humoral and cellular immune responses to two preparations of *Cryptosporidium parvum* CP15/60 recombinant protein. *Microb. Pathog.*, June 1999, vol. 26 (6), 307-15 [0163]
- 65 • **SAGODIRA, S.** *et al.* Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine*, 14 May 1999, vol. 17 (19), 2346-55 [0163]

- **ENRIQUEZ FJ** *et al.* Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, September 1998, vol. 66 (9), 4469-73 [0163]
- **HARP JA** *et al.* Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *J. Dairy Sci*, January 1998, vol. 81 (1), 289-94 [0163]
- **SRETER T.** *et al.* Attempts to immunize chickens against *Cryptosporidium baileyi* with *C. parvum* oocysts and *Paracox vaccine*. *Folia Parasitol* (Praha, 1997, vol. 44 (1), 77-80 [0163]
- **HARP JA** *et al.* Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd. *Am J Vet Res*, November 1996, vol. 57 (11), 1586-8 [0163]
- **JENKINS M.** *et al.* Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen. *Vaccine*, December 1995, vol. 13 (17), 1658-64 [0163]
- **TATALICK LM** *et al.* Attempts to protect severe combined immunodeficient (scid) mice with antibody enriched for reactivity to *Cryptosporidium parvum* surface antigen-1. *Vet Parasitol*, July 1995, vol. 58 (4), 281-90 [0163]
- **HARP JA** *et al.* Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol*, February 1995, vol. 81 (1), 54-7 [0163]
- **DELLERT SF** *et al.* Diarrheal disease. Established pathogens, new pathogens, and progress in vaccine development. *Gastroenterol Clin North Am*, December 1994, vol. 23 (4), 637-54 [0163]
- **BELLINZONI RC** *et al.* Efficacy of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus vaccine in the control of calf diarrhoea in beef herds in Argentina. *Vaccine*, June 1989, vol. 7 (3), 263-8 [0163]
- **HARP JA** *et al.* Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd. *Am J Vet Res*, November 1996, vol. 57 (11), 1586-8 [0163]
- **HARP JA** *et al.* Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure, July 1990, vol. 58 (7), 2237-40 [0163]
- **FAYER R.** *et al.* Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *J Parasitol*, vol. 75 (3), 393-7 [0163]
- **MOSIER DA** *et al.* Bovine humoral immune response to *Cryptosporidium parvum*. *J. Clinical Microbiol*, December 1992, vol. 30 (12), 3277-9 [0163]
- **SAGODIRA S.** *et al.* Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA, 14 May 1999, vol. 17 (19), 2346-55 [0163]
- **FINCH GR** *et al.* Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice. *Appl Environ Microbiol*, November 1993, vol. 59 (11), 3661-5 [0163]
- **JENKINS MC** *et al.* Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine*, May 1999, vol. 17 (19), 2453-60 [0163]
- **AVILA FA** *et al.* A comparative study of the efficiency of a pro-biotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil. *Rev Elev Med Vet pays Trop*, 1995, vol. 48 (3), 239-43 [0163]
- **CASTRUCCI G.** Field trial evaluation of an inactivated rotavirus vaccine against neonatal diarrhea of calves. *Eur J Epidemiol*, March 1987, vol. 3 (1), 5-9 [0163]
- **PERRYMAN LE.** Immunotherapy of cryptosporidiosis in immunodeficient animal models. *J. Protozool*, November 1991, vol. 38 (6), 98S-100S [0163]
- **YANO T.** *et al.* Determination of the efficiency of K99-F41 fimbrial antigen vaccine in newborn calves. *Braz J. Med. Biol. Res.*, June 1995, vol. 28 (6), 651-4 [0163]
- **KADEL WL** *et al.* Field-trial evaluation of a Pasteurella vaccine in preconditioned and nonpreconditioned light-weight calves. *Am. J. Vet. Res.*, September 1985, vol. 46 (9), 1944-8 [0163]
- **KHARALAMBIV E** *et al.* Attenuated vaccine against rota- and coronavirus enteritis in calves. *Vet. Med. Nauki*, 1986, vol. 23 (10), 26-31 [0163]

• **THURBER ET.** Field trial evaluation of a reo-coronavirus calf diarrhea vaccine. *Can J. Comp Med*, April 1977, vol. 41 (2), 131-6 [0163]

• **JEFF B. WILSON et al.** A Case-control Study of Selected Pathogens Including Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Calf Diarrhea on an Ontario Veal Farm. *Can J. Res*, 1992, vol. 56, 184-188 [0163]

• **J. DE RYCKE et al.** Prevalence of Various Enteropathogens in the Feces Of Diarrheic And healthy Calves. *Ann. Rech. Vet.*, 1986, vol. 17 (2), 159-168 [0163]

• **D.J. REYNOLDS et al.** Microbiology of Calf diarrhoea in Southern Britain. *Veterinary Record*, 1986, vol. 119, 34-39 [0163]

• **JORGE W. LOPEZ et al.** Rotavirus and Cryptosporidium Shedding in Dairy Calf Feces and Its Relationship to Colostrum Immune Transfer. *J. Dairy Science*, 1988, vol. 71, 1288-1294 [0163]

• **H.W. MOON; DVM, PHD. et al.** Pathogenic Relationships of Rotavirus, *Escherichia coli*, and Other Agents in Mixed Infections in Calves. *JAVMA*, 01 September 1978 [0163]

• **S. VIRIGNG et al.** Studies of Enteric Pathogens and -Globulin Levels of Neonatal Calves in Sweden. *Acta Vet. Scand.*, 1993, vol. 34, 271-279 [0163]

• **R. DE LA FUENTA et al.** Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, 1999, vol. 80, 179-185 [0163]

• **F. BÜRKI et al.** Reduction of Rotavirus-, Coronavirus- and *E. coli*-Associated Calf-Diarrheas in a Large-Size Dairy Herd. *J. Vet. Med. B.*, 1986, vol. 33, 241-252 [0163]

• **R. DE LA FUENTE et al.** Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 1998, vol. 36, 145-152 [0163]

• **SAUL TZIPORI.** The Relative Importance of Enteric Pathogens Affecting Neonates of Domestic Animals. *Advances Veterinary Science and Comparative Medicine*, vol. 29 [0163]

• **KENNETH W. ANGUS.** Cryptosporidiosis In Ruminants. *Cryptosporidiosis of Man and Animals*, vol. 5 [0163]

• **ROBERT E. HOLLAND.** Some Infectious Causes of Diarrhea in Young Farm Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, October 1990, 345-375 [0163]

REIVINDICACIONES

1. Composición combinada entérica inmunológica o de vacuna, que comprende:

un primer antígeno o epítipo de interés procedente de *Cryptosporidium parvum* y/o un vector que expresa el primer antígeno o epítipo de interés, en el que dicho primer antígeno o epítipo de interés es uno o más antígenos de subunidad de *Cryptosporidium parvum* seleccionados de entre el grupo que consiste de P21, Cp23, Cp15/60, CP41 o mezclas de los mismos,

y un segundo antígeno o epítipo de interés procedente de otro patógeno entérico y/o el primer vector que expresa el primer antígeno o epítipo de interés también expresa el segundo antígeno o epítipo de interés y/o un segundo vector que expresa el segundo antígeno o epítipo de interés,

y un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en el que el antígeno del patógeno entérico se selecciona de entre el grupo que consiste de los antígenos de *E. coli*, de rotavirus, de coronavirus y las mezclas de los mismos.

2. Composición según la reivindicación 1 en la que el patógeno entérico comprende *E. coli*.

3. Composición según la reivindicación 2, en la que el antígeno de *E. coli* comprende un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta antígeno K99, *E. coli* inactivado que porta antígeno F41, *E. coli* inactivado que porta antígeno Y, *E. coli* inactivado que porta antígeno 31A, antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y, antígeno 31A y mezclas de los mismos.

