



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

06-6744

21. EXPEDIENTE N° 06-6744

54. TÍTULO "COMPOSICION DE VACUNA PARA VACUNAR PERROS CONTRA ENFERMEDAD
RESPIRATORIA INFECCIOSA CANINA (CIRD)"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/118, 39/04, 39/02, 39/295, G01N 33/569,
C07K 16/12, A61K 39/116, G07K 16/12
A61P 31/04, 31/12.

71. SOLICITANTE THE ROYAL VETERINARY COLLEGE

DOMICILIO LONDRES, REINO UNIDO

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 25 ENE 2002

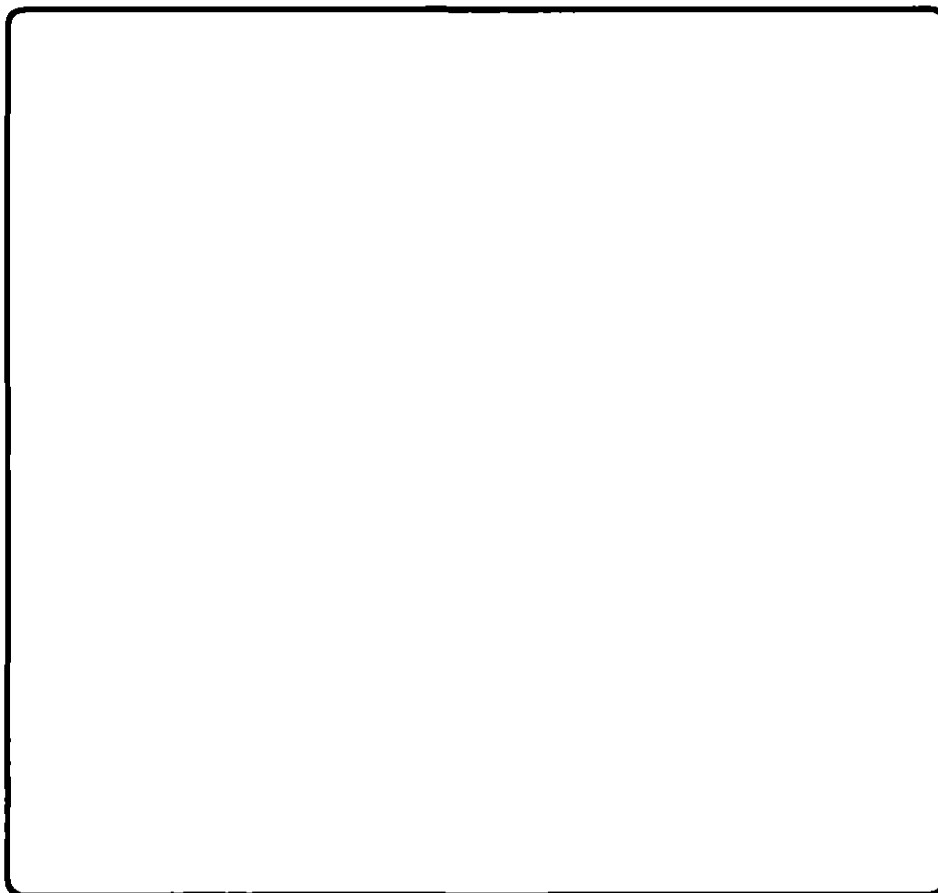
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, capítulo reivindicatorio como fue originalmente presentado en fase Internacional con su traducción, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción, anexo explicativo de modificaciones a las reivindicaciones y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLORED A RICAURTE

FIRMA:

[Handwritten signature]

C.C. 39.890.713 Usaquén T.P. 53.215

RETIRO FOLIO 3 PARA PRESENTACION.
RETIRO FOLIOS 4 Y 5 PARA TARJETERO.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente RVCV/P30948PC	PARA FUTURAS ACCIONES	Ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.
Solicitud internacional No. PCT/GB2004/002865	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 01/07/2004	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 01/07/2003
Solicitante THE ROYAL VETERINARY COLLEGE		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 8 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ La búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

COMPOSICIÓN DE VACUNA PARA VACUNAR PERROS CONTRA ENFERMEDAD RESPIRATORIA INFECCIOSA CANINA (CIRD)

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. 1

☒ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☐ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

Cañilla No. I Secuencia(s) de ácido nucleótido y/o aminoácido (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia de aminoácido revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se realizó sobre la base de:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencias
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
 - b. formato del material
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en una forma legible para computadora
 - c. momento de presentación/suministro
 - ☐ contenido en la solicitud internacional tal como se presentó
 - ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible para computadora
 - ☒ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
2. ☒ Adicionalmente, en el caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tabla en relación con aquello haya sido presentada o suministrada, o se suministraron, tal como es apropiado, las afirmaciones requeridas de que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud tal como se presentó o no va más allá de la solicitud tal como se presentó.
3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2004/002865

Castilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.: 16-19, 29, 32-34, 43-48, 51
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
ver INFORMACIÓN ADICIONAL hoja PCT/ISA/210
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Castilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION DE PCT/ISA/210**Continuación de la Casilla II.1**

Aunque las reivindicaciones 16-19, 29, 32-34, 43-48 y 51 están dirigidas a un método para el tratamiento del cuerpo humano/animal, se ha realizado la búsqueda y se ha basado en los supuestos efectos del compuesto/composición.

Continuación de la Casilla II.1

Reivindicaciones Nos.: 16-19, 29, 32-34, 43-48, 51

Reivindicaciones 16-19, 32-34:

Regla 39.1(iv) PCT - Método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Reivindicaciones 29, 43-48, 51:

Regla 39.1(iv) PCT

- Método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía.

IPC 7 A61K39/118 A61K39/09 A61K39/02 A61K39/295 G01N33/569
A61P31/04 A61P31/12 C07K16/12

EL CAMPO BUSCADOS

IPC 7 A61K G01N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

BIOSIS. EPO-Internacional. EMBASE. MEDLINE. WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	US 5 583 014 A (BROWN KAREN K Y COL) 10 de Diciembre de 1996 (1996-12-10) columna 1, línea 50 - línea 51 columna 5, línea 15 - línea 24 ejemplo 1 reivindicación 1	1, 2, 8, 23, 24, 27
X	---	18, 25, 52, 54
X	EP 0 415 794 A (COOPERS ANIMAL HEALTH) 6 de Marzo de 1991 (1991-03-06) página 2, línea 1 - página 3, línea 19 ejemplo 10 reivindicaciones 1, 2	1, 3, 6, 8, 23, 24, 27
X	---	18, 25
	-/-	

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

E documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

***L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación y otra razón especial (según se especifica)**

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

T⁴ documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

16 de Noviembre de 2004

T documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención.

"X" documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

Y documento de relevancia particular, la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica.

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

10/12/2004

Nombre y dirección de correo de la ISA
Oficina de Patentes Europeas, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Ulbrecht, M

AD

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2004/002865

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	EP 1 023 903 A (AKZO NOBEL NV) 2 de Agosto de 2000 (2000-08-02) columna 4, línea 14 - línea 16 ejemplo 2 reivindicaciones 1, 3-5	1, 2, 23, 24, 27
X	—	18, 25, 52, 54
X	WIDDERS P R Y COL: "Inmunización de yeguas para controlar la endometritis causada por Streptococcus zooepidemicus" RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, vol. 58, no. 1, 1995, páginas 75-81, XP002301526 ISSN: 0034-5288 resumen página 75, columna a mano derecha, párrafo 2 -página 77, columna a mano izquierda, párrafo 2 figura 1	1, 2, 8, 23, 24, 27, 52, 54
X	—	18, 25
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, FILADELFA, PA, US; Marzo de 2001 (2001-03) OBUKHOV I L Y COL: "Desarrollo de la vacuna contra clamidiosis en gatos, perros y animales cubiertos de piel" Acceso a la base de datos No. PREV200100271011 XP002301528 resumen	1, 18, 23-25, 27
X	& SEL' SKOKHOZYAISTVENNAYA BIOLOGIYA, no. 2, Marzo de 2001 (2001-03), páginas 68-79, ISSN: 0131-6397	8
X	US 2003/021801 A1 (KUBO AYA Y COL) 30 de Enero de 2003 (2003-01-30) columna 10, párrafo 3 - columna 19, párrafo 4 reivindicaciones 1-22	1, 5, 7, 23, 27, 29, 31, 52, 54
X	—	8, 18, 24, 30
X	"Nobivac Forcat" VETERINARIA NEWS, 'Online! 2002, páginas 1-6, XP002304346 recuperado del Internet: <URL:http://www.veterinaria.ch/news/welcome.html> 'recuperado el 2004-11-06! página 1	1, 5, 6, 23, 24, 27
X	—	8, 18, 25
	—	—

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2004/002865

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	DATABASE PHIN 'Online! 10 de Mayo de 2002 (2002-05-10) "Nobivac Forcat en Suiza" recuperado de STN Acceso a la base de datos No. 2002: 9264 XP002304348 resumen	1, 5, 6, 23, 24, 27
X	---	8, 18, 25
X	HECHARD CELINE Y COL: "Evaluación de la protección contra el sometimiento a Chlamydomphila abortus mediante vacuna de ADN con un plásmido que codifica dnaK en ratones preñados y no-preñados" VETERINARY RESEARCH (PARIS), vol. 33, no. 3, Mayo de 2002 (2002-05), páginas 313-326, XP002304347 ISSN: 0928-4249 resumen página 316, columna 1, párrafo 3 - página 317, columna 1, párrafo 2	1, 4, 23, 24, 27
X	---	8, 18
X	WO 87/00531 A (TECHNOLOGY LICENCE CO LTD) 29 de Enero de 1987 (1987-01-29) página 15, línea 13 - página 16, línea 5 ejemplo 1 reivindicaciones 9, 24	27, 29, 31
X	---	52, 54
X	WO 86/02355 A (TECHNOLOGY LICENCE CO LTD) 24 de Abril de 1986 (1986-04-24) página 8, último párrafo ejemplos 1-3 reivindicaciones 1-8	29, 31
X	---	30, 52, 54
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, FILADELFIA, PA, US; 1994 WOLOSZYN STANISLAW Y COL: "Traqueobronquitis infecciosa en perros" Acceso a la base de datos No. PREV199497512573 XP002304443 resumen	45-51
X	-& MEDYCYNÁ WETERYNARYJNA, vol. 50, no. 9, 1994, páginas 428-431, XP001183735 ISSN: 0025-8628 página 428, columna a mano izquierda, párrafo 1 página 429, columna a mano izquierda, párrafo 1	45-51
	--- -/-	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2004/002865

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
P,X	CHALKER VICTORIA J Y COL: "La asociación de Streptococcus equi subsp. zooepidemicus con la enfermedad respiratoria infecciosa canina" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 1-2, 29 de Agosto de 2003 (2003-08-29), páginas 149-156, XP002301527 ISSN: 0378-1135 el documento completo	1, 2, 8, 16-18, 20, 21, 23-25, 27, 29-33, 35, 36, 45-48, 52, 54
P,Y		9-15, 19, 22, 26, 28, 34, 37
P,Y	WO 2004/011651 A (CHALKER VICTORIA JANE; BROWNLIE JOHN (GB); ERLES KERSTIN (GB); ROYAL) 5 de Febrero de 2004 (2004-02-05) página 4; reivindicaciones 47-63, 73-87	9-15, 19, 22, 26, 28, 34, 37
A	ERLES K Y COL: "Detección de un coronavirus grupo 2 en perros con enfermedad respiratoria infecciosa" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NUEVA YORK, NY, US, vol. 310, no. 2, 5 de Junio de 2003 (2003-06-05), páginas 216-223, XP002257085 ISSN: 0042-6822 el documento completo	1-54
A	DURGUT RAMAZAN Y COL: "Síndrome de tos de perrera de perros observados en la provincia de Ankara" INDIAN VETERINARY JOURNAL, vol. 80, no. 8, Agosto de 2003 (2003-08), páginas 743-745, XP009038499 ISSN: 0019-6479 el documento completo	1-54

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2004/002865

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5583014 A	10-12-1996	CA 2044721 A1	04-01-1992
EP 0415794 A	06-03-1991	AU 637405 B2	27-05-1993
		AU 6335590 A	08-04-1991
		CA 2064911 A1	02-03-1991
		DD 297331 A5	09-01-1992
		EP 0415794 A1	06-03-1991
		EP 0766967 A1	09-04-1997
		WO 9103256 A1	21-03-1991
		HR 930517 A1	31-08-1997
		HU 61205 A2	28-12-1992
		IE 903161 A1	13-03-1991
		JP 5500056 T	14-01-1993
		LV 10394 A, B	20-02-1995
		NZ 235119 A	23-12-1991
		PL 286711 A1	15-07-1991
		PL 168316 B1	29-02-1996
		PT 95164 A, B	22-05-1991
		US 5178860 A	12-01-1993
		ZA 9006977 A	27-05-1992
EP 1023903 A	02-08-2000	EP 1023903 A1	02-08-2000
		AT 257713 T	15-01-2004
		AU 761515 B2	05-06-2003
		AU 1355700 A	27-07-2000
		CA 2296965 A1	26-07-2000
		DE 60007668 D1	19-02-2004
		DK 1023903 T3	10-05-2004
		ES 2214217 T3	16-09-2004
		JP 2000309542 A	07-11-2000
		PT 1023903 T	30-04-2004
		US 6682745 B1	27-01-2004
		US 2004120970 A1	24-06-2004
US 2003021801 A1	30-01-2003	US 2001048927 A1	06-12-2001
		AU 3476701 A	14-08-2001
		WO 0156605 A1	09-08-2001
WO 8700531 A	29-01-1987	EP 0229146 A1	22-07-1987
		WO 8700531 A1	29-01-1987
		JP 63500593 T	03-03-1988
WO 8602355 A	24-04-1986	EP 0198001 A1	22-10-1986
		WO 8602355 A1	24-04-1986
WO 2004011651 A	05-02-2004	WO 2004011651 A1	05-02-2004

PATENT COOPERATION TREATY

12

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
ERIC POTTER CLARKSON
Attn. Miles, John
Park View House
58 The Ropewalk
Nottingham NG1 5DD
UNITED KINGDOM

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) 10/12/2004

Applicant's or agent's file reference
RVCV/P30948PC

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/GB2004/002865

International filing date
(day/month/year) 01/07/2004

Applicant

THE ROYAL VETERINARY COLLEGE

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Sabine Oblinger

A

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

13

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/ may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

AB

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 28, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers;
claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 16, 18 and 17; new claims 20 and 21 added."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

If, at the time of filing any amendments under Article 18, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference RVCV/P30948PC	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/GB2004/002865	International filing date (day/month/year) 01/07/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 01/07/2003
Applicant THE ROYAL VETERINARY COLLEGE		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

VACCINE COMPOSITION FOR VACCINATING DOGS AGAINST CANINE INFECTIOUS RESPIRATORY DISEASE (CIRD)

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regards to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

AB

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2004/002865

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2004/002865

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16-19, 29, 32-34, 43-48, 51
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although the claims 16-19, 29, 32-34, 43-48 and 51 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 16-19,29,32-34,43-48,51

Claims 16-19, 32-34:

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Claims 29, 43-48, 51:

Rule 39.1(iv) PCT

- Method for treatment of the human or animal body by surgery

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	A61K39/118 A61P31/04	A61K39/09 A61P31/12
A61K39/02 C07K16/12	A61K39/295	G01N33/569
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 583 014 A (BROWN KAREN K ET AL) 10 December 1996 (1996-12-10) column 1, line 50 - line 51 column 5, line 15 - line 24 example 1 claim 1	1, 2, 8, 23, 24, 27
X		18, 25, 52, 54
X	EP 0 415 794 A (COOPERS ANIMAL HEALTH) 6 March 1991 (1991-03-06) page 2, line 1 - page 3, line 19 example 10 claims 1, 2	1, 3, 6, 8, 23, 24, 27
X		18, 25
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
"Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 November 2004		Date of mailing of the international search report 10/12/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Ulbrecht, M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 023 903 A (AKZO NOBEL NV) 2 August 2000 (2000-08-02) column 4, line 14 - line 16 example 2 claims 1,3-5	1,2,23, 24,27
X	---	18,25, 52,54
X	WIDDERS P R ET AL: "Immunisation of mares to control endometritis caused by Streptococcus zooepidemicus" RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, vol. 58, no. 1, 1995, pages 75-81, XP002301526 ISSN: 0034-5288 abstract page 75, right-hand column, paragraph 2 -page 77, left-hand column, paragraph 2 figure 1	1,2,8, 23,24, 27,52,54
X	---	18,25
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; March 2001 (2001-03) OBUKHOV I L ET AL: "Development of vaccine against chlamydiosis in cats, dogs and fur-bearing animals" Database accession no. PREV200100271011 XP002301528 abstract	1,18, 23-25,27
X	& SEL'SKOKHOZYAISTVENNAYA BIOLOGIYA, no. 2, March 2001 (2001-03), pages 68-79, ISSN: 0131-6397	8
X	US 2003/021801 A1 (KUBO AYA ET AL) 30 January 2003 (2003-01-30) column 10, paragraph 3 -column 19, paragraph 4 claims 1-22	1,5,7, 23,27, 29,31, 52,54
X	---	8,18,24, 30
X	"Nobivac Forcat" VETERINARIA NEWS, 'Online! 2002, pages 1-6, XP002304346 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.veterinaria.ch/news/welcome.html> 'retrieved on 2004-11-06! page 1	1,5,6, 23,24,27
X	---	8,18,25
	--- -/-	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE PHIN 'Online! 10 May 2002 (2002-05-10) "Nobivac Forcat in Switzerland" retrieved from STN Database accession no. 2002:9264 XP002304348 abstract	1,5,6, 23,24,27
X	—	8,18,25
X	HECHARD CELINE ET AL: "Protection evaluation against Chlamydia abortus challenge by DNA vaccination with a dnaK-encoding plasmid in pregnant and non-pregnant mice" VETERINARY RESEARCH (PARIS), vol. 33, no. 3, May 2002 (2002-05), pages 313-326, XP002304347 ISSN: 0928-4249 abstract page 316, column 1, paragraph 3 -page 317, column 1, paragraph 2	1,4,23, 24,27
X	—	8,18
X	WO 87/00531 A (TECHNOLOGY LICENCE CO LTD) 29 January 1987 (1987-01-29) page 15, line 13 -page 16, line 5 example 1 claims 9,24	27,29,31
X	—	52,54
X	WO 86/02355 A (TECHNOLOGY LICENCE CO LTD) 24 April 1986 (1986-04-24) page 8, last paragraph examples 1-3 claims 1-8	29,31
X	—	30,52,54
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1994 WOLOSZYN STANISLAW ET AL: "Infectious tracheobronchitis in dogs" Database accession no. PREV199497512573 XP002304443 abstract	45-51
X	-& MEDYCYNĄ WETERYNARYJNĄ, vol. 50, no. 9, 1994, pages 428-431, XP001183735 ISSN: 0025-8628 page 428, left-hand column, paragraph 1 page 429, left-hand column, paragraph 1	45-51
	—	
	-/-	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CHALKER VICTORIA J ET AL: "The association of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus with canine infectious respiratory disease." VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 1-2, 29 August 2003 (2003-08-29), pages 149-156, XP002301527 ISSN: 0378-1135 the whole document	1,2,8, 16-18, 20,21, 23-25, 27, 29-33, 35,36, 45-48, 52,54
P,Y		9-15,19, 22,26, 28,34,37
P,Y	WO 2004/011651 A (CHALKER VICTORIA JANE ; BROWNLIE JOHN (GB); ERLES KERSTIN (GB); ROYAL) 5 February 2004 (2004-02-05) page 4; claims 47-63,73-87	9-15,19, 22,26, 28,34,37
A	ERLES K ET AL: "Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 310, no. 2, 5 June 2003 (2003-06-05), pages 216-223, XP002257085 ISSN: 0042-6822 the whole document	1-54
A	DURGUT RAMAZAN ET AL: "Kennel cough syndrome of dogs observed in Ankara province." INDIAN VETERINARY JOURNAL, vol. 80, no. 8, August 2003 (2003-08), pages 743-745, XP009038499 ISSN: 0019-6479 the whole document	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB2004/002865

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5583014	A	10-12-1996	CA 2044721 A1	04-01-1992
EP 0415794	A	06-03-1991	AU 637405 B2	27-05-1993
			AU 6335590 A	08-04-1991
			CA 2064911 A1	02-03-1991
			DD 297331 A5	09-01-1992
			EP 0415794 A1	06-03-1991
			EP 0766967 A1	09-04-1997
			WO 9103256 A1	21-03-1991
			HR 930517 A1	31-08-1997
			HU 61205 A2	28-12-1992
			IE 903161 A1	13-03-1991
			JP 5500056 T	14-01-1993
			LV 10394 A , B	20-02-1995
			NZ 235119 A	23-12-1991
			PL 286711 A1	15-07-1991
			PL 168316 B1	29-02-1996
			PT 95164 A , B	22-05-1991
			US 5178860 A	12-01-1993
			ZA 9006977 A	27-05-1992
EP 1023903	A	02-08-2000	EP 1023903 A1	02-08-2000
			AT 257713 T	15-01-2004
			AU 761515 B2	05-06-2003
			AU 1355700 A	27-07-2000
			CA 2296965 A1	26-07-2000
			DE 60007668 D1	19-02-2004
			DK 1023903 T3	10-05-2004
			ES 2214217 T3	16-09-2004
			JP 2000309542 A	07-11-2000
			PT 1023903 T	30-04-2004
			US 6682745 B1	27-01-2004
			US 2004120970 A1	24-06-2004
US 2003021801	A1	30-01-2003	US 2001048927 A1	06-12-2001
			AU 3476701 A	14-08-2001
			WO 0156605 A1	09-08-2001
WO 8700531	A	29-01-1987	EP 0229146 A1	22-07-1987
			WO 8700531 A1	29-01-1987
			JP 63500593 T	03-03-1988
WO 8602355	A	24-04-1986	EP 0198001 A1	22-10-1986
			WO 8602355 A1	24-04-1986
WO 2004011651	A	05-02-2004	WO 2004011651 A1	05-02-2004

23

24

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
13 de Enero de 2005 (13.01.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/002618 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes²: A61K 39/118, 39/09, 39/02, 39/295, G01N 33/569, A61P 31/04, 31/12, C07K 16/12

(74) Agentes: MILES, John y col.; Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham NG1 5DD (GB).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2004/002865

(22) Fecha de Registro Internacional: 1 de Julio de 2004 (01.07.2004)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad: 0315323.6 1 de Julio de 2003 (01.07.2003) GB

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): THE ROYAL VETERINARY COLLEGE [GB/GB]; University of London, Royal College Street, Londres NW1 0TU (GB).

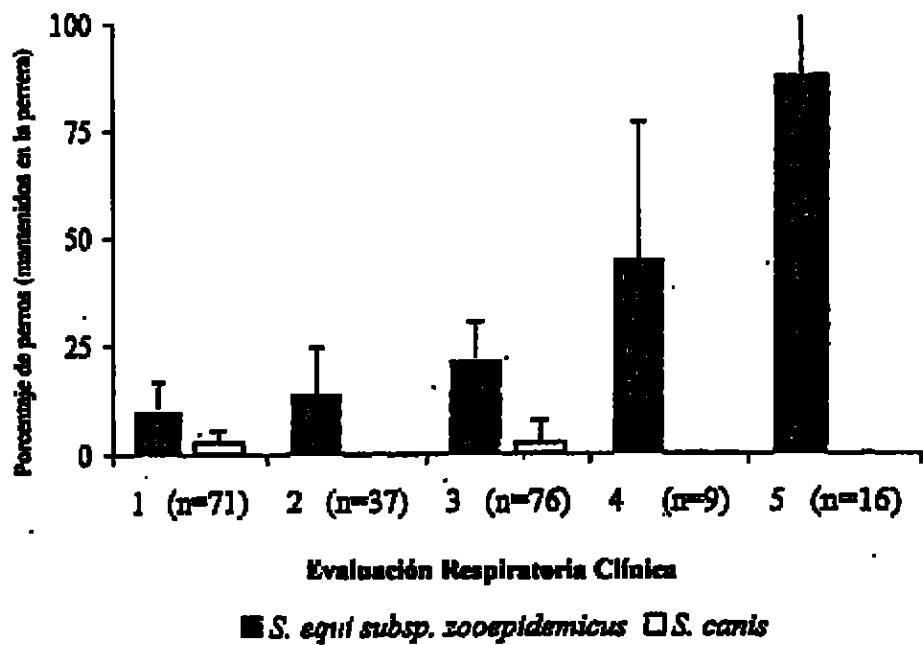
(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): BROWNLEE, John [GB/GB]; The Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, North Mymms, Hatfield, Herts AL9 7TA (GB). CHALKER, Victoria, Jane [GB/GB]; The Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, North Mymms, Hatfield, Herts AL9 7TA (GB). ERLLES, Kerstin [DE/GB]; The Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, North Mymms, Hatfield, Herts AL9 7TA (GB).

Publicada:
— con reporte de búsqueda internacional
— antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: COMPOSICIÓN DE VACUNA PARA VACUNAR PERROS CONTRA ENFERMEDAD RESPIRATORIA INFECCIOSA CANINA (CIRD)



(57) Resumen: Una composición de vacuna para vacunación de perros que comprende cualesquiera uno o más de (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *Streptococcus equi sub especies zooepidemicus* en un perro, (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *Mycoplasma cynos* en un perro, y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydia* en un perro.

27

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



WO 2005/002618 A1

(43) International Publication Date
13 January 2005 (13.01.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/002618 A1

(51) International Patent Classification: A61K 39/118;
39/019, 39/02, 39/295, G01N 33/569, A61P 31/04, 31/12,
C07K 16/12

(21) International Application Number:
PCT/GB2004/002865

(22) International Filing Date: 1 July 2004 (01.07.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0315323.6 1 July 2003 (01.07.2003) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
ROYAL VETERINARY COLLEGE [GB/GB]; Univer-
sity of London, Royal College Street, London NW1 0TU
(GB).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BROWNLIE,
John [GB/GB]; The Royal Veterinary College, Hawk-
shead Lane, North Mymms, Hatfield, Herts AL9 7TA

(GB). CHALKER, Victoria, June [GB/GB]; The Royal
Veterinary College, Hawkshead Lane, North Mymms, Hat-
field, Herts AL9 7TA (GB). ERLES, Kerstin [DE/GB],
The Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, North
Mymms, Hatfield, Herts AL9 7TA (GB).

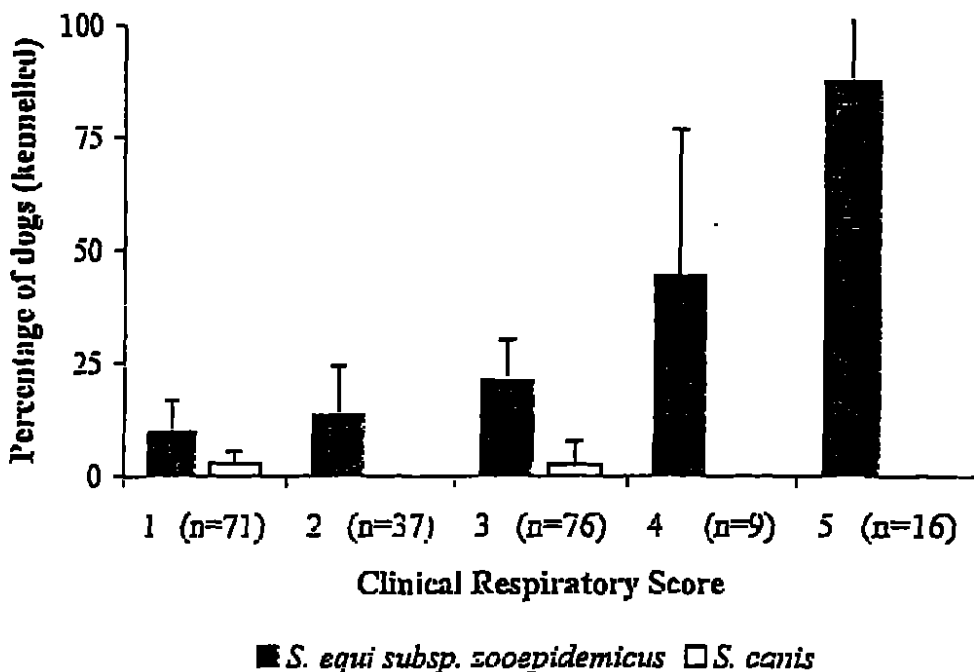
(74) Agents: MILES, John et al.; Eric Potter Clarkson, Park
View House, 58 The Rupewalk, Nottingham NG1 5DD
(GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

[Continued on next page]

(54) Title: VACCINE COMPOSITION FOR VACCINATING DOGS AGAINST CANINE INFECTIOUS RESPIRATORY DIS-
EASE (CIRD)



(57) Abstract: A vaccine composition for vaccinating dogs comprising any one or more of (a) an agent capable of raising an immune response against *Streptococcus equi sub species zooepidemicus* in a dog, (b) an agent capable of raising an immune response against *Mycoplasma cynos* in a dog, and (c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydia* in a dog.

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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

— with international search report

**CAPTULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION**

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna para vacunación de perros que comprende cualquiera o más de: (a) un agente capaz de generar una
5 respuesta inmune contra *Streptococcus equi sub especies zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* en un perro.

10 2. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro comprende *S. zooepidemicus* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica
15 dicha fracción o dicho derivado.

3. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos* o un
20 derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

4. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz

de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydophila* comprende *Chlamydophila abortus* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *Chlamydophila abortus* o un derivado de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

5 5. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydophila* comprende *Chlamydophila psittaci* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *Chlamydophila psittaci* o un derivado de la misma, o un
10 ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

6. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydophila* comprende *Chlamydophila felis* inactivada o atenuada, o un fragmento
15 inmunogénico de *Chlamydophila felis* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

7. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydophila*
20 comprende *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia suis* o *Chlamydia trachomatis* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de las mismas, o un derivado de las mismas, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

8. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

9. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada además porque comprende adicionalmente cualesquiera uno o más de: (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra coronavirus respiratorio canino (CRCV); (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra parainfluenzavirus de canino (CPIV); (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra adenovirus tipo 2 canino (CAV-2); (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra herpesvirus de canino (CHV); y (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*).

10. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV comprende CRCV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de los mismos, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

11. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada además porque el fragmento inmunogénico de CRCV comprende la proteína Spike o la proteína hemaglutinina-esterasa (HE), o una porción inmunogénica de la proteína Spike o HE.

12. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV comprende CPIV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

13. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2 comprende CAV-2 inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

14. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV comprende CHV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

15. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* comprende *B. bronchiseptica* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

16. Un método de vacunación de un perro contra enfermedad respiratoria infecciosa canina (CIRD) que comprende administrar al perro una

composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. Un método para tratamiento de la CIRD en un perro que comprende administrar al perro una composición de vacuna de conformidad
5 con cualesquiera de las reivindicaciones 1-15.

18. Un método para estimulación de una respuesta inmune contra cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* y una *Chlamydophila* en un perro, el método que comprende la administración al perro de cualquiera o más respectivos entre: (a) un agente capaz de generar una
10 respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* en un perro.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18,
15 caracterizado además porque comprende adicionalmente administrar al perro cualquiera o más de: (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV; (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV; (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2; (g) un agente capaz de generar
20 una respuesta inmune en un perro contra CHV; y (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

20. El uso de cualquiera o más de: (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un

agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* en un perro, en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de CIRDC en un perro.

5 21. El uso de cualquiera o más de: (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* en un perro, en la preparación de un medicamento para la
10 estimulación de una respuesta inmune contra dicho cualquiera o más respectivos entre *S. zooepidemicus*, *M. cynos* y una *Chlamydophila* en un perro.

22. El uso de conformidad con la reivindicación 20 ó 21, en donde el medicamento comprende adicionalmente cualquiera o más de: (d) un
15 agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV; (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV; (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2; (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
20 perro contra *B. bronchiseptica*.

23. Una composición que comprende cualesquiera uno o más de: (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta

Inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro, para uso en medicina.

24. La composición de conformidad con la reivindicación 23, para
5 uso en medicina veterinaria.

25. La composición de conformidad con la reivindicación 24, para uso en medicina veterinaria canina.

26. La composición de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 23 a 25, caracterizada además porque comprende
10 adicionalmente cualquiera o más de: (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV; (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV; (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2; (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y (h) un agente
15 capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

27. Un equipo de partes para una composición de vacuna, que comprende cualquiera o más de: (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un
20 agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro, y opcionalmente un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

28. El equipo de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque comprende adicionalmente cualquiera o más de: (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV; (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro
5 contra CPIV; (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2; (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra B. bronchiseptica.

29. Un método para elaborar un anticuerpo que se une
10 específicamente a cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydophila* que comprende generar una respuesta inmune a cualquiera o más respectivos entre *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydophila*, o un fragmento inmunogénico de los mismos en un animal, y preparar un anticuerpo a partir del animal o a partir de una célula inmortal derivada a partir
15 de éste.

30. Un método para obtener un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydophila* que comprende seleccionar un anticuerpo a partir de una librería para exhibición de anticuerpo utilizando cualquiera o más respectivos
20 entre *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydophila*, o un fragmento inmunogénico de los mismos.