4. Composición según la reivindicación 3 en la que el antígeno de *E. coli* comprende un antígeno K99 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno K99, antígeno K99 y mezclas de los mismos, y/o un antígeno F41 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno F41, antígeno F41 y mezclas de los mismos.

5. Composición según la reivindicación 3 en la que el antígeno de *E. coli* comprende un antígeno K99 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno K99, antígeno K99 y mezclas de los mismos, y un antígeno F41 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno F41, antígeno F41 y mezclas de los mismos, y un antígeno Y seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno Y, antígeno Y y mezclas de los mismos.

6. Composición según la reivindicación 1 en la que el patógeno entérico comprende coronavirus bovino.

7. Composición según la reivindicación 1 en la que el patógeno entérico comprende rotavirus bovino.

8. Composición según la reivindicación 1 en la que el patógeno entérico comprende *E. coli*, rotavirus bovino y coronavirus bovino.

9. Composición según la reivindicación 8, en la que el antígeno del patógeno entérico comprende uno o más antígenos de *E. coli* seleccionados de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta antígeno K99, *E. coli* inactivado que porta antígeno F41, *E. coli* inactivado que porta antígeno Y, *E. coli* inactivado que porta antígeno 31A, antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y, antígeno 31A y mezclas de los mismos; coronavirus bovino inactivado, o uno o más antígenos de *E. coli* seleccionados de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno K99, *E. coli* inactivado que porta antígeno F41, *E. coli* inactivado que porta antígeno Y, *E. coli* inactivado que porta antígeno 31A, antígeno K99, antígeno F41, antígeno Y, antígeno 31A y mezclas de los mismos; coronavirus bovino inactivado y rotavirus bovino inactivado.

10. Composición según la reivindicación 9, en la que dicho antígeno o antígenos de *E. coli* comprenden un antígeno K99 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno K99, antígeno K99 y mezclas de los mismos, y/o un antígeno F41 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno F41, antígeno F41 y mezclas de los mismos.

11. Composición según la reivindicación 9, en la que el antígeno de *E. coli* comprende un antígeno K99 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno K99, antígeno K99 y mezclas de los mismos, y un antígeno F41 seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno F41, antígeno F41 y mezclas de los mismos, y un antígeno Y seleccionado de entre el grupo que consiste de *E. coli* inactivado que porta el antígeno Y, antígeno Y y mezclas de los mismos.

12. Composición según la reivindicación 9, en la que dicha composición comprende los antígenos K99 y F41 de *E. coli*.

ES 2 301 498 T3

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho primer antígeno o epítipo de interés es Cp23 y Cp15/60.

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho primer antígeno o epítipo de interés es P21 y Cp15/60.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende un adyuvante.

16. Composición según la reivindicación 15, en la que el adyuvante comprende saponina o hidróxido de aluminio.

17. Composición según la reivindicación 15, en la que el adyuvante se encuentra en la forma de una emulsión de aceite-en-agua.

18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que dicha composición se utiliza composición bovina, canina, felina o equina combinada entérica inmunológica o de vacuna.

19. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento y/o control de infecciones por *Cryptosporidium parvum* y/o infecciones entéricas en animales.

20. Utilización según la reivindicación 19 en la que dicho animal es un animal bovino.

21. Procedimiento para preparar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende mezclar los antígenos o epítipos o vectores y un portador.

22. Kit para preparar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende los antígenos, epítipos o vectores, cada uno en uno o más recipientes separados, opcionalmente empaquetados juntos, y también opcionalmente, con instrucciones para la mezcla y/o la administración.

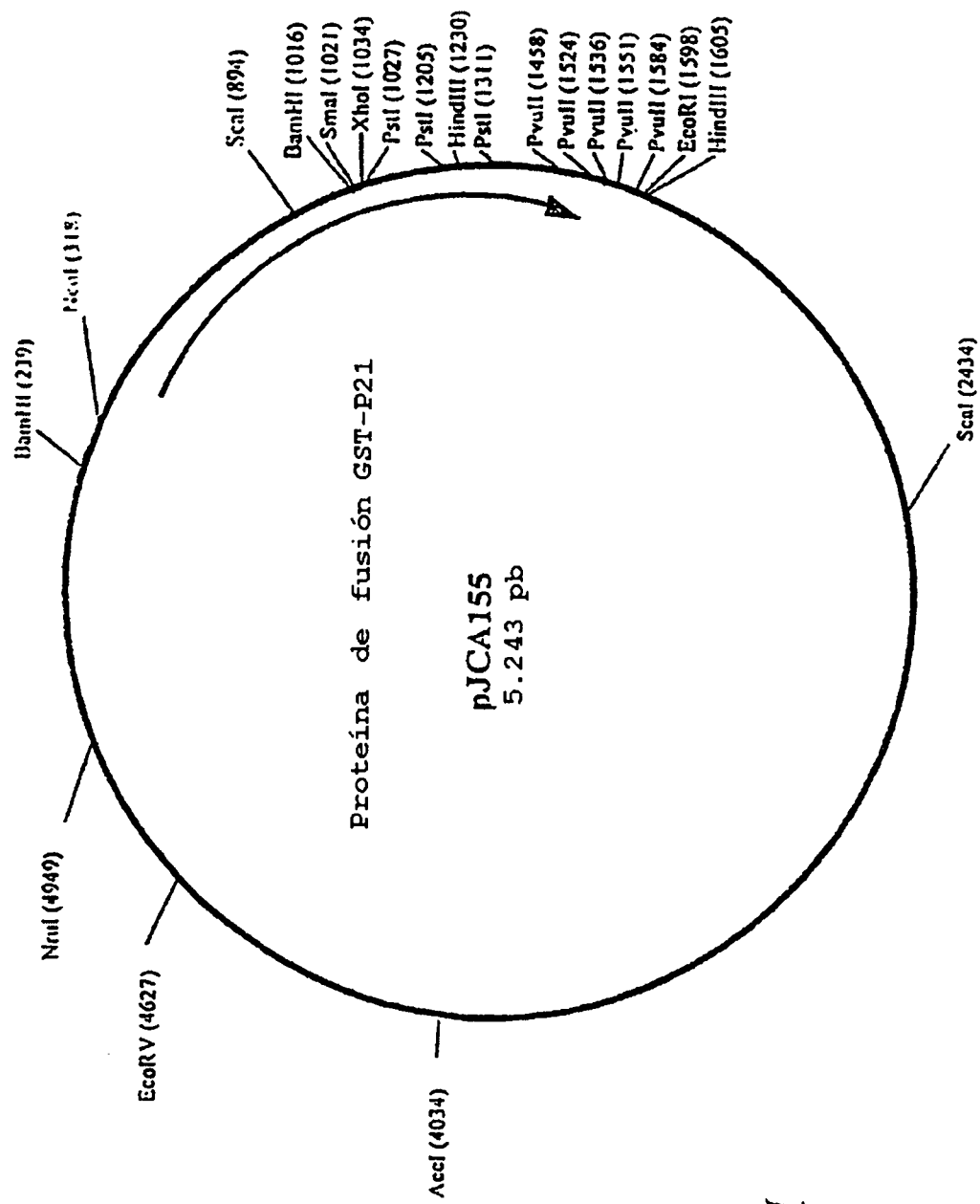


Fig. 1

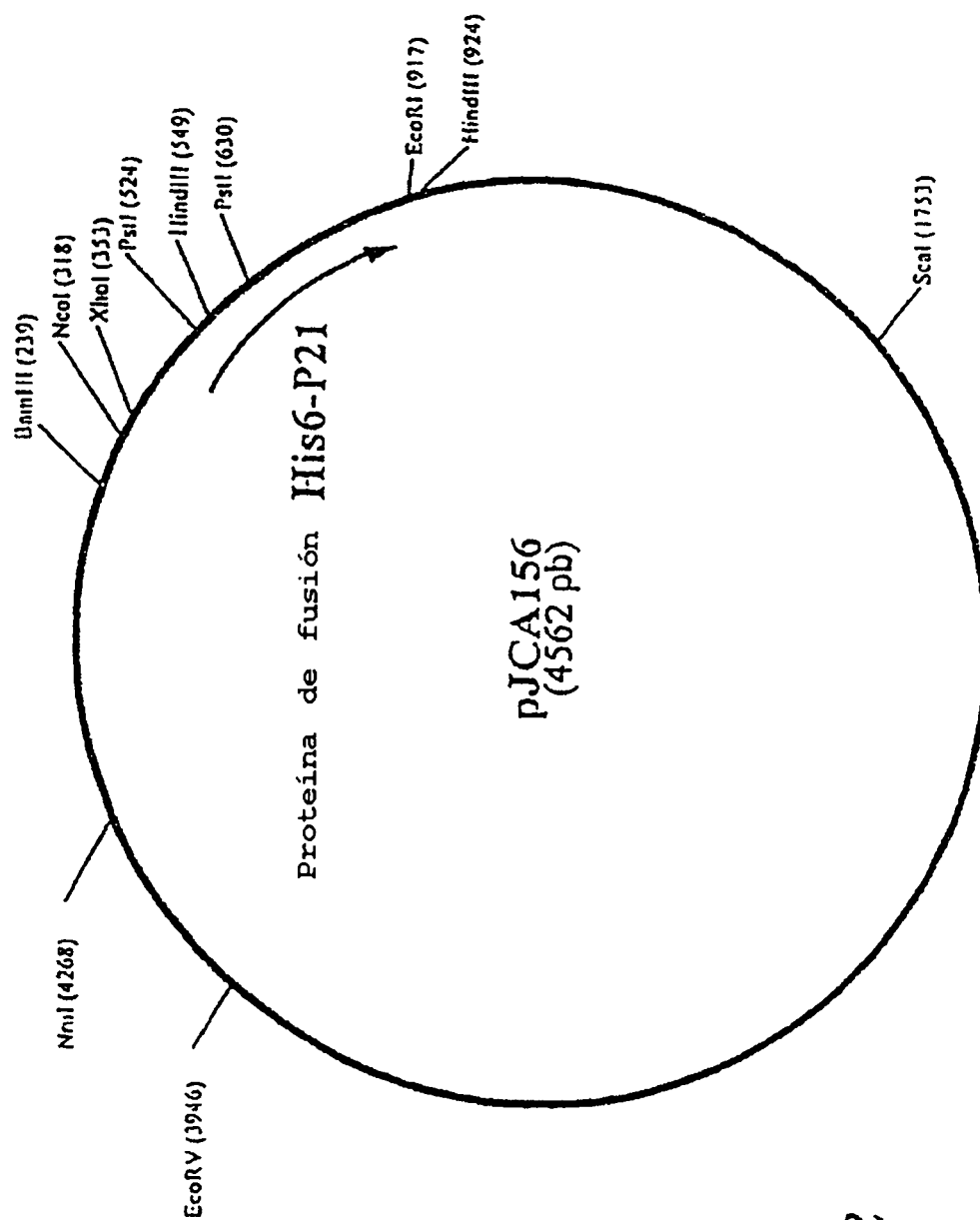


Fig.2

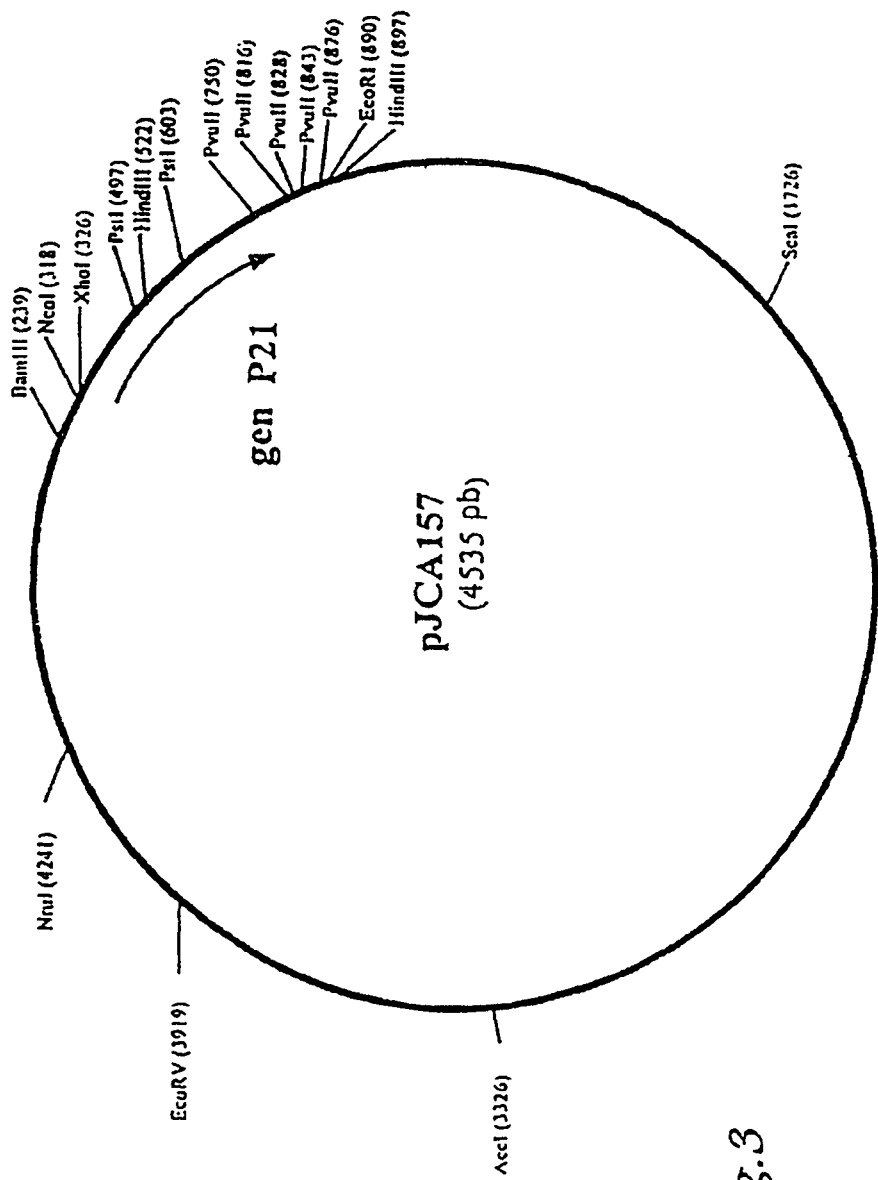


Fig.3

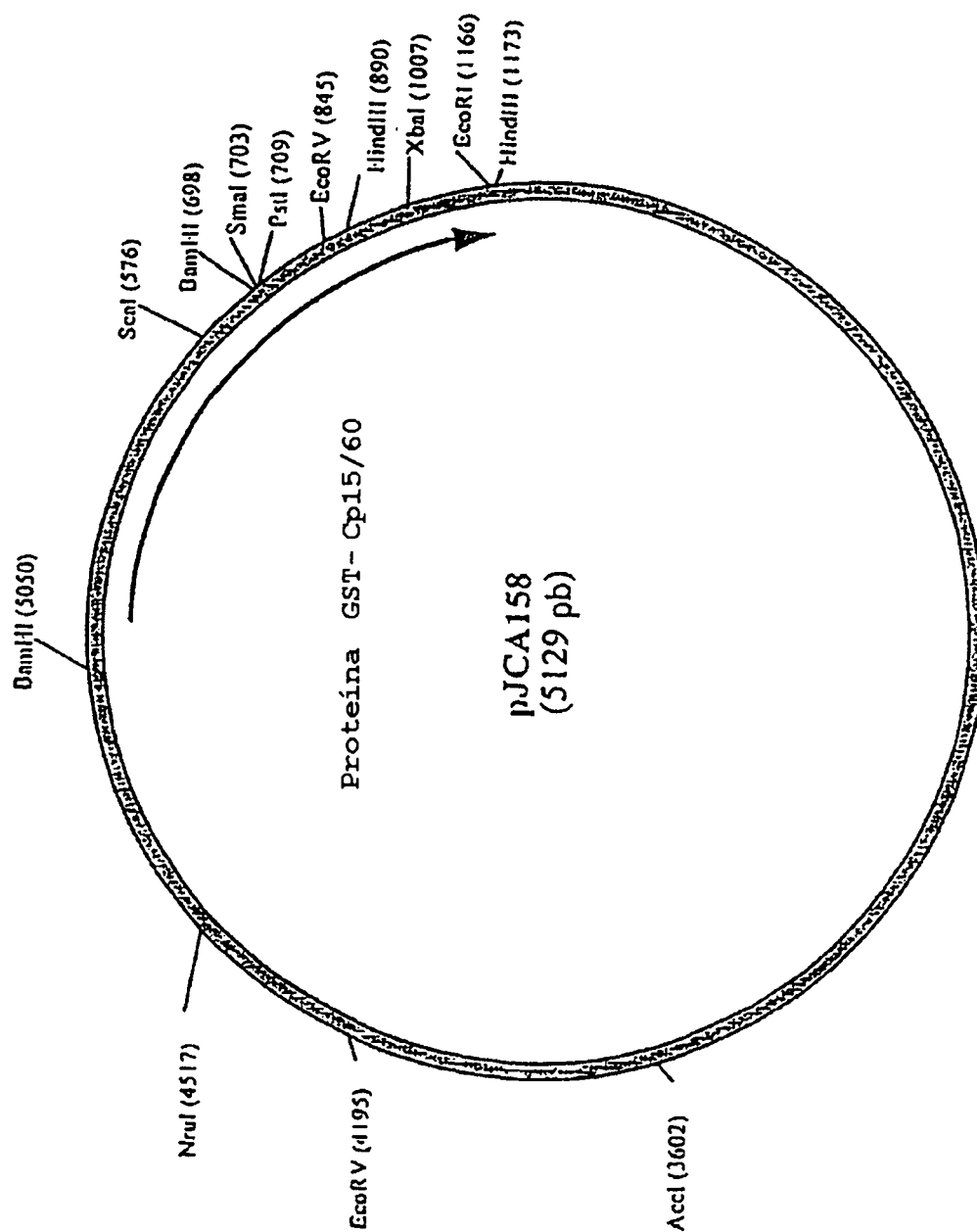


Fig.4

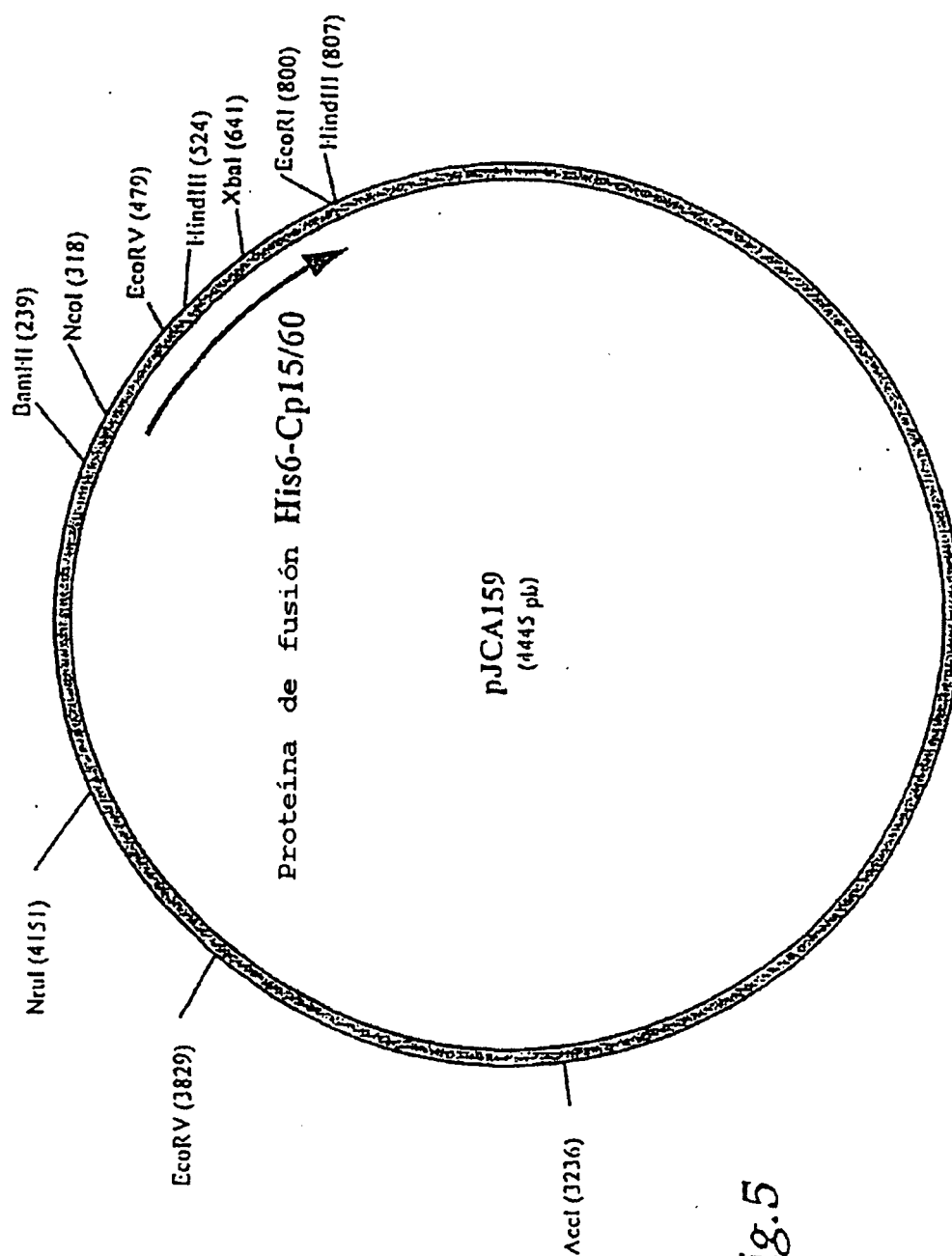


Fig.5

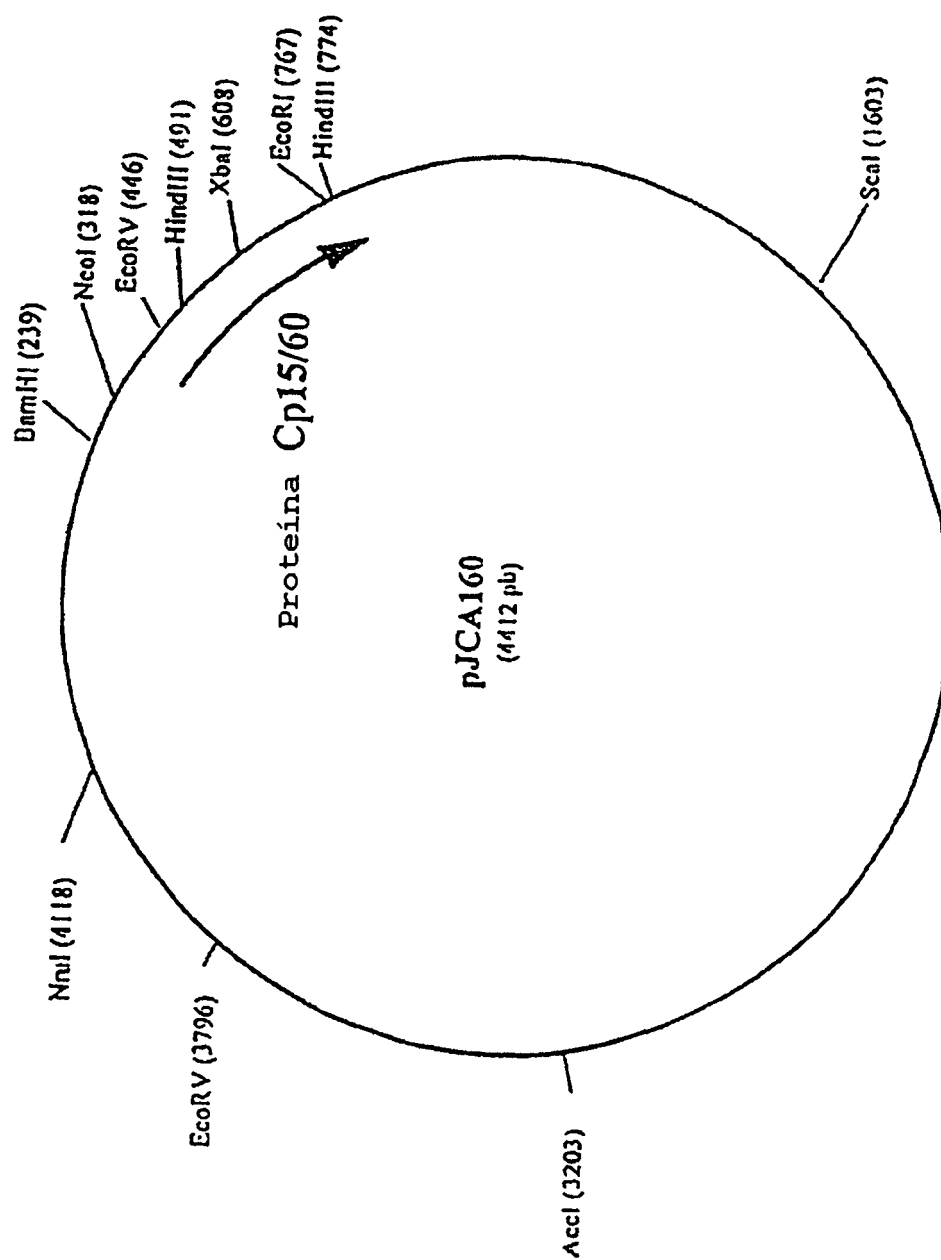


Fig.6

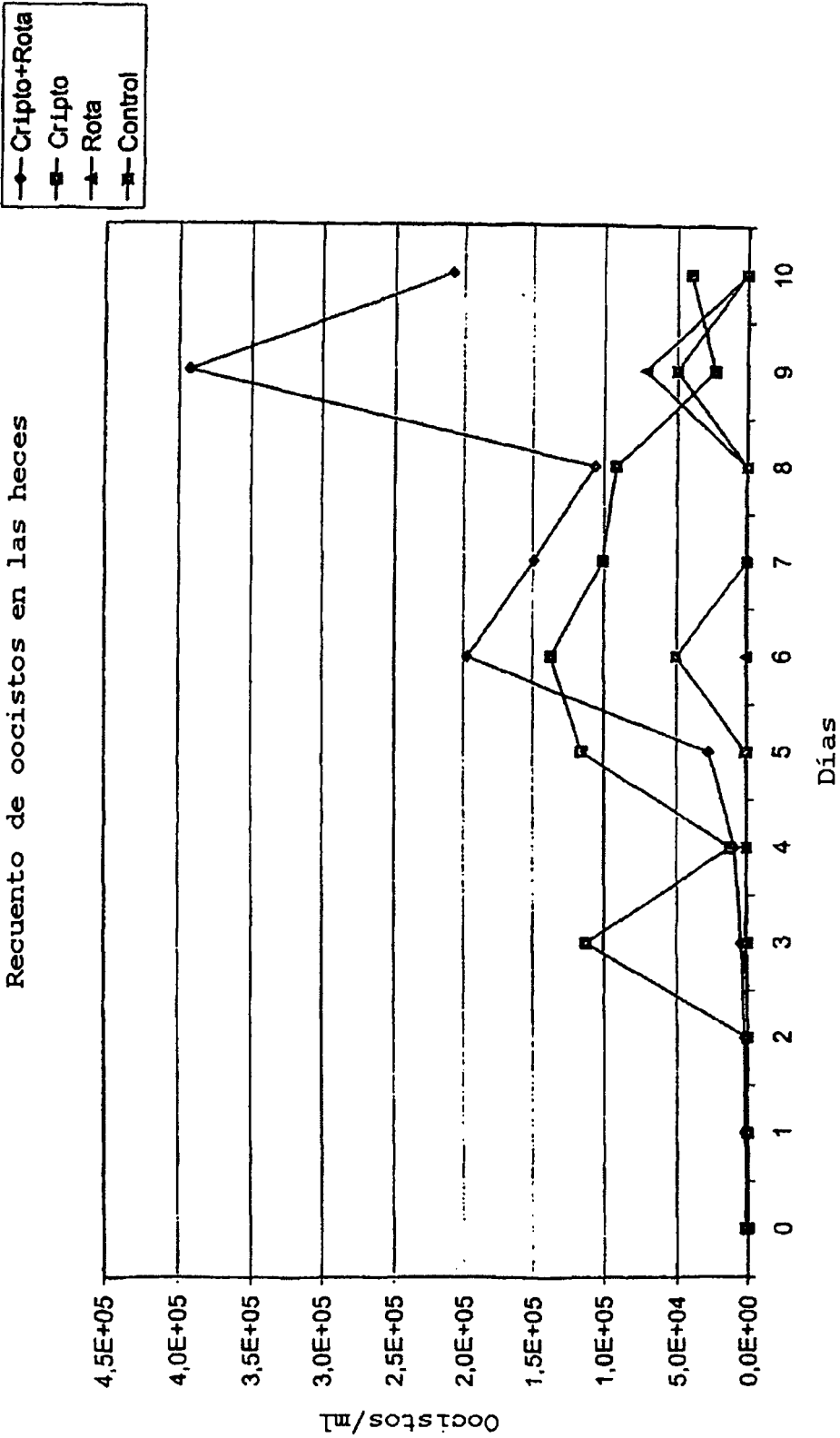


Fig. 7

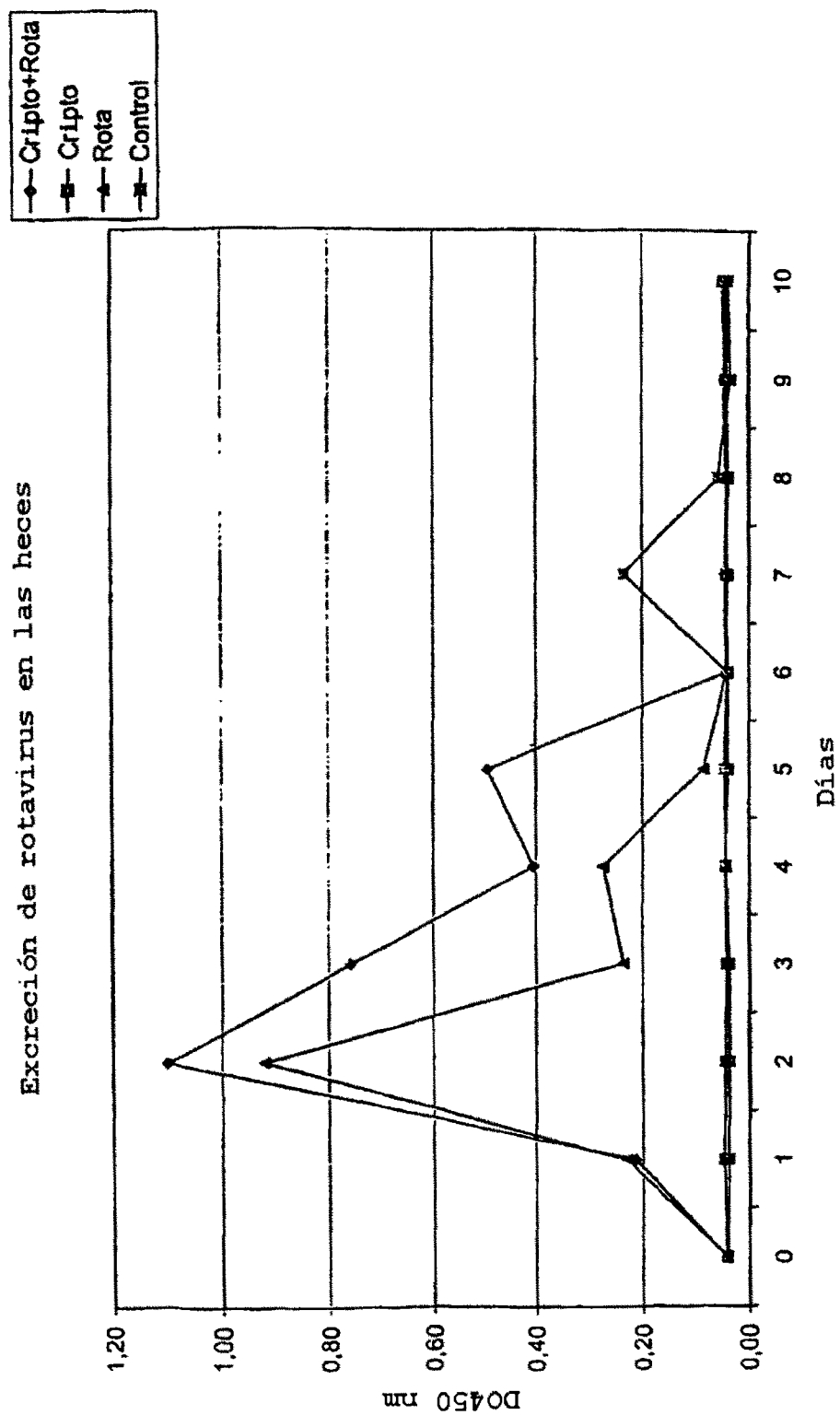


Fig.8