31. Un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydophila*.

32. Un método para inmunizar pasivamente a un perro contra CIRD que comprende administrar al perro uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más respectivos entre *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, y una *Chlamydophila*.

5 33. Un método para tratamiento de la CIRD en un perro que comprende administrar al perro uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más respectivos entre *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, y una *Chlamydophila*.

10 34. El método de conformidad con la reivindicación 32 ó 33, caracterizado además porque comprende adicionalmente administrar al perro anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B. bronchiseptica*.

15 35. El uso de anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* y una *Chlamydophila* en la preparación de un medicamento para inmunizar pasivamente a un perro contra CIRD.

36. El uso de anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* y una *Chlamydophila* en la preparación de un medicamento para tratamiento de CIRD en un perro.

20 37. El uso de conformidad con la reivindicación 35 ó 36, en donde el medicamento comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B. bronchiseptica*.

38. Una composición que comprende cualquiera dos o más de un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, un anticuerpo que se une específicamente a *M. cynos*, y un anticuerpo que se une específicamente a una *Chlamydomphila*.

5 39. La composición de conformidad con la reivindicación 38, caracterizada además porque comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B. bronchiseptica*.

10 40. Una composición de vacuna que comprende: (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro.

15 41. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada además porque comprende adicionalmente cualquiera o más de: (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro; (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV; (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2; (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

20 42. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 40 ó 41, caracterizada además porque comprende adicionalmente: (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro.

43. Un método para determinar si un perro ha sido expuesto a una especie de *Chlamydophila* asociada con CIRD, el método comprendiendo: (a) obtener una muestra adecuada a partir del perro; y (b) identificar una especie *Chlamydophila* asociada con CIRD, o un anticuerpo a la misma, en la muestra.

44. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado además porque la especie *Chlamydophila* asociada con CIRD tiene ARNr 23S que comprende la secuencia (cuando se muestra como RNA) de cualesquiera de SEQ ID No: 1 a 8.

45. Un método para determinar si un perro tiene o es susceptible a CIRD, el método comprende: (a) obtener una muestra adecuada a partir del perro; y (b) identificar cualquiera o más de *S. zooepidemicus* o *M. cynos* o *Chlamydophila*, o un anticuerpo a cualesquiera de éstos, en la muestra.

46. El método de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque el *S. zooepidemicus* o *M. cynos* o *Chlamydophila* se identifica utilizando un anticuerpo.

47. El método de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque el *S. zooepidemicus* o *M. cynos* o *Chlamydophila* se identifica utilizando un ácido nucleico.

48. El método de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque el anticuerpo anti-*S. zooepidemicus* se detecta utilizando un *S. zooepidemicus* o una porción antigénica del mismo.

49. El método de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque el anticuerpo anti-*M. cynos* se detecta utilizando un *M. cynos* o una porción antigénica del mismo.

50. El método de conformidad con la reivindicación 45, 5 caracterizado además porque el anticuerpo anti-*Chlamydomphila* se detecta utilizando una *Chlamydomphila* o una porción antigénica del mismo.

51. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 43 a 49, caracterizado además porque la muestra es una muestra que contiene anticuerpo tal como suero, saliva, lavado traqueal o 10 lavado branquiolar.

52. Un ensayo inmunoabsorbente para detectar anticuerpos asociado con CIRP, el ensayo comprendiendo: una fase sólida revestida con cualquiera o más de (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una 15 respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro; y una marca conjugada detectable la cual se unirá a los anticuerpos unidos a la fase sólida.

53. El ensayo inmunoabsorbente de conformidad con la 20 reivindicación 52, caracterizado además porque la fase sólida contiene cualquiera de dos o tres de (a), (b) y (c).

54. Un sustrato de fase sólida revestido con cualquiera entre uno o dos o los tres de (a), (b) y (c) como se define en la reivindicación 52.

CLAIMS

1. A vaccine composition for vaccinating dogs comprising any one or more of:

(a) an agent capable of raising an immune response against *Streptococcus equi sub species zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) in a dog;

(b) an agent capable of raising an immune response against *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) in a dog; and

(c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydophila* in a dog.

2. A vaccine composition according to Claim 1 wherein the agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog comprises inactivated or attenuated *S. zooepidemicus*, or an immunogenic fragment of *S. zooepidemicus* or a derivative thereof, or a nucleic acid encoding said fraction or said derivative.

3. A vaccine composition according to Claim 1 or 2 wherein the agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog comprises inactivated or attenuated *M. cynos*, or an immunogenic fragment of *M. cynos* or a derivative thereof, or a nucleic acid encoding said fraction or said derivative.

4. A vaccine composition according to any of Claims 1 to 3 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against a *Chlamydophila* comprises inactivated or attenuated *Chlamydophila abortus*, or an immunogenic fragment of *Chlamydophila abortus* or a derivative thereof, or a nucleic acid encoding said fraction or said derivative.

- 41
5. A vaccine composition according to any of Claims 1 to 3 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against a *Chlamydophila* comprises inactivated or attenuated *Chlamydophila psittaci*, or an immunogenic fragment of *Chlamydophila psittaci* or a derivative thereof, or a nucleic acid encoding said fraction or said derivative.
6. A vaccine composition according to any of Claims 1 to 3 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against a *Chlamydophila* comprises inactivated or attenuated *Chlamydophila felis*, or an immunogenic fragment of *Chlamydophila felis* or a derivative thereof, or a nucleic acid encoding said fraction or said derivative.
7. A vaccine composition according to any of Claims 1 to 3 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against a *Chlamydophila* comprises inactivated or attenuated *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia suis* or *Chlamydia trachomatis*, or an immunogenic fragment thereof, or a derivative thereof, or a nucleic acid encoding said fraction or said derivative.
8. A vaccine composition according to any of Claims 1 to 7 and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or adjuvant.
9. A vaccine composition according to any of Claims 1 to 8 further comprising any one or more of:
- (d) an agent capable of raising an immune response in a dog against canine respiratory coronavirus (CRCoV);
 - (e) an agent capable of raising an immune response in a dog against canine parainfluenzavirus (CPIV);
- 74
- 74

42

(f) an agent capable of raising an immune response in a dog against canine adenovirus type 2 (CAV-2);

(g) an agent capable of raising an immune response in a dog against canine herpesvirus (CHV); and

(h) an agent capable of raising an immune response in a dog against *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*).

10. A vaccine composition according to Claim 9 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against CRCV comprises inactivated or attenuated CRCV, or an immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid encoding said immunogenic fraction.

11. A vaccine composition according to Claim 10 wherein the immunogenic fragment of CRCV comprises the Spike protein or the hemagglutinin-esterase (HE) protein, or an immunogenic portion of the Spike or HE protein.

12. A vaccine composition according to any of Claims 9 to 11 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against CPTV comprises inactivated or attenuated CPTV, or an immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid encoding said immunogenic fraction.

13. A vaccine composition according to any of Claims 9 to 12 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against CAV-2 comprises inactivated or attenuated CAV-2, or an immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid encoding said immunogenic fraction.

14. A vaccine composition according to any of Claims 9 to 13 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against CHV comprises inactivated or attenuated CHV, or an immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid encoding said immunogenic fraction.

43

15. A vaccine composition according to any of Claims 9 to 14 wherein the agent capable of raising an immune response in a dog against *B. bronchiseptica* comprises inactivated or attenuated *B. bronchiseptica*, or an immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid encoding said immunogenic fraction.

16. A method of vaccinating a dog against canine infectious respiratory disease (CIRD) comprising administering to the dog a vaccine composition according to any of Claims 1 to 15.

17. A method of treating CIRD in a dog comprising administering to the dog a vaccine composition according to any of Claims 1-15.

18. A method of stimulating an immune response against any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* and a *Chlamydophila* in a dog, the method comprising administering to the dog a respective any one or more of:

(a) an agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog;

(b) an agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog; and

(c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydophila* in a dog.

19. A method according to Claim 18 further comprising administering to the dog any one or more of:

(d) an agent capable of raising an immune response in a dog against CRCV;

(e) an agent capable of raising an immune response in a dog against CPTV;

76

(f) an agent capable of raising an immune response in a dog against CAV-2;

(g) an agent capable of raising an immune response in a dog against CHV; and

(h) an agent capable of raising an immune response in a dog against *B. bronchiseptica*.

20. Use of any one or more of:

(a) an agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog;

(b) an agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog; and

(c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydophila* in a dog.

in the preparation of a medicament for prophylaxis or treatment of CIRDC in a dog.

21. Use of any one or more of:

(a) an agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog;

(b) an agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog; and

(c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydophila* in a dog,

in the preparation of a medicament for stimulating an immune response against said respective any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* and a *Chlamydophila* in a dog.

22. The use according to Claim 20 or 21 wherein the medicament further comprises any one or more of:

(d) an agent capable of raising an immune response in a dog against CRCV;

(e) an agent capable of raising an immune response in a dog against CPV;

(f) an agent capable of raising an immune response in a dog against CAV-2;

(g) an agent capable of raising an immune response in a dog against CIV; and

(h) an agent capable of raising an immune response in a dog against *B. bronchiseptica*.

23. A composition comprising any one or more of:

(a) an agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog;

(b) an agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog; and

(c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydia* in a dog,
for use in medicine.

24. A composition according to Claim 23 for use in veterinary medicine.

25. A composition according to Claim 24 for use in canine veterinary medicine.

26. A composition according to any of Claims 23 to 25 further comprising any one or more of:

(d) an agent capable of raising an immune response in a dog against CRCV;

(e) an agent capable of raising an immune response in a dog against CPV;

46

- (f) an agent capable of raising an immune response in a dog against CAV-2;
- (g) an agent capable of raising an immune response in a dog against CHV; and
- (h) an agent capable of raising an immune response in a dog against *B. bronchiseptica*.

27. A kit of parts for a vaccine composition, comprising any one or more of:

- (a) an agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog;
- (b) an agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog; and
- (c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydophila* in a dog,
and optionally a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or adjuvant.

28. The kit according to Claim 27 further comprising any one or more of:

- (d) an agent capable of raising an immune response in a dog against CRCV;
- (e) an agent capable of raising an immune response in a dog against CPTV;
- (f) an agent capable of raising an immune response in a dog against CAV-2;
- (g) an agent capable of raising an immune response in a dog against CHV; and
- (h) an agent capable of raising an immune response in a dog against *B. bronchiseptica*.

71

49

29. A method of making an antibody that specifically binds to any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* or a *Chlamydophila* comprising raising an immune response to a respective any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* or a *Chlamydophila*, or an immunogenic fragment thereof in an animal, and preparing an antibody from the animal or from an immortal cell derived therefrom.

30. A method of obtaining an antibody that specifically binds to any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* or a *Chlamydophila* comprising selecting an antibody from an antibody-display library using a respective any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* or a *Chlamydophila*, or an immunogenic fragment thereof.

31. An antibody that specifically binds to *S. zooepidemicus*, *M. cynos* or a *Chlamydophila*.

32. A method of passively immunising a dog against CIRDC comprising administering to the dog one or more antibodies that specifically bind to a respective one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, and a *Chlamydophila*.

33. A method of treating CIRDC in a dog comprising administering to the dog one or more antibodies that specifically bind to a respective one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, and a *Chlamydophila*.

34. A method according to Claim 32 or 33 further comprising administering to the dog antibodies that specifically bind to any one or more of CRCV, CPiV, CAV-2, CHV, and *B. bronchiseptica*.

35. Use of antibodies that specifically bind to any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* and a *Chlamydomphila* in the preparation of a medicament for passively immunising a dog against CIRDC.

36. Use of antibodies that specifically bind to any one or more of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* and a *Chlamydomphila* in the preparation of a medicament for treating CIRDC in a dog.

37. Use according to Claim 35 or 36 wherein the medicament further comprises antibodies that specifically bind to any one or more of CRCV, CPV, CAV-2, CHV, and *B. bronchiseptica*.

38. A composition comprising any two or more of an antibody that specifically binds to *S. zooepidemicus*, an antibody that specifically binds to *M. cynos*, and an antibody that specifically binds to a *Chlamydomphila*.

39. A composition according to Claim 38 further comprising antibodies that specifically bind to any one or more of CRCV, CPV, CAV-2, CHV, and *B. bronchiseptica*.

40. A vaccine composition comprising:

(b) an agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog; and

(d) an agent capable of raising an immune response against CRCV in a dog.

41. The vaccine composition according to Claim 40 further comprising any one or more of:

(c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydomphila* in a dog;

- 49
- (e) an agent capable of raising an immune response in a dog against CPiV;
 - (f) an agent capable of raising an immune response in a dog against CAV-2;
 - (g) an agent capable of raising an immune response against CHV in a dog; and
 - (h) an agent capable of raising an immune response in a dog against *B. bronchiseptica*.

42. The vaccine composition according to Claim 40 or 41 further comprising:

- (a) an agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog.

43. A method of determining whether a dog has been exposed to a *Chlamydophila* species associated with CIRDC, the method comprising:

- (a) obtaining a suitable sample from the dog; and
- (b) identifying a *Chlamydophila* species associated with CIRDC, or an antibody there to, in the sample.

44. A method according to Claim 43 wherein the *Chlamydophila* species associated with CIRDC has 23S rRNA comprising the sequence (when shown as RNA) of any of SEQ ID No: 1 to 8.

45. A method of determining whether a dog has or is susceptible to CIRDC, the method comprising:

- (a) obtaining a suitable sample from the dog; and
- (b) identifying any one or more of *S. zooepidemicus* or *M. cynos* or *Chlamydophila*; or an antibody to any of these, in the sample.

46. A method according to Claim 45 wherein the *S. zooepidemicus* or *M. cynos* or *Chlamydomphila* is identified using an antibody.

47. A method according to Claim 45 wherein the *S. zooepidemicus* or *M. cynos* or *Chlamydomphila* is identified using a nucleic acid.

48. A method according to Claim 45 wherein the anti-*S. zooepidemicus* antibody is detected using a *S. zooepidemicus* or an antigenic portion thereof.

49. A method according to Claim 45 wherein the anti-*M. cynos* antibody is detected using a *M. cynos* or an antigenic portion thereof.

50. A method according to Claim 45 wherein the anti-*Chlamydomphila* antibody is detected using a *Chlamydomphila* or an antigenic portion thereof.

51. A method according to any one of Claims 43 to 49 wherein the sample is an antibody-containing sample such as serum, saliva, tracheal wash or bronchiolar lavage.

52. An immunosorbent assay for detecting antibodies associated with CIRDC, the assay comprising:

a solid phase coated with any one or more of (a) an agent capable of raising an immune response against *S. zooepidemicus* in a dog; (b) an agent capable of raising an immune response against *M. cynos* in a dog; and (c) an agent capable of raising an immune response against a *Chlamydomphila* in a dog;

and a detectable label conjugate which will bind to the antibodies bound to the solid phase.

53. An immunosorbent assay according to Claim 52 wherein the solid phase contains any two or all three of (a), (b) and (c).

54. A solid phase substrate coated with any one or two or all three of (a), (b) and (c) as defined in Claim 52.

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para:		PCT	
ver forma PCT/ISA/220		OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)	
		Fecha de correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)	
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación	
Solicitud Internacional No. PCT/GB2004/002865	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 01.07.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 01.07.2003	
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K39/118, A61K39/09, A61K39/02, A61K39/295, G01N33/569, A61P31/04, A61P31/12, C07K16/12			
Solicitante THE ROYAL VETERINARY COLLEGE			
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases de la opinión ☒ Casilla No. II Prioridad ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación ☒ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.			
Nombre y dirección de correo de la ISA: Oficina Europea de Patentes D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Funcionario Autorizado Ulbrecht, M Teléfono No. +49 89 2399-7710	

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.

☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2004/002865

Casilla No. II Prioridad

1. ☐ El siguiente documento no se ha presentado:

☐ copia de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado (Regla 43bis.1 y 66.7(a)).

☐ traducción de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado (Regla 43bis.1 y 66.7(b)).

Por consiguiente, no ha sido posible considerar la validez de la reivindicación de prioridad. Sin embargo, se ha establecido esta opinión sobre el supuesto de que la fecha relevante es la fecha de la prioridad reivindicada.

2. ☐ Se ha establecido esta opinión como si no se hubiese reivindicado ninguna prioridad debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de prioridad es inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). Por consiguiente, para los fines de esta opinión, se considera que la fecha de registro internacional indicada anteriormente es la fecha relevante.

3. ☒ No ha sido posible considerar la validez de la prioridad reivindicada porque una copia del documento de prioridad no estaba disponible para la ISA en el momento en que se condujo la búsqueda (Regla 17.1). Esta opinión ha sido, no obstante, establecida sobre el supuesto de que la fecha relevante es la fecha de prioridad reivindicada.