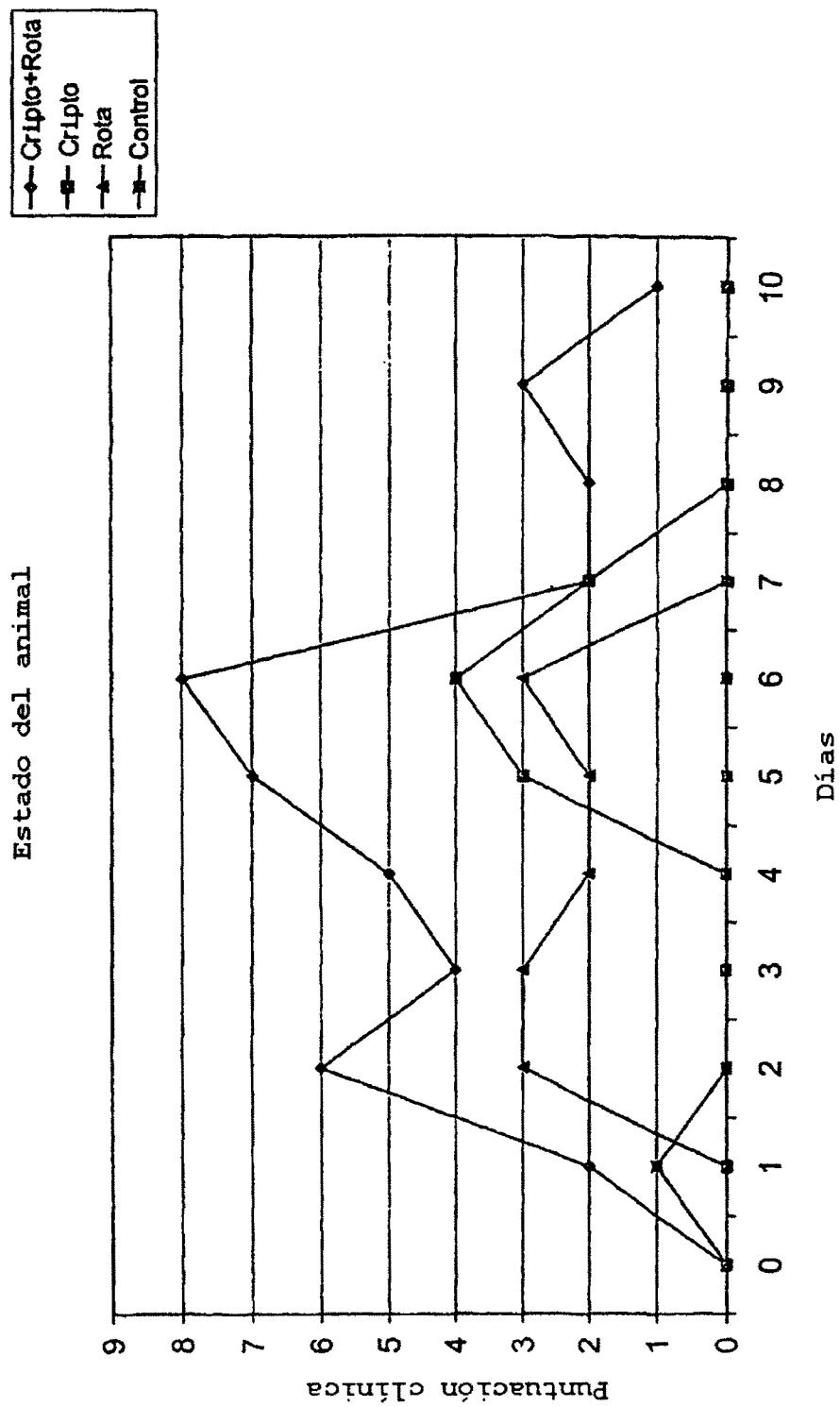


Fig.9

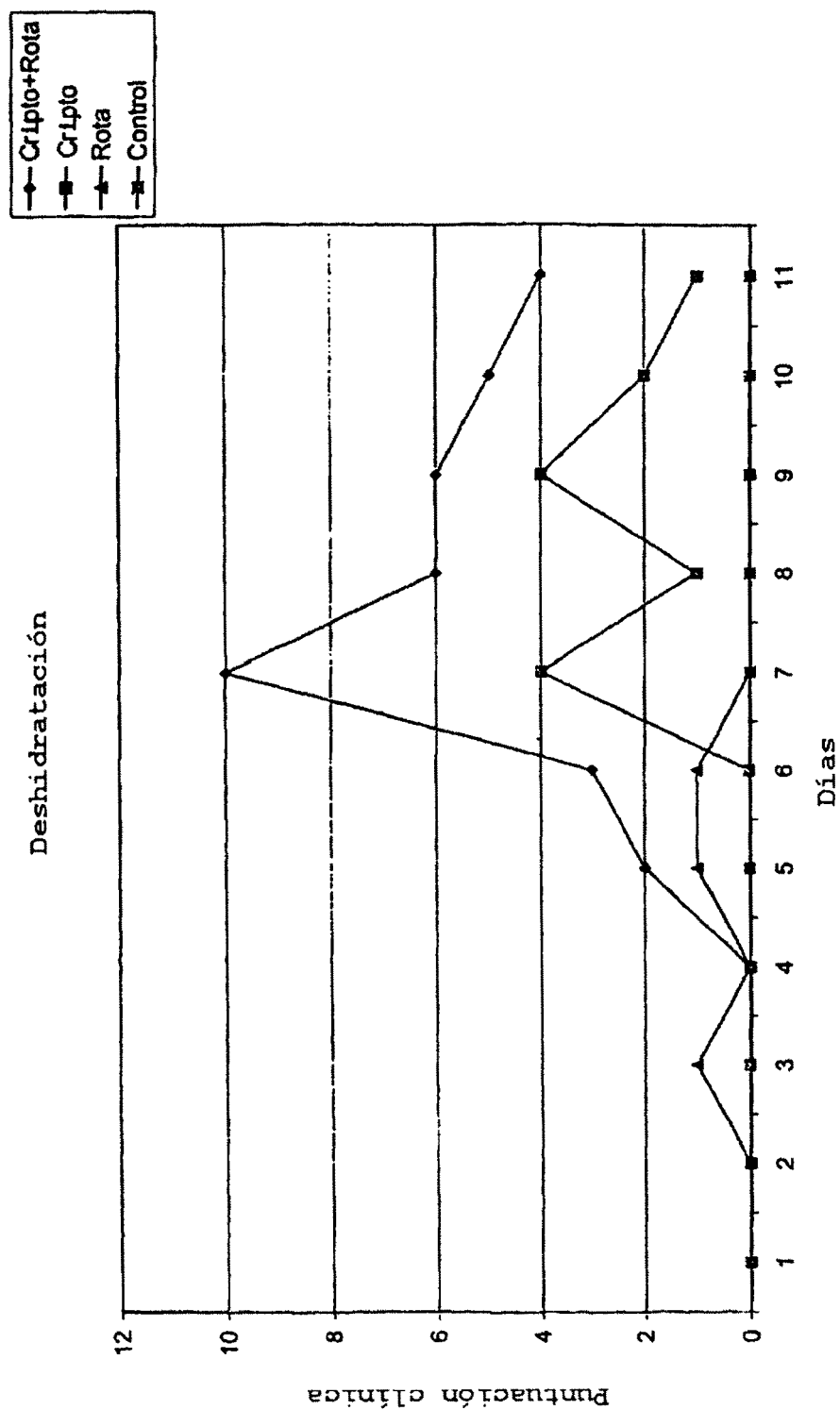


Fig. 10

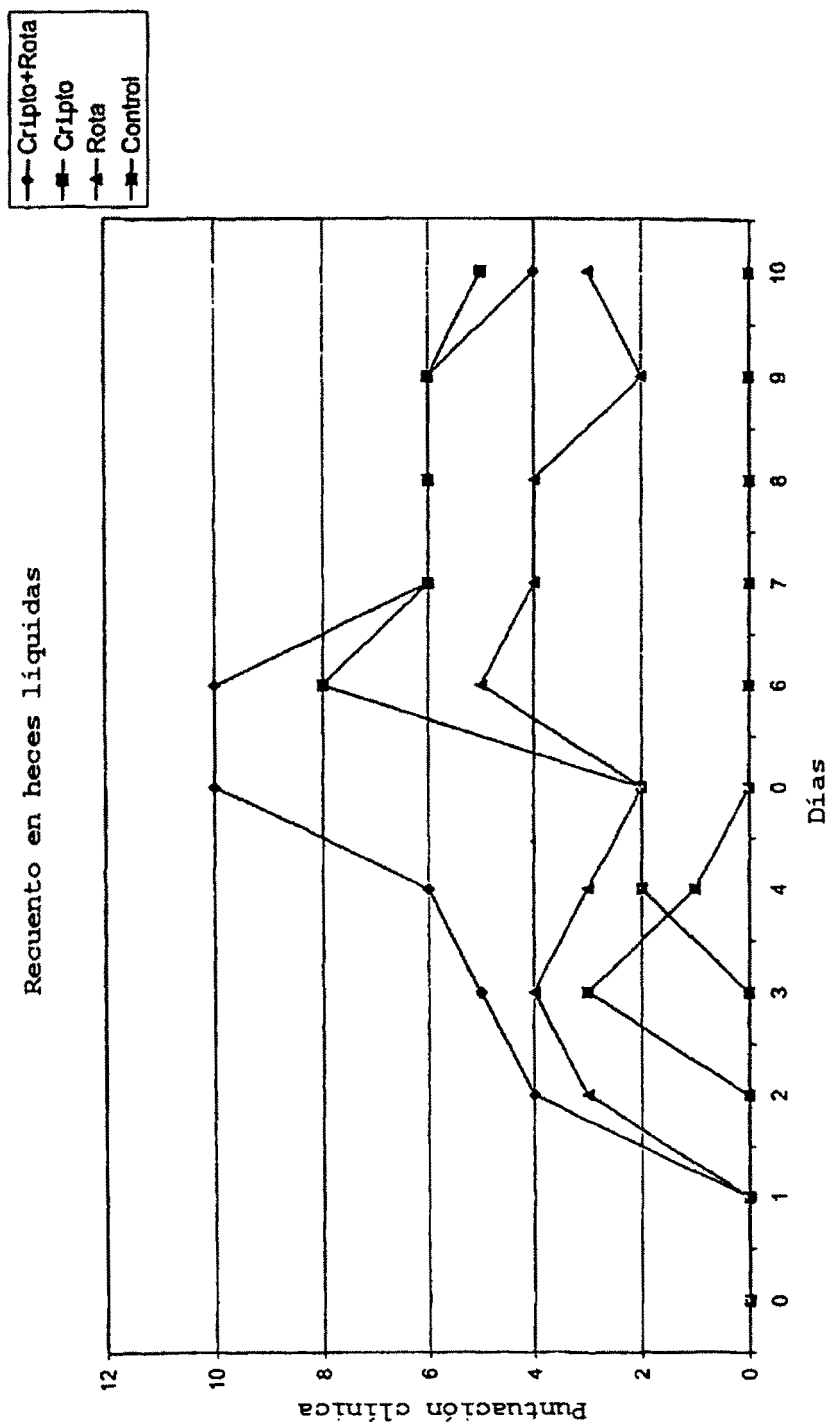


Fig. 11

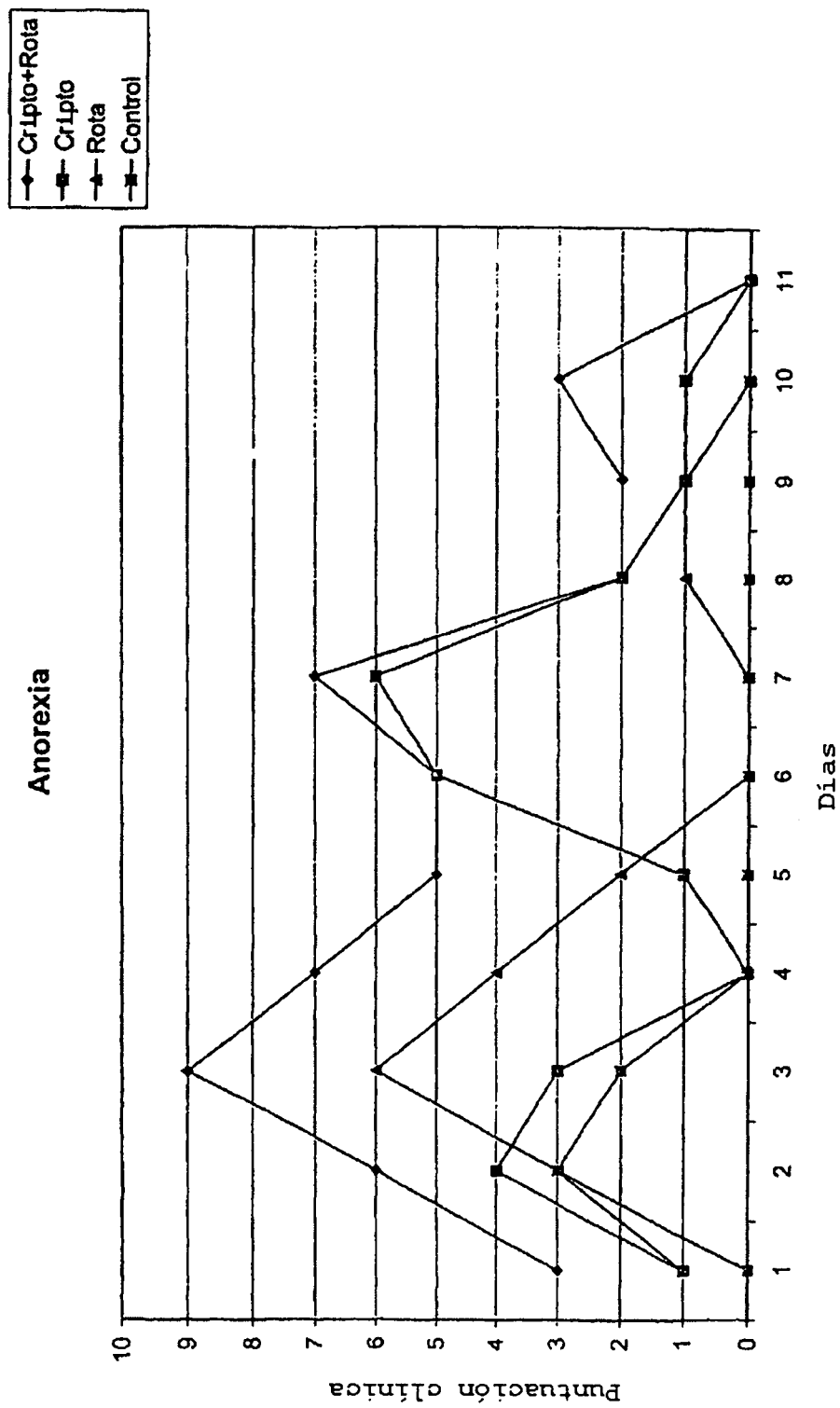


Fig. 12

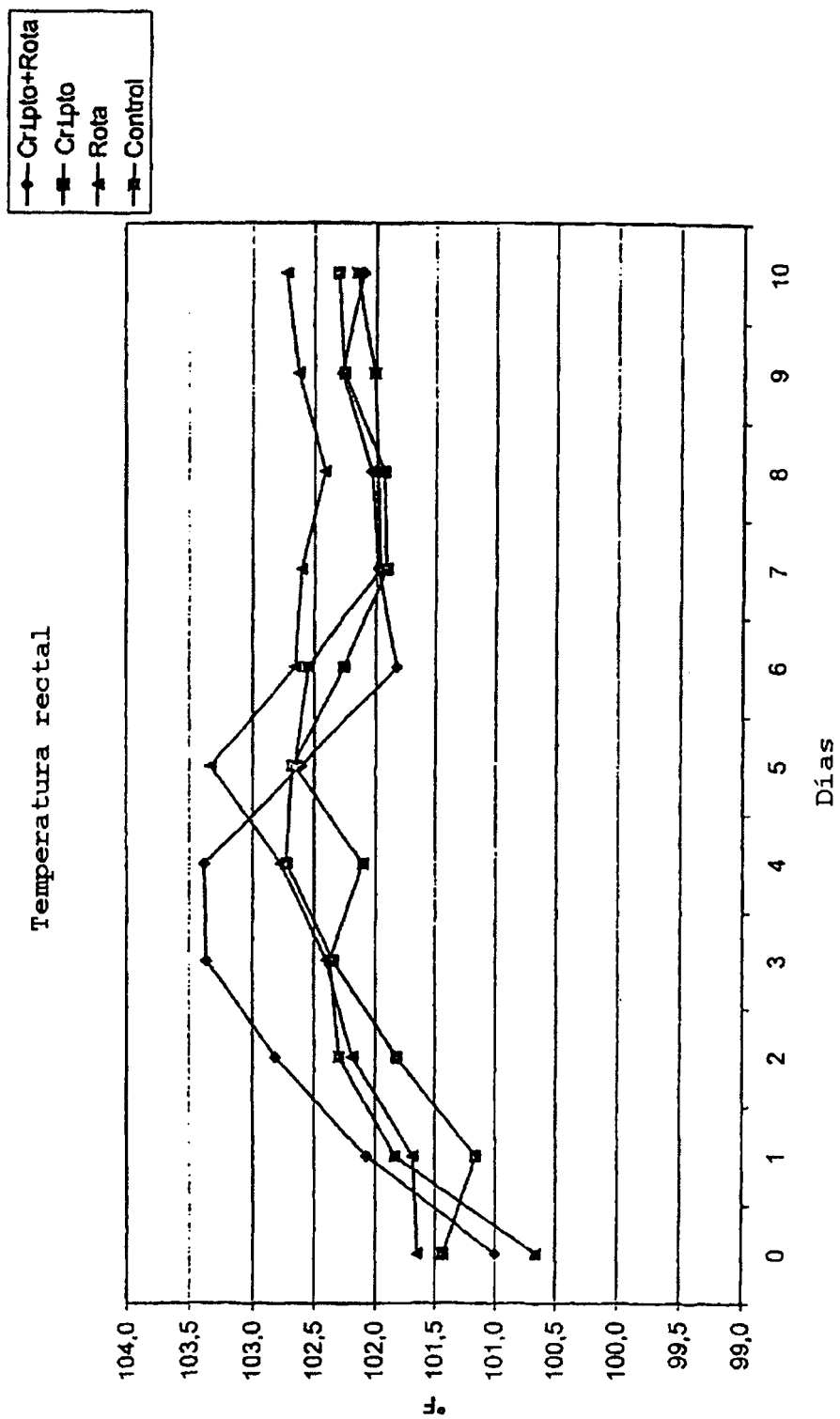


Fig. 13

ES 2 301 498 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> MERIAL	
5	<120> Composiciones y vacunas que contienen uno o más antígenos de <i>Cryptosporidium parvum</i> y de otro patógeno	