4. Observaciones adicionales, si es necesario:

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 16-19, 29, 32-34, 43-48, 51 (con respecto a AI)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 16-19, 29, 32-34, 43-48, 51 (con respecto a AI) se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):

- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.

- ☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos.

- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

- ☐ no se ha proporcionado

- ☐ no cumple con el estándar

el formato legible por computador

- ☐ no se ha proporcionado

- ☐ no cumple con el estándar

- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

- ☐ Ver hoja separada para más detalles

36

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

**Solicitud Internacional No.
PCT/GB2004/002865**

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones 9-22, 25, 26, 30, 32-37, 45-48, 51
	No: Reivindicaciones 1, 2, 8, 23, 24, 27, 29, 31, 52, 54
Nivel Inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones 43, 44, 53
	No: Reivindicaciones 1-42, 45-52, 54
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si: Reivindicaciones 1-15, 20-28, 30, 31, 35-42, 49, 50, 52-54
	No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Casilla No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Reglas 43bis.1 y 70.10)

y/o

2. Descripciones no escritas (Reglas 43bis.1 y 70.9)

ver forma 210

54

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: US-A-5 583 014
- D2: EP-A-1 023 903
- D3: WIDDERS PR ET AL: "Immunisation of mares to control endometritis caused by Streptococcus zooepidemicus" RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, vol. 58, no. 1, 1995, páginas 75-81
- D4: EP-A-0 415 794
- D5: HECHARD CELINE ET AL: "Protection evaluation against Chlamidophyla abortus challenge by DNA vaccination with a dnaK-encoding plasmid in pregnant and non-pregnant mice" VETERINARY RESEARCH (PARIS), vol. 33, no. 3, Mayo de 2002 (2002-05), páginas 313-326
- D6: "Nobivac Forcat" VETERINARIA NEWS, [Online] 2002, páginas 1-6
- D7: DATABASE PHIN STN; Mayo 10 de 2002 (2002-05-10). "Nobivac Forcat in Switzerland"
- D8: US 2003/021801)
- D9: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMAION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Marzo de 2001 (2001-03), OBUKHOV IL ET AL: "development of vaccine against chlamydosis in cats, dogs and fur-bearing animals" No. de acceso de Base de datos PREV200100271011
- D10: WO 86/02355
- D11: WO 87/00531
- D12: WOLOSZYN S ET AL: "Infectious tracheobrinchitis in dogs". MEDYCYNA WETERYNARYNA, vol. 50, no. 9, 1994, páginas 428-431
- D13: CHALKER VICTORIA J ET AL: "The association of Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus with canine infectious respiratory disease. VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 1-2, Agosto 29 de 2003 (2003-08-29), páginas 149-156
- D14: WO 2004/011651

Re Item III:

Las reivindicaciones 16-19 y 32-34 se relacionan con métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Las palabras de las reivindicaciones 29, 43-48 y 51 son tales que abarcan un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Así, las reivindicaciones 16-19, 29, 32-34, 43-48 y 51 se relacionan con la materia objeto considerada por esta autoridad como cubierta por las provisiones de R.67.1 (iv) PCT. En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Art. 34(4) (a)(i) PCT).

Re Item V:

- 1.1 D1 revela una vacuna que comprende detergente de enzima extraído de *S. zooepidermicus* (c.1, l. 50-51; c.5, l. 15-24; ejemplo 1; reivindicación 1).
D2 enseña una vacuna que comprende *S. zooepidermicus* de vida atenuada (c.4, l. 14-16; Ejemplo 2; reivindicaciones 1, 3-5).
D3 revela una vacuna que comprende un extracto antigénico de *S. zooepidermicus* (p. 75, c.1, parra. 2 – p. 76, c. 1, parra. 4).
D4 enseña una vacuna que comprende *Chlamydia psittaci* o *M. cynos* (p.2, l.1 – p. 3, l.19; Ejemplo 10; reivindicaciones 1 y 2).
D5 enseña una vacuna contra *Chlamydophila abortus* que comprende su gen *dnaK* (resumen; p. 316, c. 1, parra. 2 – c. 2, parra. 3).
D6 (documento completo) y D7 (documento completo) enseñan una vacuna que comprende *Chlamydophila felis* de vida atenuada (Nobivac Forcat).
D8 revela vacunas contra *C. trachomatis*, *C. psittaci* y *C. pneumoniae* que comprenden los polipéptidos *PorB* respectivos (reivindicaciones 1-18).
D9 enseña una vacuna contra *Chlamydosis* en perros, que comprende *Chlamydia* inactivada (documento completo).
Como no hay características específicas sugeridas que se requieran para alcanzar una inmunogenicidad en perros, se considera que las vacunas reveladas en D1-D9 destruyen la novedad de la reivindicación 1 (Art. 33(2) PCT).
- 1.2 En D1-D9 (supra) las vacunas se usan en medicina. Así, la reivindicación 23 carece de novedad sobre cualquiera de D1-D9 (Art. 33(2) PCT).
- 1.3 D6 también revela un kit que comprende la vacuna Nobivac Forcat (c.4, parra.3). La materia objeto de la reivindicación 27, carece entonces de novedad sobre D6 (Art. 33(2) PCT).
D8 enseña un kit que comprende el polipéptido *PorB* (c. 14, parra. 3), destruyendo así la novedad de la reivindicación 27 (Art. 33(2) PCT).

D11 enseña un kit que comprende un antígeno de *S. zooepidermicus*. Como cualquier antígeno de *S. zooepidermicus* se considera capaz de elevar una respuesta inmune en perros (p. 15, l. 13 - p. 16, l. 5), la materia objeto de la reivindicación 27 carece de novedad sobre D11 (Art. 33(2) PCT).

Más aún, como la única característica del kit de acuerdo con la reivindicación 27 es el agente capaz de elevar una respuesta inmune contra cualquiera de los microorganismos listados, y como cada uno de D1-D5, D7 y D9 revela tal agente (cf. V 1.1), la materia objeto de la reivindicación 27 también carece de novedad sobre cualquiera de dichos documentos (Art. 33(2) PCT).

- 1.4 D4 revela un método para generar un anticuerpo monoclonal dirigido en *S. zooepidermicus* así como tal anticuerpo (p. 15, l. 13 - p. 16, l. 5; Ejemplo 1; reivindicación 9). D8 enseña anticuerpos anti-PorB así como un método para generarlos (c. 10, parra. 3-5; c. 19, parra. 4).

D10 enseña anticuerpos monoclonales a *C. trachomatis* y *C. psittaci* así como un método para generar dicho anticuerpo mediante tecnología de hibridoma (ejemplos 1-3; reivindicaciones 1-8).

D11 enseña un anticuerpo monoclonal específico para *S. zooepidermicus* así como un método para generar dicho anticuerpo mediante tecnología de hibridoma (Ejemplo 1; reivindicación 9).

Así, la materia objeto de las reivindicaciones 29 y 31 es anticipada por D4, D8, D10 y D11 (Art. 33(2) PCT).

- 1.5 D3 revela un ELISA para la detección de anticuerpos generados contra *S. zooepidermicus* a la vacunación de mares con una preparación bacteriana de *S. zooepidermicus*. En dicho ELISA dicha preparación es recubierta en placas de microtítulo y los anticuerpos enlazados son detectados mediante una prueba de emparedado que involucra un conjugado de etiqueta detectable que se enlaza a los anticuerpos enlazados a la placa de microtítulo (p- 76, c. 2, último parra.).

D5 enseña un ELISA para la detección de anticuerpos dirigidos a Dna-K, en donde el DnaK es inmovilizado a un soporte y se usan anticuerpos anti-ratón conjugados con peroxidasa para detectar el enlace de los anticuerpos contenidos en la muestra al DnaK inmovilizado (p- 317, c. 1, parra. 2).

D8 enseña un ensayo inmunosorbente de emparejado para la detección de anticuerpos dirigidos a PorB, en donde PorB es inmovilizado a un soporte sólido y se usan anticuerpos secundarios marcados para detectar los anticuerpos unidos al PorB inmovilizado (c. 11, parra. 3 - c. 14, parra. 1).

Las revelaciones de D3, D5 y D8 son entonces perjudiciales a la novedad de las reivindicaciones 52 y 54 (Art. 33(2) PCT).

- 1.6 D1-D3 (supra) revela la característica adicional sugerida por la reivindicación 2 y 24. Más aún, las características adicionales de acuerdo con la reivindicación 8 también están reveladas en D1 (supra) y D3 (supra).

D4 (supra) revela las características adicionales sugeridas por las reivindicaciones 3, 5, 8 y 24.

D5 (supra) revela las características adicionales sugeridas por las reivindicaciones 4 y 24.

Las características adicionales de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6 y 24 están reveladas en D6 (supra) y D7 (supra).

D8 (supra) revela las características adicionales sugeridas por las reivindicaciones 5 y 7.

D9 (supra) revela las características adicionales propuestas por las reivindicaciones 24 y 25.

Así, las reivindicaciones 2-8, 24 y 25 no establecen novedad sobre la técnica previa (Art. 33(2) PCT).

- 1.7 La materia objeto de las reivindicaciones 9-22, 26, 28, 30, 32-51 y 53 es novedosos porque la técnica previa no revela la combinación de características sugerida por cualquiera de estas reivindicaciones 8 (Art. 33(2) PCT).

- 2.1 La descripción solo enseña una asociación de *S. zooepidermicus*, *M. cynos* y *Chlamydoghila* PCR positiva con CIRD. No se provee soporte para ningún efecto profiláctico/terapéutico de una vacuna que comprende un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra cualquiera de estos organismos en perros, que sería la base para reconocer que se resuelve el problema de vacunar a un perro contra CIRD o de tratar CIRD en un perro usando dicha vacuna. Así, no se considera que la materia objeto de las reivindicaciones 16 y 17 involucra un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).

- 2.2 Para consideraciones similares (cf. V 2.1) la materia objeto de las reivindicaciones 20, 21, 32, 33, 35, 36 y 40 tampoco se considera que involucre un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).

- 2.3 La combinación de los anticuerpos sugeridos por la reivindicación 38 es una mera yuxtaposición de los anticuerpos conocidos (cf. V 1.4) que no tiene ninguna interrelación no obvia y cuya inclusión en una composición simple, por lo tanto, no establece un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.4 Por estas consideraciones (cf. V 2.3) la reivindicación dependiente 39 tampoco se considera inventiva (Art. 33(3) PCT).
- 2.5 D12 enseña una asociación de CIRD con M., cynos (p. 428, c. 1, parra. 1; p. 429, c. 1, parra. 1). Con base en esta enseñanza y aplicando experimentación de rutina, el experto inventaría un método para determinar si un perro tiene CIRD mediante la identificación de dicho microorganismo en una muestra del perro. Así, la reivindicación 45 no se considera que involucre un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.6 La materia objeto de la reivindicación 18 difiere de, e.g., D3 en que se estimula una respuesta inmune en perros y no en yeguas. No hay soporte que dicha estimulación tenga un efecto técnico, a saber prevención, cura o alivio de CIRD en perros (cf. V 2.1). Por lo tanto, la selección de perros para inmunización se considera arbitraria y no establece un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.7 Como tampoco hay soporte para un agente de acuerdo con la reivindicación 9 para inducir una respuesta inmune protectora en contra o curativa para CIRD, las mismas consideraciones que para V 2.1 conducen a la conclusión que esta reivindicación no involucra un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.8 Para las consideraciones formuladas bajo V 2.1, 2.2 y 2.7, la materia objeto de las reivindicaciones 10-15, 22, 26, 34, 41 y 42 tampoco se considera inventiva (Art. 33(3) PCT).
- 2.9 El método de la reivindicación 30 es una modificación de rutina de los métodos para generar un mAb específico de antígeno como se sugiere en cualquiera de D4, D10 y D11 (cf. V 1.4) que no produce ningún efecto técnico imprevisible, y por lo tanto no involucra un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.10 En vista de los argumentos dados bajo V 2.1, 2.6 y 2.7, el kit de acuerdo con la reivindicación 28 se relaciona con una yuxtaposición arbitraria de los componentes que no muestra ninguna interrelación no obvia. Así, dicha reivindicación no involucra un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).

- 2.11 Las características adicionales sugeridas por las reivindicaciones 46, 47, 49 y 51 son una materia de experimentación de rutina y no producen ningún efecto técnico imprevisible y, por lo tanto, no establecen un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.12 Las características adicionales sugeridas por las reivindicaciones 48 y 50 no tienen un efecto limitante con respecto a la alternativa en el antecedente relacionado con *M. cynos*, y por lo tanto no establecen un nivel inventivo sobre D12 (cf. V 2.5 y 2.11) (Art. 33(3) PCT).
- 2.13 La materia objeto de la reivindicación 43 resuelve el problema de determinar si un perro ha estado expuesto a *Chlamydophila* asociada con CIRD. La solución involucra identificar en una muestra del perro, las especies de *Chlamydophila* asociadas con CIRD o un anticuerpo de esta. Este método está basado en la asociación observada de CIRD con ciertas especies de *Chlamydophila* que no son sugeridas en la técnica previa. Así, la materia objeto de la reivindicación 43 involucra un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.14 La reivindicación 53 sugiere un ensayo inmunosorbente que comprende una fase sólida que contiene antígenos de al menos dos de *S. zooepidermicus*, *M. cynos* y *Chlamydophila* asociadas con CIRD. Esta fase sólida resuelve el problema técnico de aumentar la sensibilidad de detección de anticuerpos asociados con CIRD. D12 enseña solamente la asociación de *M. cynos* con CIRD. El experto no tendría un incentivo para inmovilizar ninguno de los otros dos antígenos. La reivindicación 53 es por lo tanto, considerada que involucra un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 2.15 Las consideraciones de V 2.13 también aplican a la reivindicación dependiente 44 (Art. 33(3) PCT).
- 3.1 Para la evaluación de las reivindicaciones 16-19, 29, 32-34, 43-48 y 51 presentes, acerca de la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para uso primero en un tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

- 3.2 La materia objeto de las reivindicaciones 1-15, 20-28, 30, 31, 35-42, 49, 50 y 52-54 se considera industrialmente aplicable (Art. 33(4) EPC).
- 4.1 Las reivindicaciones 1-7, 9-15, 18-23, 26-28, 40-42 y 52 no cumplen con los requerimientos del Artículo 6 PCT en que la materia para la cual se busca protección no está definida claramente. Las reivindicaciones intentan definir la materia objeto en términos del resultado a alcanzar ("agente capaz de elevar una respuesta inmune contra..."), que simplemente equivale a la declaración del problema subyacente, sin proveer las características técnicas necesarias para alcanzar este resultado. No se puede determinar que compuestos caen bajo dicha definición funcional.
- 4.2 Además, en la reivindicación 43, la materia objeto se considera que está definida en términos de un resultado a alcanzar ("una especie de *Chalmydophila* ahocicada con CIRD"), creando así no claridad (Art. 6 PCT).
- 4.3 Mientras que la parte introductoria de la reivindicación 52 parece relacionarse con un método, las características técnicas propuestas se refieren a un dispositivo. Esta inconsistencia hace que la categoría de dicha reivindicación no sea clara (Art. 6 PCT).

Re Item VI:

Si la prioridad de la presente solicitud no es válida, D13 y D14 serían relevantes con respecto a novedad y el nivel inventivo (Art. 33(2) y (3) PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

61

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GB2004/002865

International filing date (day/month/year)
01.07.2004

Priority date (day/month/year)
01.07.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K39/118, A61K39/09, A61K39/02, A61K39/295, G01N33/569, A61P31/04, A61P31/12, C07K16/12

Applicant
THE ROYAL VETERINARY COLLEGE

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399-4465

Authorized Officer

Uibrecht, M
Telephone No. +49 89 2399-7710



62

65

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2004/002865

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

68

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2004/002865

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not been furnished:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☒ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

4. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2004/002865

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 16-19,29,32-34,43-48,51 (with respect to IA)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 16-19,29,32-34,43-48,51 (with respect to IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2004/002865

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	9-22,25,26,30,32-37,45-48,51
	No: Claims	1,2,8,23,24,27,29,31,52,54
Inventive step (IS)	Yes: Claims	43,44,53
	No: Claims	1-42,45-52,54
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-15,20-28,30,31,35-42,49,50,52-54
	No: Claims	

- 2. Citations and explanations**
see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

- 1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)**
and /or
- 2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)**
see form 210

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2004/002865

Reference is made to the following documents:

- D1: US-A-5 583 014
- D2: EP-A-1 023 903
- D3: WIDDERS P R ET AL: "Immunisation of mares to control endometritis caused by *Streptococcus zooepidemicus*" RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, vol. 58, no. 1, 1995, pages 75-81
- D4: EP-A-0 415 794
- D5: HECHARD CELINE ET AL: "Protection evaluation against *Chlamydia abortus* challenge by DNA vaccination with a *dnaK*-encoding plasmid in pregnant and non-pregnant mice" VETERINARY RESEARCH (PARIS), vol. 33, no. 3, May 2002 (2002-05), pages 313-326
- D6: "Nobivac Forcat" VETERINARIA NEWS, [Online] 2002, pages 1-6,
- D7: DATABASE PHIN STN; 10 May 2002 (2002-05-10), "Nobivac Forcat in Switzerland"
- D8: US 2003/021801)
- D9: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; March 2001 (2001-03), OBUKHOV I L ET AL: "Development of vaccine against chlamydiosis in cats, dogs and fur-bearing animals" Database accession no. PREV200100271011
- D10: WO 86/02355
- D11: WO 87/00531
- D12: WOLOSZYN S ET AL: "Infectious tracheobronchitis in dogs." MEDYCYN WETERYNARYJNA, vol. 50, no. 9, 1994, pages 428-431
- D13: CHALKER VICTORIA J ET AL: "The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease." VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 1-2, 29 August 2003 (2003-08-29), pages 149-156
- D14: WO 2004/011651

Re Item III:

Claims 16-19 and 32-34 relate to methods of treatment of the human or animal body by therapy. The wording of claims 29, 43-48 and 51 is such that it embraces a

method of treatment of the human or animal body by therapy. Thus claims 16-19, 29, 32-34, 43-48 and 51 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of R. 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Art. 34(4)(a)(i) PCT).