	<130> BET 00/1191	
10	<140> PCT/EP00/13387	
	<141> 2000-12-20	
	<150> US 171399	
15	<151> 1999-12-21	
	<160> 10	
20	<170> PatentIn versión 3.0	
	<210> 1	
	<211> 35	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> oligonucleótido	
	<400> 1	
35	tttttccat ggggctcgag ttttcgcttg tgttg	35
	<210> 2	
	<211> 33	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> oligonucleótido	
	<400> 2	
50	tttttgaat tcttaggcat cagctggcctt gtc	33
	<210> 3	
	<211> 35	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> oligonucleótido	
	<400> 3	
65	tttttctcg agatgggtaa cttgaaatcc tgttg	35

ES 2 301 498 T3

	<210> 4	
	<211> 42	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
10	<400> 4	
	tttttgaat tcttagttaa agtttggtt gaattgtt gc	42
15	<210> 5	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
25	<400> 5	
	tttttccat ggggtcccct atactaggtt attgg	35
30	<210> 6	
	<211> 45	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> oligonucleótido	
	<400> 6	
	tttttctcg agcctgcagc ccggggatcc aacagatgca cgacg	45
45	<210> 7	
	<211> 33	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> oligonucleótido	
	<400> 7	
	tttttctcg agtttctgct tgtgtgtac agc	33
60	<210> 8	
	<211> 65	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	

ES 2 301 498 T3

<220>

<223> oligonucleótido

5 <400> 8

	ttttttccat	gggggggttct	catcatcatc	atcatcatgg
10	tctcgagttt	tcgcttgtgt		60
	tgtac			65

<210> 9

15 <211> 64

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido

25 <400> 9

	ttttttccat	gggggggttct	catcatcatc	atcatcatgg
30	tatgggtaac	ttgaaatcct		60
	gttg			64

<210> 10

35 <211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 10

45 tttttccat gggtacttg aaatcctgtt g

50

55

60

65