Re item V:

- 1.1 D1 discloses a vaccine comprising enzyme-detergent extracted *S. zooepidemicus* (c. 1, l. 50-51; c. 5, l. 15-24; Example 1; claim 1).
D2 teaches a vaccine comprising life attenuated *S. zooepidemicus* (c. 4, l. 14-16; Example 2; claims 1, 3-5).
D3 discloses a vaccine comprising an antigenic extract of *S. zooepidemicus* (p. 75, c. 1, para. 2 - p. 76, c. 1, para. 4).
D4 teaches a vaccine comprising either *Chlamydia psittaci* or *M. cynos* (p.2. l. 1 - p. 3, l. 19; Example 10; claims 1 and 2).
D5 teaches a vaccine against *Chlamydomydia abortus* comprising its *dnaK* gene (abstract; p. 316, c. 1, para. 2 - c. 2, para.3).
D6 (whole document) and D7 (whole document) teach a vaccine comprising life attenuated *Chlamydomydia felis* (Nobivac Forcat).
D8 discloses vaccines against *C. trachomatis*, *C. psittaci* and *C. pneumoniae* comprising the respective PorB polypeptides (claims 1-18).
D9 teaches a vaccine against Chlamydiosis in dogs comprising inactivated *Chlamydia* (whole document).
As there are no specific features suggested that are required to achieve an immunogenicity in dogs, the vaccines disclosed in D1-D9 are considered to destroy the novelty of claim 1 (Art. 33(2) PCT).
- 1.2 In D1-D9 (supra) the vaccines are used in medicine. Hence, claim 23 lacks novelty over any of D1-D9 (Art. 33(2) PCT).
- 1.3 D6 also discloses a kit comprising the Nobivac Forcat vaccine (c. 4, para. 3). The subject-matter of claim 27, thus, lacks novelty over D6 (Art. 33(2) PCT).
D8 teaches a kit comprising the PorB polypeptide (c. 14, para. 3), thereby destroying

the novelty of claim 27 (Art. 33(2) PCT).

D11 teaches a kit comprising an antigen of *S. zooepidemicus*. As any antigen of *S. zooepidemicus* is considered to be capable of raising an immune response in dogs (p. 15, l. 13 - p. 16, l. 5), the subject-matter of claim 27 lacks novelty over D11 (Art. 33(2) PCT).

Moreover, as the only feature of the kit according to claim 27 is the agent capable of raising an immune response against any one of the microorganisms listed, and as each of D1-D5, D7 and D9 discloses such an agent (cf. V 1.1), the subject-matter of claim 27 also lacks novelty over any of said documents. (Art. 33(2) PCT).

- 1.4 D4 discloses a method of generating a monoclonal antibody directed at *S. zooepidemicus* as well as such an antibody (p. 15, l. 13 - p. 16, l. 5; Example 1; claim 9).

D8 teaches anti-PorB antibodies as well as a method of generating the said (c. 10, para. 3-5; c. 19, para. 4).

D10 teaches monoclonal antibodies to *C. trachomatis* and *C. psittaci* as well as a method of generating the said antibody by hybridoma technology (examples 1-3; claims 1-8).

D11 teaches a monoclonal antibody specific for *S. zooepidemicus* as well as a method of generating the said antibody by hybridoma technology (Example 1; claim 9).

Hence, the subject-matter of claims 29 and 31 is anticipated by D4, D8, D10 and D11 (Art. 33(2) PCT).

- 1.5 D3 discloses an ELISA for the detection of antibodies generated against *S. zooepidemicus* upon vaccination of mares with a bacterial preparation of *S. zooepidemicus*. In said ELISA the said preparation is coated onto microtiter plates and bound antibodies are detected by a sandwich assay involving a detectable label conjugate which binds to antibodies bound to the microtiter plate (p. 76, c. 2, last para.).
- D5 teaches an ELISA for the detection of DnaK-directed antibodies, wherein DnaK is immobilised to a support and peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies are used to detect the binding of antibodies contained in the sample to the immobilised DnaK (p. 317, c. 1, para. 2).

D8 teaches a sandwich immunosorbent assay for the detection of PorB-directed antibodies wherein PorB is immobilised to a solid support and labelled secondary antibodies are used to detect antibodies bound to the immobilised PorB (c. 11, para. 3 - c. 14, para. 1).

The disclosures of D3, D5 and D8 are thus prejudicial to the novelty of claims 52 and 54 (Art. 33(2) PCT).

- 1.6 D1-D3 (supra) disclose the additional feature suggested by claim 2 and 24. Moreover, the additional features according to claim 8 are also disclosed in D1 (supra) and D3 (supra). D4 (supra) teaches the additional features suggested by claims 3, 5, 8 and 24. D5 (supra) discloses the additional features suggested by claims 4 and 24. The additional features according to claims 5, 6 and 24 are disclosed in D6 (supra) and D7 (supra). D8 (supra) teaches the additional features suggested by claims 5 and 7. D9 (supra) discloses the additional features proposed by claims 24 and 25. Thus, claims 2-8, 24 and 25 do not establish novelty over the prior art (Art. 33(2) PCT).
- 1.7 The subject-matter of claims 9-22, 26, 28, 30, 32-51 and 53 is novel as the prior art does not disclose the combination of features suggested by any of these claims 8 (Art. 33(2) PCT).
- 2.1 The description only teaches an association of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* and positive *Chlamydia* PCR with CIRD. No support is provided for any prophylactic/therapeutic effect of a vaccine comprising an agent capable of raising an immune response against any of these organisms in dogs which would be the basis for acknowledging the problem of vaccinating a dog against CIRD or of treating CIRD in a dog using said vaccine as being solved. Hence, the subject-matter of claims 16 and 17 is not considered to involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).
- 2.2 For similar considerations (cf. V 2.1) also the subject-matter of claims 20, 21, 32, 33, 35, 36 and 40 is not considered to involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).

- 2.3 The combination of antibodies suggested by claim 38 is a mere juxtaposition of known antibodies (cf. V 1.4) which do not have any non-obvious inter-relationship and whose inclusion into a single composition, thus, does not establish an inventive step (Art. 33(3) PCT).
- 2.4 For these considerations (cf. V 2.3) also dependent claim 39 is not considered inventive (Art. 33(3) PCT).
- 2.5 D12 teaches an association of CIRDC with *M. cynos* (p. 428, c. 1, para. 1; p. 429, c. 1, para. 1). Based on this teaching and in applying routine experimentation the skilled person would devise a method of determining whether a dog has CIRDC by identifying the said microorganism in a sample from the dog. Thus, claim 45 is not considered to involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).
- 2.6 The subject-matter of claim 18 differs from e.g. D3 in that an immune response is stimulated in dogs and not in mares. There is no support for said stimulation to have a technical effect, namely of preventing, curing or alleviating CIRDC in dogs (cf. V 2.1). Therefore, the selection of dogs for immunisation is considered arbitrary and does not establish an inventive step (Art. 33(3) PCT).
- 2.7 As there is also no support for an agent according to claim 9 to induce an immune response protective against or curative for CIRDC, the same considerations as under V 2.1 lead to the conclusion that this claim does not involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).
- 2.8 For the considerations formulated under V 2.1, 2.2 and 2.7, also the subject-matter of claims 10-15, 22, 26, 34, 41 and 42 is not considered inventive (Art. 33(3) PCT).
- 2.9 The method of claim 30 is a routine modification of the methods of generating an antigen-specific mAb as suggested by any of D4, D10 and D11 (cf. V 1.4) which does not result in any unforeseeable technical effect, and which, thus, does not establish an inventive step (Art. 33(3) PCT).
- 2.10 In view of the arguments given under V 2.1, 2.6 and 2.7 the kit according to claim 28

relates to an arbitrary juxtaposition of components which do not show any non-obvious inter-relationship. Hence, said claim does not involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).

2.11 The additional features suggested by claims 46, 47, 49 and 51 are a matter of routine experimentation and do not produce any unforeseeable technical effect and, therefore, do not establish an inventive step (Art. 33(3) PCT).

2.12 The additional features suggested by claims 48 and 50 have no limiting effect with respect to the alternative in the antecedent relating to *M. cynos* and thus do not establish an inventive step over D12 (cf. V 2.5 and 2.11)(Art. 33(3) PCT).

2.13 The subject-matter of claim 43 solves the problem of determining whether a dog has been exposed to CIRDC-associated *Chlamydia*. The solution involves identifying in a sample from the dog a CIRDC-associated *Chlamydia* species or an antibody thereto. This method is based on the observed association of CIRDC with certain *Chlamydia* species which is not suggested by the prior art. Hence, the subject-matter of claim 43 involves an inventive step (Art. 33(3) PCT).

2.14 Claim 53 suggests an immunosorbent assay comprising a solid phase comprising antigens of at least two of *S. zooepidemicus*, *M. cynos* and *Chlamydia* associated with CIRDC. This solid phase solves the technical problem of increasing the sensitivity of detecting antibodies associated with CIRDC. D12 teaches only the association of *M. cynos* with CIRDC. The skilled person would not have an incentive to immobilise any of the other two antigens. Claim 53 is, therefore, considered to involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).

2.15 The considerations of V 2.13 also apply to dependent claim 44 (Art. 33(3) PCT).

3.1 For the assessment of the present claims 16-19, 29, 32-34, 43-48 and 51 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may

allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

- 3.2 The subject-matter of claims 1-15, 20-28, 30, 31, 35-42, 49, 50 and 52-54 is considered to be industrially applicable (Art. 33(4) EPC).
- 4.1 Claims 1-7, 9-15, 18-23, 26-28, 40-42 and 52 do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved ("agent capable of raising an immune response against ..."), which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. It cannot be determined which compounds fall under the said functional definition.
- 4.2 Also in claim 43 the subject-matter is considered to be defined in terms of a result to be achieved ("a Chlamydomonas species associated with CIRD"), thereby creating unclarity (Art. 6 PCT).
- 4.3 Whereas, the introductory part of claim 52 appears to relate to a method, the technical features proposed refer to a device. This inconsistency renders the category of said claim unclear (Art. 6 PCT)

Re Item VI:

Should the priority of the present application not be valid, the D13 and D14 would be relevant with respect to novelty and inventive step (Art. 33(2) and (3) PCT).

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

COMPOSICIÓN DE VACUNA PARA VACUNAR PERROS CONTRA
ENFERMEDAD RESPIRATORIA INFECCIOSA CANINA (CIRD)

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

Una composición de vacuna para vacunación de perros que comprende cualesquiera uno o más de (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *Streptococcus equi sub especies zooepidemicus* en un perro, (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra
10 *Mycoplasma cynos* en un perro, y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* en un perro.

15

20

COMPOSICIÓN DE VACUNA PARA VACUNAR PERROS CONTRA
ENFERMEDAD RESPIRATORIA INFECCIOSA CANINA (CIRD)

MEMORIA DESCRIPTIVA

5

La presente invención se refiere a una composición de vacuna, y en particular a una composición de vacuna para uso contra una enfermedad respiratoria infecciosa canina.

La enfermedad respiratoria infecciosa canina (CIRD) es una
10 enfermedad altamente contagiosa común en perros alojados en condiciones de hacinamiento tal como en centros de re-alojamiento y perreras de hospedaje o entrenamiento. Muchos perros padecen solamente de una tos leve y se recuperan después de un tiempo corto, sin embargo en algunos casos se puede desarrollar una bronconeumonía severa (Appel y Binn, 1987).
15 La CIRD raramente es fatal pero retrasa el re-alojamiento de perros en centros de rescate y ocasiona la desorganización de programas en perreras para entrenamiento así como considerables costos de tratamiento.

Se considera que la patogénesis de la CIRD es multifactorial, implicando diversos virus y bacterias. Los agentes infecciosos que se
20 considera que son los patógenos causales principales de la CIRD son el parainfluenzavirus canino (CPIV)- (Binn et al, 1967), adenovirus canino tipo 2 (CAV-2) (Ditchfield et al, 1962), y herpesvirus canino (CHV) (Karpas et al, 1968a y 1986b), coronavirus respiratorio canino (CRCV) (WO 2004/011651

(The Royal Veterinary College) y Erles et al, 2003) y la bacteria *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (Bernis et al, 1977a, Keil et al, 1998).

Estos virus y bacteria frecuentemente han sido aislados durante epidemias y se ha demostrado que ocasionan los síntomas respiratorios o las lesiones pulmonares en infecciones experimentales (Appel y Percy 1970, Swango et al, 1970, Karpas et al, 1986b).

También, el reovirus de humano y las especies de micoplasma se han aislado a partir de perros con síntomas de CIRDC (Lou y Wenner 1963, Randolph et al, 1993) También pueden ser importantes factores adicionales como el estrés.

B. bronchiseptica se reportó como que es un agente etiológico principal en la enfermedad respiratoria "tos de perrera" (Bernis et al, 1977b y Thompson et al, 1976). Esta predispone a los perros a la influencia de otros agentes respiratorios y frecuentemente existe concurrentemente con éstos. La tos de perrera se puede reproducir mediante prueba con *B. bronchiseptica* virulenta. Además, los factores ambientales tales como frío, corrientes de aire, y humedad elevada, frecuentemente condiciones típicas en perreras, incrementan la susceptibilidad a la enfermedad (Ellis et al, 2001). Generalmente se reconoce que los antibióticos son agentes poco efectivos para el tratamiento de la enfermedad primaria (Ellis et al, 2001). En contraste, la inmunoprofilaxis para la *B. bronchiseptica* provee un método relativamente efectivo para ayudar en el control de la enfermedad.



El signo sobresaliente de la infección por *B. bronchiseptica* es una tos áspera, seca, la cual se agrava por la actividad o la excitación. La tos se presenta en paroxismos, seguida por arqueadas o náuseas en intentos para aclarar pequeñas cantidades de moco a partir de la garganta. La temperatura corporal se puede elevar conforme toma lugar la invasión bacteriana secundaria. Debido a que la tos de perrera es altamente contagiosa, la enfermedad se puede transmitir fácilmente a los perros susceptibles y produce una tos severa. Los signos más severos son evidentes iniciando a los dos a cinco días después de la infección, pero pueden continuar por periodos extendidos. El estrés, particularmente de las condiciones ambientales adversas, puede ocasionar recaídas durante etapas posteriores de la enfermedad.

La tos de perrera típicamente es una condición de las vías respiratorias superiores y se caracteriza por descarga nasal y tos. Mientras que la tos de perrera implica cambios principalmente en el tracto respiratorio superior, la patología de la CIRD indica que está implicada en el daño pulmonar y, en algunos casos, en la bronconeumonía. La tos de perrera es un síndrome más leve que la CIRD y no tiene el amplio rango de patología evidenciado en la CIRD. La CIRD también se distingue por una severidad y mortalidad incrementadas.

La CIRD es un síndrome en perros el cual se presenta con signos respiratorios que tienen un intervalo de enfermedad de ligera a fatal. Se caracteriza por la participación de las vías aéreas superiores e inferiores

en la infección con progresión de la inflamación a la patología exudativa, edematosa y algunas veces hemorrágica la cual se puede extender en los tejidos pulmonares. La CIRDA también se puede presentar en la ausencia de *B. bronchiseptica*, y de hecho algunos perros contraen la CIRDA a la vez que no tienen *B. bronchiseptica* detectable, lo cual indica que la tos de perrera y la CIRDA son infecciones distintas.

Nosotros también hemos confirmado la asociación de *B. bronchiseptica* con la enfermedad respiratoria a la vez que se concluyó que otros agentes participan en la enfermedad respiratoria (Chalker et al, 2003).

10 Los inventores han demostrado que *Streptococcus equi sub especies zooepidemicus* (véase el ejemplo 1), *Mycoplasma cynos* (véase el ejemplo 2), y una *Chlamydia* (véase el ejemplo 3) están asociadas con CIRDA. Puesto que todos los perros en nuestras poblaciones de estudio se vacunaron contra CPV y CAV-2, nosotros no tenemos datos novedosos para
15 apoyar la participación de estos virus en la CIRDA. Sin embargo nosotros también hemos encontrado un incremento en la prevalencia de herpesvirus canino en perros con síntomas respiratorios más severos (véase el ejemplo 4).

Streptococcus equi sub especies zooepidemicus (*S. zooepidemicus*) es un patógeno oportunista el cual frecuentemente se aísla a partir de una variedad de animales hospederos, no solamente a partir de caballos. Frecuentemente se encuentra como un comensal de la mucosa del tracto respiratorio superior de mamíferos (Timoney et al, 1988; Quinn et al,

1999) y se ha asociado con diversos síndromes de enfermedad incluyendo enfermedad de vías aéreas inferiores, neumonía fetal y cervicitis en caballos (Chanter, 1997; Biberstein y Hirsh, 1999), neumonía en llamas (Biberstein y Hirsh, 1999), septicemia y artritis en cerdos (Timoney, 1987), mastitis en vacas y cabras (Timoney et al, 1988), septicemia en aves de corral, pericarditis y neumonía en corderos (Timoney, 1987), linfadenitis en conejillos de Indias (Quinn et al, 1999), glomerulonefritis en humanos (Balter et al, 2000) y meningitis en humanos (Ural et al, 2003). En perros *S. zooepidemicus* ha sido asociada en infecciones de heridas y septicemia (Quinn et al, 1999) y neumonía hemorrágica necrosante aguda (Garrett et al, 1982).

Aunque los perros en las últimas etapas de neumonía estreptococal hemorrágica (HSP) comparten algunas características histológicas con perros con CIRDC, este no es el caso en sus etapas tempranas (véase Chalker et al, 2003) y los trombos sépticos están presentes en HSP (Garrett et al, 1982). La HSP tiene un inicio rápido que fue fatal en la mayoría de los casos sin signos clínicos, mientras que con CIRDC nosotros observamos un inicio lento con un enorme intervalo de signos clínicos a partir de la descarga nasal, tos, estornudos, náuseas, inapetencia, neumonía y bronconeumonía.

Mycoplasma cynos (*M. cynos*) ha sido asociado con infección del tracto urinario canino (Jang et al, 1984). También se ha identificado en los pulmones de un perro con la enfermedad (Rosendal, 1978), y se encontró que

la inoculación endobronquial de *M. cynos* induce la neumonía en perros (Rosendal & Vinther, 1977).

El desarreglo canino descrito por Rosendal (1978) es una enfermedad compleja siguiendo a la infección con virus del desarreglo canino, diversas especies de micoplasma y la bacteria *Pseudomonas*. Esta es una combinación poderosa de pruebas microbianas y, no sorprendentemente, resulta en neumonía. La proporción de patología debido a la *Mycoplasma spp.* no fue evidente. La prueba subsecuente con *M. cynos* no se caracterizó por signos de enfermedad en los perros aunque algunas lesiones inflamatorias pequeñas locales se evidenciaron en 4 de los 5 perros inoculados. La importancia de *M. cynos* en este síndrome fue, como Rosendal estableció, "difícil de evaluar".

Las especies *Chlamydophila* asociadas con CIRD están muy cercanamente relacionadas con *Chlamydophila abortus* (*C. abortus*) mediante la comparación de una secuencia de 218 nucleótidos en el gene de ARNr 23 S. La secuencia nucleotídica de esta región en estas especies de *Chlamydophila* (SEQ ID NO: 1) es mayor de 99% idéntica a aquella de *C. abortus*, 98.6% idéntica a *Chlamydophila psittaci* y 96.3% idéntica a *Chlamydophila felis*.

Las especies *Chlamydophila* se identificaron en la tráquea y pulmones de perros con CIRD. En contraste, la infección con *C. abortus* que típicamente está asociada con trastornos reproductivos, frecuentemente lleva

a aborto no deseable, específicamente en ovejas. *C.abortus* no se ha descrito previamente como que tenga un papel en la infección respiratoria en perros.

Existen muy pocas publicaciones con respecto a las especies *Chlamydiae* que infectan a los perros, y por lo tanto se sabe muy poco acerca de la biodiversidad de especies *Chlamydiae* caninas. Recientemente, *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) ha sido asociada con aterosclerosis en perros (Sako et al, 2002). Una *Chlamydophila spp* no identificada también ha sido identificada en un perro con poliartritis séptica (Lambrechts et al, 1999).

10 *C. psittaci* se ha aislado previamente a partir de heces, cerebro, hígado, bazo, riñón y tejido pulmonar de perros caseros (Arizmendi et al, 1992; Fraser et al, 1985 y Gresham et al, 1996). Los estudios han demostrado que 20% de la población de mascotas caninas en Alemania y 10% en Japón han sido expuestas y han generado anticuerpos a *Chlamydiaceae* (Werth et al, 1987 y Fukushi et al, 1985). La prevalencia de perros seropositivos a *C. psittaci* en el Reino Unido es desconocida (Gresham et al, 1996.). Los perros infectados con *C. psittaci* pueden desarrollar infecciones crónicas sub-clínicas, aterosclerosis, artritis, conjuntivitis o incluso la enfermedad respiratoria (Gresham et al, 1996 y Storz 1988). Gresham et al, (1996) aislaron *C. psittaci* a partir de un perro con síntomas de la enfermedad respiratoria aunque estos síntomas no fueron tan severos como aquellos en CIRD. Se ha sugerido que los perros pueden ser reservorios potenciales y, por lo tanto, importantes en la epidemiología de infecciones por *Chlamydiae* en el humano (Gresham et al, 20

1996; Werth 1989). Existe solamente un caso documentado de aislamiento en cultivo celular de *C. psittaci* a partir de un perro naturalmente infectado (Arizmendi et al, 1992), y un caso de aislamiento a partir de perros experimentalmente infectados (Young et al, 1972).

5 Las vacunas están disponibles contra algunos de los agentes infecciosos asociados con CIRD, es decir *B. bronchiseptica* así como CPIV y CAV-2. Sin embargo, a pesar del uso de estas vacunas, la CIRD aún es prevalente en perreras a nivel mundial, lo cual es posible debido a que las vacunas no proveen protección contra todos los agentes infecciosos
10 implicados en la CIRD.

Por lo tanto un primer aspecto de la invención provee una composición de vacuna para vacunación de perros que comprende cualquiera o más de:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
15 perro contra *S. zooepidemicus*;

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *M. cynos*; y

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*.

20 Se aprecia que la composición puede contener cualquiera de dos de estos agentes, por ejemplo (a) y (b), (a) y (c), o (b) y (c). La composición puede contener los tres de estos agentes (a), (b) y (c).

Por un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra un organismo particular, nosotros incluimos el significado de que, cuando se administra a un perro el cual no está inmunocomprometido o está inmunodeprimido, el agente induce al sistema inmune del perro para producir anticuerpos los cuales se unen específicamente al organismo. Por lo tanto el agente es capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra el organismo particular.

Por lo tanto, preferiblemente, el anticuerpo producido específicamente se une al organismo particular con una mayor afinidad que para cualquier otra molécula en el individuo. Preferiblemente, el anticuerpo se une al organismo particular con al menos 2, o al menos 5, o al menos 10 o al menos 50 veces mayor afinidad que para cualquier otra molécula en el individuo. Más preferiblemente, el anticuerpo se une al organismo particular con al menos 100, o al menos 1,000, o al menos 10,000 veces mayor afinidad que para cualquier otra molécula en el individuo.

Por un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra un organismo particular, nosotros también incluimos el significado de que, cuando se administra a un perro el cual no está inmunocomprometido o está inmunodeprimido, el agente induce al sistema inmune del perro para producir anticuerpos los cuales se unen específicamente a las macromoléculas tales como proteínas que se secretan a partir del organismo. Los anticuerpos se podrían unir específicamente a las macromoléculas secretadas, tales como una toxina o hemolisina, y las inactivan, por lo tanto

reduciendo las pruebas patogénicas en el hospedero y la severidad de la enfermedad, por lo tanto permitiendo que el hospedero supere la infección. Por lo tanto, por un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra un organismo particular nosotros incluimos agentes los cuales son capaces de generar una respuesta inmune a una parte del organismo tal como una molécula secretada.

Típicamente, un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro comprende *S. zooepidemicus* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento o dicho derivado (en cuyo caso dicho fragmento o dicho derivado comprende un polipéptido).

Streptococcus equi sub especies zooepidemicus se ha depositado en NCTC (No. de depósito 4676.S34), la ATCC (No. de depósito 43079) y the National Collection of Dairy Organisms (NCDO) (No. de depósito 1358), y se describe por Farrow et al (1984).

Por un componente "inactivado" de una vacuna nosotros incluimos el significado de que el componente de vacuna particular, tal como una bacteria, micoplasma o virus, ha sido tratado de tal manera que se elimina su capacidad para ocasionar la enfermedad, pero aún así retiene su capacidad para evocar inmunidad protectora. Por un componente de vacuna "inactivado" nosotros incluimos un organismo eliminado.

Los métodos para inactivar y eliminar organismos tales como bacterias, micoplasma y virus para uso en una vacuna se conocen bien en la

técnica, y han sido utilizados, por ejemplo, en la preparación de algunos de los componentes para las vacunas para perro que se describen a continuación.

Existen diversos métodos para inactivar micro-organismos para preparaciones de vacuna. El método más simple es la eliminación mediante calentamiento (por ejemplo, calentamiento de virus a 58°C por 30 minutos; ebullición de la bacteria por 5 minutos o calentamiento a 65°C por 1 hora) o eliminación mediante mezclado con formalina. Usted también puede eliminar micro-organismos con un intervalo de otros químicos, o mediante tratamiento con luz UV.

10 Por un componente "atenuado" de una vacuna nosotros incluimos el significado de que el componente de vacuna particular, tal como una bacteria, micoplasma o virus, ha sido seleccionado o se ha tratado de otra manera de tal manera que disminuye en gran medida su capacidad para ocasionar la enfermedad pero aún así retiene su capacidad para evocar
15 inmunidad protectora.

Los métodos para atenuar organismos tales como bacterias, micoplasma y virus para uso en una vacuna se conocen bien en la técnica, y han sido utilizados, por ejemplo, en la preparación de algunos de los componentes para las vacunas para perro que se describen a continuación.

20 Usted puede atenuar los microorganismos mediante el paso prolongado en un dispositivo diferente - por ejemplo cultivo celular para virus o *Chlamydomphila*, y sobre medio sólido o un hospedero diferente para bacteria, hasta que sea evidente una declinación en la virulencia. Alternativamente

usted puede mutar puntualmente o deletar genes en bacterias las cuales están implicadas en la virulencia, por lo tanto limitando el potencial patogénico del organismo, o mutando el organismo de manera que éste tiene un requerimiento específico para un quílmico que no está presente en el animal

5 hospedero y por lo tanto no se puede multiplicar y sobrevivir una vez en el hospedero. La atenuación también se puede llevar a cabo en las bacterias con tratamiento quílmico y el tratamiento con luz UV para ocasionar mutaciones puntuales en el genoma.

Un fragmento Inmunogénico de *S. zooepidemicus* puede ser

10 cualquier fragmento de *S. zooepidemicus* capaz de generar una respuesta inmune protectora en un perro. Por lo tanto cuando un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* se administra a un perro el cual no está inmunocomprometido o está inmunosuprimido, induce al sistema inmune del perro para producir anticuerpos los cuales se unen específicamente a *S.*

15 *zooepidemicus*.

Típicamente, el fragmento inmunogénico de un organismo particular es un componente proteico de ese organismo. Por un "componente protéico" de un organismo nosotros incluimos el significado de una proteína total, o una porción de una proteína. Se aprecia que el fragmento protéico

20 puede o no estar glicosilado. Por lo tanto por "proteína" nosotros también incluimos glicoproteína. La secuencia de aminoácidos de una glicoproteína se refiere a la secuencia de aminoácidos de la estructura base del polipéptido de

la glicoproteína, sin importar el tipo, número, secuencia y posición de los azúcares unidos a la misma.

Las proteínas de *S. zooepidemicus* incluyen los precursores de proteína de superficie celular (Números de Acceso Genbank AAA86832 y
 5 BAD00711), Cpn60 (Número de Acceso Genbank AAM88472), proteína semejante a M (Números de Acceso Genbank AAP33082, AAP33081, AAP33080, AAP33079, AAP22285, AAB92635, AAB92634, AAB92633, AAB92632, AAB92631, AAB92630, AAB92629, AAB92628, AAB92627, AAB92626, AAB92625, AAB92624, AAB92623, AAB92622, 2111310A y
 10 BAD00712), precursor de proteína semejante a M (Número de Acceso Genbank AAD37432), precursor de proteína semejante a M Szp2 (Número de Acceso Genbank AAF75674), precursor de proteína semejante a M Szp3 (Número de Acceso Genbank AAF75675), precursor de proteína semejante a M Szp4 (Número de Acceso Genbank AAF75676), la proteína similar a
 15 *Streptococcus pneumoniae* ORF5 (Número de Acceso Genbank BAB16041), la proteína de unión/adhesina de metal putativa (Número de Acceso Genbank CAB56710), factor de inmunidad zoocin A (Número de Acceso Genbank AAC46073) y las proteínas Szp descritas por Walker et al (1998, 2003; incluyendo los Números de Acceso Genbank AAQ08488-AAQ08510).

20 Preferiblemente, el fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus*, es una proteína estructural de *S. zooepidemicus* o una porción inmunogénica de la misma. Más preferiblemente, el fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* es una toxina secretada, o hemolisina, o

una proteína de adhesión/proteína de superficie, o una porción inmunogénica de la misma.

Las proteínas de superficie adicionales se pueden aislar a partir de una bacteria tal como *S. zooepidemicus* mediante métodos estándares que se conocen por una persona experta en la técnica. Sambrook et al (2001) "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", 3a edición, Sambrook et al (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EUA, incorporado en la presente invención como referencia, describe técnicas de clonación bacteriana general que podrían ser utilizadas para este propósito.

10 Si el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro es un componente de un organismo, tal como una proteína, se puede aislar a partir de un cultivo del organismo. Más preferiblemente, las proteínas se elaboran mediante la expresión de una construcción de ADN adecuada que codifica la proteína utilizando tecnología de ADN recombinante.

15 Las técnicas adecuadas para clonación, manipulación, modificación y expresión de ácidos nucleicos, y purificación de proteínas expresadas, se conocen bien en la técnica y se describen por ejemplo en Sambrook et al (2001), incorporado en la presente invención como referencia.

Alternativamente, las proteínas se pueden elaborar utilizando técnicas de química de proteínas por ejemplo utilizando proteólisis parcial de proteínas asociadas (ya sea exolíticamente o endolíticamente), o mediante síntesis *de novo*. Los péptidos se pueden sintetizar mediante el modo de

20

Fmoc-poliámida de síntesis de péptido en fase sólida como se describió por Lu et al (1981) J. Org. Chem. 46, 3433 y referencias en la presente invención.

Por "un derivado" de un fragmento inmunogénico de un organismo nosotros incluimos el significado de una proteína, o porción de una
5 proteína, la cual ha sido modificada a partir de la forma en la cual ésta se presenta naturalmente en ese organismo, pero la cual retiene la capacidad de generar una respuesta inmune en un perro, tal como la capacidad de inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a ese organismo.

Por ejemplo, un derivado puede incluir una variante de secuencia
10 de la proteína o porción de la misma la cual se puede utilizar para inducir la producción de anticuerpos los cuales se unen específicamente a ese organismo. Típicamente, las sustituciones de aminoácidos se elaboran para mejorar la antigenicidad de la vacuna. Preferiblemente, la secuencia variante es al menos 90%, o al menos 91%, o al menos 92%, o al menos 93%, o al
15 menos 94%, o al menos 95% idéntica a la secuencia nativa de esa proteína o porción de la misma. Más preferiblemente, la secuencia variante es al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos 99%, o al menos 99.5% idéntica a la secuencia nativa de esa proteína o porción de la misma.

La identidad de secuencia porcentual entre dos polipéptidos se
20 puede determinar utilizando programas de cómputo adecuados, por ejemplo el programa GAP de the University de Wisconsin Genetic Computing Group. El porcentaje de identidad entre dos nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando GCG versión 10 (Genetics

Computer Group, (1991), Program Manual for the GCG Package, Versión 7, Abril 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711). Los parámetros GCG utilizados pueden ser: sanción por creación de espacio 50, sanción por extensión de espacio 3 para ADN, y sanción por creación de espacio 8 y sanción por extensión de espacio 2 para proteína. El porcentaje de identidad entre dos nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando FASTA versión 34 (Pearson WR. (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA". Methods Enzymol.; 183: 63-98). Las determinaciones FASTA pueden ser sanción por espacio abierto -16 y sanción por extensión de espacio -4.

Se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula con relación a los polipéptidos cuyas secuencias se han alineado óptimamente.

El alineamiento se puede llevar a cabo de manera alternativa utilizando el programa Clustal W (Thompson et al., (1994) Nucleic Acids Res 22, 4673-80). Los parámetros utilizados pueden ser los siguientes:

Parámetros de alineamiento rápido par a par: tamaño de K-tuple (palabra); 1, tamaño de ventana; 5, sanción por espacio; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de evaluación: x porcentual.

Parámetros de alineamiento múltiple: sanción por espacio abierto; 10, sanción por extensión de espacio; 0.05. Matriz de evaluación: BLOSUM.

Típicamente, la secuencia variante tiene menos de 100, o menos de 50, o menos de 40, o menos de 30, o menos de 20 residuos de

aminoácidos diferentes de la secuencia nativa de esa proteína o porción de la misma. Más preferiblemente, la secuencia variante tiene 15 o 14 o 13 o 12 u 11 o 10 o 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o solamente 1 residuo de aminoácidos diferente de la secuencia nativa de esa proteína o porción de la misma.

5 La secuencia del derivado puede haber sido alterada para mejorar la inmunogenicidad del agente, o puede no tener efecto sobre su inmunogenicidad. Por ejemplo, el derivado puede haber tenido una o más secuencias de aminoácidos que no son necesarias para remover la inmunidad.

10 Por "derivado" nosotros también incluimos péptidos en los cuales uno o más de los residuos de aminoácidos están químicamente modificados, antes o después de que el péptido se sintetice, con la condición de que la función del péptido, es decir la producción de anticuerpos específicos *in vivo*, permanezca sustancialmente sin cambio. Dichas modificaciones incluyen la

15 formación de sales con ácidos o bases, especialmente ácidos y bases orgánicas o inorgánicas fisiológicamente aceptables, que forman un éster o amida de un grupo carboxilo terminal, y uniendo grupos protectores del aminoácido tal como N-t-butoxicarbonilo. Dichas modificaciones pueden proteger al péptido del metabolismo *in vivo*. Los péptidos pueden estar

20 presentes como copias particulares o como múltiples, por ejemplo repetidos en tándem. Dichos repetidos en tándem o múltiples pueden ser lo suficientemente antigénicos por si mismos para obviar el uso de un vehículo. Puede ser ventajoso para el péptido a ser formado como un asa, con los

extremos N-terminal y C-terminal unidos, o añadir uno o más residuos Cys a un extremo para incrementar antigenicidad y/o para permitir que se formen enlaces disulfuro. Si el péptido está covalentemente asociado a un vehículo, preferiblemente un polipéptido, entonces el arreglo preferiblemente es tal que el péptido de la invención forma un asa.

De conformidad con las teorías inmunológicas actuales, una función del vehículo debe estar presente en cualquier formulación inmunogénica con el objeto de estimular, o mejorar la estimulación de, el sistema inmune. Se piensa que los mejores vehículos incluyen (o, junto con el antígeno, crea) un epítipo de célula T. Los péptidos se pueden asociar, por ejemplo mediante entrecruzamiento, con un vehículo separado, tales como albúminas de suero, mioglobinas, toxoides bacterianos y hemocianina de lapa herradura. Los vehículos desarrollados más recientemente los cuales inducen que la célula T auxilie en la respuesta inmune incluyen el antígeno núcleo de la hepatitis B (también denominado la proteína de nucleocápside), supuestos epítopes de célula T, beta-galactosidasa y el péptido 163-171 de interleucina-1. El último compuesto se puede observar de diversas maneras como un vehículo o como un adyuvante o como ambos. Alternativamente, se pueden entrecruzar varias copias de los mismos péptidos o de péptidos diferentes de la invención entre sí; en esta situación no existe un vehículo separado como tal, sino que se puede proveer una función del vehículo mediante dicho entrecruzamiento. Los agentes entrecruzadores adecuados incluyen aquellos listados como tal en los catálogos Sigma and Pierce, por ejemplo

glutaraldehído, carbodiimida y succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, el último agente que explota el grupo SH en el residuo de cisteína C-terminal (si está presente).

Si el péptido se prepara mediante la expresión de una secuencia
5 nucleotídica adecuada en un hospedero adecuado, entonces puede ser ventajoso expresar el péptido como un producto de fusión con una secuencia peptídica la cual actúa como un vehículo. El sistema de Kabigen's "Ecosec" es un ejemplo de dicho arreglo.

Típicamente, el polinucleótido que codifica la fracción
10 inmunogénica de *S. zooepidemicus* codifica una proteína estructural, y más preferiblemente una proteína de superficie de *S. zooepidemicus*, o una porción inmunogénica de la misma, o un derivado del mismo. Las secuencias de polinucleótidos que codifican diversas proteínas de *S. zooepidemicus* se pueden evaluar fácilmente como referencia a los Números de Acceso
15 Genbank anteriormente mencionados. Sin embargo, la secuencia de un polinucleótido que codifica cualquier proteína inmunogénica de *S. zooepidemicus* se puede determinar fácilmente mediante técnicas estándares de biología molecular.

Típicamente, un agente capaz de generar una respuesta inmune
20 contra *M. cynos* en un perro comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

Mycoplasma cynos se ha depositado en NCTC (No. de depósito 10142 H831) y en la ATCC (No. de depósito 27544) y se describe por Rosendal (1972).

Preferiblemente, el fragmento inmunogénico de *M. cynos* es una
5 proteína estructural de *M. cynos* o una porción inmunogénica de la misma, y
más preferiblemente, una proteína de superficie de *M. cynos* o una porción
inmunogénica de la misma o un derivado del mismo. Las proteínas de
superficie se pueden aislar a partir de un micoplasma tal como *M. cynos*
mediante métodos estándares que se conocen por una persona experta en la
10 técnica.

Los métodos para identificar y aislar proteínas de micoplasma
generalmente son los mismos que para las bacterias excepto que algunos
genes pueden requerir vectores especializados que reconocen el uso de
codón único de micoplasmas (véase todos los capítulos en la Sección B, en
15 Genome Characterisation and Genetics, in Molecular and Diagnostic
Procedures in Mycoplasma. Vol. 1 Ed S. Razin & J. Tully. Academic Press
Inc. 1995.)

Las vacunas más eficientes de micoplasma tienden a contener
una vacuna de célula total o de célula viva atenuada inactivada con calor o
20 inactivada con formalina, y por lo tanto contiene todos, o al menos la mayoría,
de sus proteínas. Los componentes potenciales de micoplasma para uso
como vacunas incluyen proteínas de tal manera que se cree que la proteína
membranal primaria con estructura de unión, es de aproximadamente 45 kDA

(equivalente a la P1 citadhesina a partir de *M. pneumoniae* y homólogos tal como MgPa a partir de *M. genitalium* todas las cuales son parte de un operón de tres genes), proteínas expuestas en la superficie y otras proteínas de unión, glicolípidos de membrana, fracción de polisacárido membranal, lipoglicanos y todas aquellas mencionadas en las revisiones de vacunas de micoplasma animal (Barile 1985 y Barile et al, 1985).

En una modalidad, el agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* comprende *C. abortus* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *C. abortus* o un derivado de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

Chlamydophila abortus (ATCC No. de depósito VR-656) se depositó por Everett et al como clamidial de aborto cepa B-577 de ovino.

En otra modalidad, el agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* comprende *C. psittaci* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *C. psittaci* o un derivado de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

Chlamydophila psittaci, también conocida como *Chlamydia psittaci*, tiene el ATCC No. de depósito VR-125 (Lillie (1930) página 1968, Int. J. Syst. Bacteriol. 30:274 (AL)).

En una modalidad adicional, el agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* comprende *C. felis* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *C. felis* o un derivado de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

Chlamydophila felis (ATCC No. de depósito VR-120) se depositó por Everett et al como pneumonitis cepa No. 1 de felino.

En otra modalidad, el agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* comprende *Chlamydia muridarum* inactivada o atenuada (ATCC VR 123, MoPn; Everett et al, 1999, Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 431); *Chlamydia pecorum* (ATCC VR 628, Bo/E58; Fukushi y Hirai 1992, Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 307); *Chlamydia pneumoniae* (Cepa tipo: TW-183; Grayston et al, 1989, Int. J Syst. Bacteriol. 39: 88); *Chlamydia suis* (ATCC VR 1474, S45; Everett et al, 1999, Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 431); o *Chlamydia trachomatis* (especies tipo) (ATCC VR 571; Busacca 1935 Rake 1957 modificada por Everett et al, 1999, Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 274 (AL), o un fragmento inmunogénico de los mismos, o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

Un fragmento inmunogénico de *C. abortus*, *C. psittaci* o *C. felis*, o de *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*, puede ser cualquier fragmento de los mismos capaz de generar una respuesta inmune protectora en un perro. Típicamente el fragmento inmunogénico es una proteína o una porción de la misma. Preferiblemente, el fragmento inmunogénico es una proteína estructural o una porción inmunogénica de la misma. Más preferiblemente, el fragmento inmunogénico es una proteína de superficie, o una porción inmunogénica de la misma o un derivado del mismo. Como se mencionó anteriormente, las proteínas de superficie se pueden aislar

a partir de una bacteria tal como *Chlamydomophila* mediante métodos estándares que se conocen por una persona experta en la técnica.

Las proteínas de *C. abortus* incluyen la proteína de choque térmico de 60 kD GroEL (Número de Acceso Genbank AAD26144), proteína
5 del complejo de membrana rica en cisteína de 60 kDa (Número de Acceso Genbank AAG60550), proteína de 90 kDa (Números de Acceso Genbank AAC44400, AAC44401), proteína de membrana externa rica en cisteína Omp-2 (Número de Acceso Genbank AAD09597), DnaK (Número de Acceso Genbank AAN77259), factor de elongación P (Número de Acceso Genbank
10 AAK72389), GrpE (Número de Acceso Genbank AAN77258), HrcA (Número de Acceso Genbank AAN77257), proteína principal de membrana externa (Números de Acceso Genbank AAK00237, CAA36152, CAD29327), precursor de la proteína principal de membrana externa (Números de Acceso Genbank AAD29103, AAD29102, AAG53881, P16567), MutS (Número de Acceso
15 Genbank AAD25864), Omp1 (Números de Acceso Genbank CAA06182, CAA06620, CAA06621, CAA06622, CAA06624, CAA06625, CAA06183, CAA06184), proteína de membrana externa (Número de Acceso Genbank AAB02850), proteína de membrana externa 2 (Número de Acceso Genbank AAD20336), precursor de POMP90A (Número de Acceso Genbank
20 AAC15922), precursor de POMP90B (Número de Acceso Genbank AAC15924), POMP91A (Número de Acceso Genbank AAC15921), precursor de POMP91B (Número de Acceso Genbank AAC15923), proteína putativa de membrana externa de 98 kDa (Número de Acceso Genbank AAB18188),

proteína putativa de membrana externa (Número de Acceso Genbank AAB18187), lipoproteína pequeña de membrana externa rica en cisteína (Número de Acceso Genbank AAG60549), proteína rica en azufre (Número de Acceso Genbank AAG60551), y OmpA (Números de Acceso Genbank
 5 AAT36355 y AAT36356).

Las proteínas *C. psittaci* incluyen los precursores de proteína de membrana externa rica en cisteína de 60K (Números de Acceso Genbank P23701, B39439, JC5204 y P27606); proteínas ricas en cisteína de 60K (Números de Acceso Genbank CAA37592 y CAA37591); homólogo de
 10 chaperonina. (Número de Acceso Genbank AAB22560); marco de lectura abierto hacia el extremo 5' temprano (EUO) (Números de Acceso Genbank AAA23124, Q06566 y C36909); homólogo de proteína EUO (Número de Acceso Genbank JC5207); proteína de aborto ewe (Número de Acceso Genbank 1601347A); proteína específica del género (Número de Acceso
 15 Genbank AAB22559); proteína de cubierta rica en cisteína de alto peso molecular (Número de Acceso Genbank AAB61619); proteína semejante a histona H1 (Números de Acceso Genbank AAA23132, JH0658, Q46204); proteína hypA (Número de Acceso Genbank JL0116); proteína hypB (Número de Acceso Genbank JL0117); proteínas hipotéticas (Números de Acceso
 20 Genbank JC5206, NP_052329, NP_052332, NP_052331, NP_052330, NP_052328, NP_052327, NP_052326, NP_052325, NP_052323, CAA44340, CAA44339, CAA44334, CAA44341, CAA44338, CAA44337, CAA44336, CAA44335, CAA44332, A39999, NP_052324, CAA44333, S61492, S18143,

C39999, D39999, E39999, F39999, S18148, G39999, H39999 y 139999);
 proteínas de membrana de inclusión (Números de Acceso Genbank
 2108371A, S61491); proteína de cubierta rica en cisteína de bajo peso
 molecular (Número de Acceso Genbank AAB61618); proteína hipotética rica
 5 en lisina LRO (Número de Acceso Genbank B36909); proteína principal de
 membrana externa y precursores (Números de Acceso Genbank CAA31177,
 2006276A 1616229A, AAA23148, AAA23147, AAA17396, I40864, I40740,
 AAA23146, CAA40300, AAK00262, AAK00250, AAK00249, AAK00248,
 AAK00247, AAK00246, AAK00245, AAK00244, AAK00243, AAK00242,
 10 AAK00241, AAK00240, CAC84081, A60341, A40371, B60109, A60109,
 MMCWPM, MMCWP3, Q00087, P10332 y AAQ91209); factor sigma principal
 (Número de Acceso Genbank AAA50747); MutS (Números de Acceso
 Genbank AAD25866 y AAD25863); la parte N terminal de una proteína de
 función desconocida (Número de Acceso Genbank CAA90624); ORF 2
 15 (Número de Acceso Genbank 2108371B); proteína de membrana externa 1
 (Números de Acceso Genbank CAA76286 y CAB96859); precursor de
 proteína de membrana externa 3 (Número de Acceso Genbank JC5203);
 proteína de función desconocida (Número de Acceso Genbank CAA90623);
 proteína putativa de membrana polimórfica (Números de Acceso Genbank
 20 AAL36963, AAL36962, AAL36961, AAL36960, AAL36959, AAL36958,
 AAL36957, AAL36956, y AAL36955); precursor de proteína pequeña de
 cubierta rica en cisteína envA (Número de Acceso Genbank A39439);
 proteínas ricas en azufre (Números de Acceso Genbank P28164, AAB61620 y

JC5205); proteína desconocida (Números de Acceso Genbank AAB22561 y AAB22558); proteína de la familia parA de plásmido de virulencia pGP5-D; (Número de Acceso Genbank Q46263); proteína de plásmido de virulencia pGP2-D (Número de Acceso Genbank Q46260); proteína de plásmido de virulencia pGP3-D (Número de Acceso Genbank Q46261); proteína de plásmido de virulencia pGP4-D (Número de Acceso Genbank Q46262); proteína de plásmido de virulencia pGP6-D (Número de Acceso Genbank Q46264), OmpA (Números de Acceso Genbank AAT36351 y AAT36354) y una proteína chaperonina de 60kD (Número de Acceso Genbank AAT38208).

10 Las proteínas de *C. felis* incluyen la proteína de choque térmico GroEL (Números de Acceso Genbank AAL38954 y AA024106); la proteína principal de membrana externa (Números de Acceso Genbank AAK00238, AAK00239, AA024108 y CAA43409); MutS (Número de Acceso Genbank AAD25865); y la proteína de membrana externa 2 (Números de Acceso
15 Genbank AAK38113, AAK38114, AAK38115, AAL89722, AA024107, AAQ19779).

En una modalidad preferida, la proteína de *Chlamydophila* utilizada es una proteína de membrana externa tal como la proteína principal de membrana externa (MOMP). Otras proteínas de *Chlamydophila* adecuadas
20 incluyen LPS o la proteína OmcB.

Típicamente, el polinucleótido que codifica la fracción inmunogénica de *C. abortus*, *C. psittaci* o *C. felis* codifica una proteína estructural, y más preferiblemente una proteína de superficie, o una porción

104

inmunogénica de la misma, o un derivado del mismo. La secuencia de ácido nucleico que codifica las diversas proteínas se puede evaluar fácilmente mediante referencia a los Números de Acceso Genbank anteriormente mencionados y se pueden determinar fácilmente mediante técnicas

5 estándares de biología molecular.

En una modalidad, el agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* comprende una *Chlamydomphila* inactivada o atenuada que tiene una secuencia parcial de 218 nucleótidos del gen de ARNr de 23 S la cual tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, o un fragmento

10 inmunogénico de los mismos o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o derivado. Una *Chlamydomphila* que tiene una secuencia parcial de 218 nucleótidos del gen de ARNr 23 S la cual tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 se puede encontrar en, y aislar a partir de, la tráquea y pulmones de perros con CIRD, típicamente perros con CIRD a partir

15 de centros de re-alojamiento y perreras de hospedaje o entrenamiento.

La *Chlamydomphila* se puede aislar a partir de perros mediante la inoculación de un extracto de tejido en una línea celular McCoy en la presencia o ausencia de cicloheximida, cultivando las células por hasta 10 días a 37°C con 5% de CO₂ y luego extrayendo la *Chlamydomphila* mediante

20 fractura por congelamiento de las células. Este método se utiliza rutinariamente para aislamiento de *Chlamydomphilas* a partir de aves, gatos, humanos, y otros hospederos. El fragmento del gen de ARNr 23 S se puede amplificar a partir de la *Chlamydomphila* utilizando las condiciones de PCR

707

105

descritas en el ejemplo 3, y la secuencia obtenida se puede verificar mediante comparación con las secuencias en las figuras 5 u 8.

Para uso en vacunas, los agentes polinucleotídicos se pueden administrar en diversos vectores replicantes (por ejemplo vacuna
5 recombinante de adenovirus) o no replicantes (vacuna de ADN).

Una dosis típica de una vacuna comprendida de proteína recombinante es de aproximadamente 5-10 µg. Una dosis típica de una vacuna bacteriana es de 10^8 unidades formadoras de colonia por ml.

Típicamente, la composición de vacuna comprende
10 adicionalmente un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Ciertos vehículos y adyuvantes se describieron anteriormente. Otros adyuvantes adecuados incluyen adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund, muramil dipéptido, los "Iscoms" de EP 109
15 942, EP 180 564 y EP231 039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrán, aceites neutros (tal como migliol), aceites vegetales (tal como aceite de araquís), liposomas, polioles plurónicos® o el sistema adyuvante Ribi (véase, por ejemplo GB-A-2 189 141).

El vehículo(s) debe ser "aceptable" en el sentido de ser
20 compatible con el agente(s) de la invención y no deletéreo al recipiente del mismo. Típicamente, los vehículos serán agua o solución salina los cuales serán estériles y libres de pirógeno.

108

105

Típicamente, la vacuna se administrará vía las rutas orales, intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales o intranasales.

La composición de vacuna se puede formular para administración parenteral, y pueden incluir soluciones acuosas o no acuosas para inyección estéril las cuales pueden contener anti-oxidantes, reguladores de pH, bacteriostatos y solutos los cuales vuelven a la formulación isotónica con la sangre del recipiente pretendido; y/o suspensiones estériles acuosas o no acuosas las cuales pueden incluir agentes para suspensión y agentes espesantes.

La composición de vacuna puede estar presente en contenedores de dosis unitaria o en contenedores de dosis múltiple, por ejemplo ampollitas y viales sellados, y se pueden almacenar en condición de secado por congelamiento (liofilizada) requiriendo solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas.

La composición de vacuna se puede formular para administración intranasal y se puede administrar convenientemente en la forma de una presentación de aspersion en aerosol a partir de un contenedor presurizado, bomba, aspesor o nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2 tetrafluoroetano (HFA 134A™ o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA227EA™), dióxido de

104

carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar mediante la provisión de una válvula para administrar una cantidad medida. El contenedor presurizado, bomba, aspersor o nebulizador puede contener una solución o suspensión del agente(s), por ejemplo utilizando una mezcla de etanol y el propelente como el solvente, el cual puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitano.

Para uso veterinario, la vacuna se prepara como una formulación aceptable de conformidad con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosis y la ruta de administración la cual será más apropiada para un animal particular.

Las formulaciones para vacunas adecuadas para administración a los perros se conocen bien en la técnica e incluyen las formulaciones utilizadas en las vacunas para perro descritas a continuación.

Como se discutió anteriormente, se sabe que diversos agentes virales y bacterianos están asociados con la enfermedad respiratoria en perros, incluyendo coronavirus respiratorio canino (CRCV), virus de parainfluenza canina (CPIV), adenovirus tipo 2 canino (CAV-2), herpesvirus canino (CHV), y *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*).

Por lo tanto, en una modalidad, la composición de vacuna comprende adicionalmente cualquiera o más de:

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

5 (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

Por lo tanto la composición de vacuna también puede
10 comprender opcionalmente cualquiera de dos, o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro, o los cinco de estos agentes adicionales.

Típicamente, un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV comprende CRCV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de CRCV, o un ácido nucleico que codifica dicha
15 fracción inmunogénica.

Los fragmentos inmunogénicos adecuados de CRCV se describen en WO 2004/011651 (The Royal Veterinary College) y en Erles et al, 2003. Los fragmentos inmunogénicos adecuados de CRCV incluyen las proteínas Spike (S) y las proteínas de superficie hemaglutinina-esterasa (HE),
20 la glicoproteína de membrana (M), y la proteína de la nucleocápside (N), o porciones inmunogénicas de las mismas. Las proteínas Spike semejante a CRCV y las proteínas HE descritas en WO 2004/011651 también pueden ser adecuadas como agentes que generan una respuesta inmune contra CRCV.

109

Los coronavirus cercanamente relacionados, tales como coronavirus de bovino y coronavirus de humano, y fragmentos inmunogénicos de los mismos, también pueden ser adecuados como agentes que generan una respuesta inmune contra CRCV. La descripción total de WO 2004/011651 se refiere a los agentes que pueden ser utilizados como un componente de vacuna contra CRCV, se incorpora en la presente invención como referencia.

Típicamente, un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV comprende CPIV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de los mismos, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

Típicamente, un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2 comprende CAV-2 inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de los mismos, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

El adenovirus tipo 1 canino ocasiona hepatitis infecciosa; el adenovirus tipo 2 canino ocasiona enfermedad respiratoria. Se ha mostrado que CAV-1 provee entrecruzamiento contra CAV-2 y viceversa. El agente que genera una respuesta inmune en un perro contra CAV-2 por lo tanto puede contener ya sea CAV-1 o CAV-2, o un fragmento inmunogénico de los mismos. Las vacunas listadas a continuación contienen CAV-2 excepto por EURICAN® DHPPI, el cual no especifica el tipo de virus utilizado.

Los agentes adecuados que generan una respuesta inmune en un perro contra CPIV y CAV-2 se conocen por una persona experta en la

AA2

técnica. Por ejemplo, las siguientes vacunas para perro están autorizadas en el Reino Unido.

KAVAK® DA₂PIP69 por Fort Dodge Animal Health es una vacuna viva secada mediante congelamiento que contenía cepas atenuadas del virus de desarreglo canino, adenovirus tipo 2 canino, parainfluenza tipo 2 canina y parvovirus canino crecido en cultivo de tejidos.

KAVAK® Parainfluenza por Fort Dodge Animal Health contiene vacuna viva secada mediante congelamiento derivada a partir de una cepa atenuada de virus de parainfluenza canina tipo 2 cultivada sobre una línea celular homóloga establecida.

NOBIVAC® DHPPi por Intervet UK Limited es una vacuna de virus vivo, atenuado, secada mediante congelamiento que contiene virus de desarreglo canino, adenovirus tipo 2 canino, parvovirus canino y virus de parainfluenza canina crecido en una línea celular en cultivo de tejidos.

NOBIVAC® KC por Intervet UK Limited es una vacuna viva modificada secada mediante congelamiento que contiene *Bordetella bronchiseptica* cepa B-C2 y virus de parainfluenza canina cepa Cornell (esta es una vacuna intranasal). Manejo No. de autorización Vm 06376/4026.

EURICAN® DHPPi por Merial Animal Health Ltd. es una vacuna viva combinada secada mediante congelación contra el desarreglo canino, hepatitis infecciosa canina, parvovirus canino y virus parainfluenza tipo 2 canino.

VANGUARD® 7 por Pfizer Ltd. contiene virus vivo atenuado de
 desarreglo de canino (cepa Snyder Hill), adenovirus (cepa CAV-2 Manhattan),
 virus de parainfluenza (cepa NL-CPI-5), parvovirus canino (NL-35-D)
 propagado en una línea celular establecida, y un cultivo inactivado de
 5 *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

QUANTUM® DOG 7 por Schering-Plough Animal Health
 contiene virus del desarreglo de canino, adenovirus tipo 2, parvovirus, vacuna
 de virus de parainfluenza tipo 2 (vivo) y vacuna de *Leptospira canicola*
 inactivada y de *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

10 CANIGEN DHPPi por Virbac Ltd. es una vacuna de virus vivo
 atenuado, secado mediante congelamiento que contiene virus de desarreglo
 canino, adenovirus canino (CAV-2), parvovirus canino y virus de parainfluenza
 canino crecido en una línea celular en cultivo de tejidos.

CANIGEN Ppi por Virbac Ltd. es una vacuna de virus vivo
 15 atenuado, secado mediante congelamiento que contiene parvovirus canino y
 virus de parainfluenza canino crecido en una línea celular en cultivo de tejidos.

Típicamente, un agente capaz de generar una respuesta inmune
 en un perro contra CHV comprende CHV inactivado o atenuado, o un
 fragmento inmunogénico de los mismos, o un ácido nucleico que codifica
 20 dicha fracción inmunogénica.

Los agentes adecuados que generan una respuesta inmune en
 un perro contra CHV se conocen por una persona experta en la técnica. Por
 ejemplo, EURICAN Herpes 205 por Merial es una vacuna de sub-unidad

7/14

purificada contra CHV la cual se indica para la inmunización activa de perras preñadas para prevenir la mortalidad, los signos clínicos y las lesiones en los cachorros resultan a partir de infecciones por CHV adquiridas en los primeros días de la vida. No está autorizada para la vacunación de perros adultos para la prevención de enfermedad respiratoria.

Típicamente, un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* comprende *B. bronchiseptica* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

10 Los agentes adecuados que generan una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* se conocen por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, las siguientes vacunas para perro están autorizadas para uso.

COUGHGUARD-B® por Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.: 15 189) contiene un cultivo inactivado de *B. bronchiseptica*. Es para la inmunización de perros sanos contra la enfermedad ocasionada por *B. bronchiseptica*, en particular tos de perrera. COUGHGUARD-B® se prepara a partir de una cepa de *B. bronchiseptica* altamente antigénica la cual ha sido inactivada y procesada para no ser tóxica cuando se administra a los perros. 20 El método de producción se reporta para dejar intactas las propiedades inmunogénicas de *B. bronchiseptica*.

VANGUARD® 5/B por Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.: 189) contiene cepas atenuadas de virus de desarreglo canino (CDV), CAV-2,

CPIV, y *parvovirus canine* (CPV) propagados en una línea celular establecida de canino. El antígeno CPV se atenuó mediante unos pocos pasos en la línea celular de canino y con ese nivel de pasajes tuvo propiedades inmunogénicas capaces de incrementar aún más a los anticuerpos maternos. La vacuna se
5 empacó en forma liofilizada con gas inerte en lugar de vacío. El componente bacteriano contiene cultivos totales inactivados de *B. bronchiseptica* los cuales se abastecen como diluyentes. El componente de *B. bronchiseptica* en VANGUARD® 5/B se prepara a partir de una cepa altamente antigénica la cual ha sido inactivada y procesada para no ser tóxica cuando se administra a
10 los perros.

NASAGUARD-B™ por Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.: 112) está compuesto de un cultivo vivo no virulento de la bacteria *B. bronchiseptica*.

PROGARD®-KC por Intervet es una vacuna intranasal viva
15 modificada que contiene virus atenuado de parainfluenza de canino y cultivo vivo no virulento de *Bordetella bronchiseptica*. PROGARD®-KC está presente en una forma desecada con diluyente estéril provisto para reconstitución. PROGARD®-KC es para la vacunación de cachorros sanos, susceptibles y perros para la prevención de tracheobronquitis infecciosa de canino ("tos de
20 perrera") debido al virus de parainfluenza de canino y *B. bronchiseptica*.

PROGARD®-KC PLUS por Intervet contiene cultivos vivos de cepas avirulentas de *B. bronchiseptica*, adenovirus atenuado tipo 2 canino y virus de parainfluenza para administración intranasal. La vacunación con

PROGARD®-KC Plus estimula la inmunidad rápida, local en el tracto respiratorio, por lo tanto inhibiendo la infección en el puerto de entrada así como previniendo los signos clínicos. Además de la inmunidad local, ésta también estimula la inmunidad sistémica dentro de las primeras tres semanas de administración intranasal. El volumen pequeño (0.4 ml) y una aplicación al nostrilo de PROGARD®-KC Plus se provee para facilidad en la vacunación, particularmente en razas pequeñas y cachorros jóvenes. PROGARD®-KC Plus se presenta en una forma desecada con diluyente estéril provisto para reconstitución. PROGARD®-KC Plus es para vacunación de perros sanos y

5

10 cachorros de tres semanas de edad o más viejos para la prevención de la tracheobronquitis infecciosa de canine ("tos de perrera") debido al adenovirus tipo 2 canino, virus de parainfluenza y *B. bronchiseptica*.

Intrac por Intervet es una vacuna viva modificada secada mediante congelamiento, que contiene *B. bronchiseptica* cepa S 55, para

15 administración intranasal. El producto número de licencia PL 0201/4011

Nobivac® KC, anteriormente descrito, también contiene *B. bronchiseptica*.

En una modalidad, la composición de vacuna comprende:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un

20 perro contra *S. zooepidemicus*; y/o

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *M. cynos*,

y, opcionalmente, cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*;

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

5 (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

10 (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

En una modalidad preferida, la composición de vacuna comprende:

15 (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro.

20 En otra modalidad preferida, la composición de vacuna comprende:

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;

y cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
5 perro contra una *Chlamydomphila*;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CAV-2;

10 (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra *B. bronchiseptica*.

Por lo tanto se aprecia que también como los agentes (b) y (d), la
15 composición puede contener cualquiera de dos de los agentes (c), (e), (f), (g)
y (h), o cualquiera de tres o cualquiera de cuatro de los cinco agentes (c), (e),
(f), (g) y (h).

En otra modalidad preferida, la composición de vacuna
comprende

20 (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S.*
zooepidemicus en un perro; y

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M.*
cynos en un perro; y

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;

y cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
5 perro contra una *Chlamydomphila*;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CAV-2;

10 (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra *B. bronchiseptica*.

Por lo tanto se aprecia que también como los agentes (a), (b) y
15 (d), la composición puede contener cualquiera de dos de los agentes (c), (e),
(f), (g) y (h), o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro, de los cinco agentes
(c), (e), (f), (g) y (h).

Un segundo aspecto de la invención provee un método para
vacunación de un perro contra CIRD que comprende administrar al perro una
20 composición de vacuna de conformidad con el primer aspecto de la invención.

Un tercer aspecto de la invención provee un método para
tratamiento de la CIRD en un perro que comprende administrar al perro una
composición de vacuna de conformidad con el primer aspecto de la invención.

Por lo tanto se puede observar que la composición de vacuna del primer aspecto de la invención se puede utilizar en el combate de la CIRD ya sea profilácticamente o terapéuticamente.

Un cuarto aspecto de la invención provee el uso de cualquiera o
5 más de:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro;

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

10 (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*;

en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de CIRD en un perro.

En una modalidad, el medicamento comprende adicionalmente
15 cualquiera o más de:

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

20 (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

En este y todos los aspectos subsecuentes de la invención, las preferencias para (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h) son como se describen con respecto al primer aspecto de la invención.

Un quinto aspecto de la invención provee un método para estimulación de una respuesta inmune contra cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* y una *Chlamydomphila* en un perro, el método comprendiendo administrar al perro cualquiera o más respectivos entre:

10 (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro;

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

15 (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*;

En una modalidad, el método comprende adicionalmente administrar cualquiera o más de:

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

20 (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

5 Un sexto aspecto de la invención provee el uso de cualquiera o más de:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro;

10 (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydophila*;

en la preparación de un medicamento para la estimulación de una respuesta inmune contra dicho cualquiera o más respectivos entre *S.*

15 *zooepidemicus*, *M. cynos* y una *Chlamydophila* en un perro.

En una modalidad, el medicamento comprende adicionalmente cualquiera o más de:

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

20 (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

5 Un séptimo aspecto de la invención provee una composición que comprende cualquiera uno o más de:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro;

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydophila*,

para uso en medicina. Por lo tanto la composición se empaca y presenta para uso en medicina.

15 Se aprecia que la composición puede contener cualquiera de dos de estos agentes, por ejemplo (a) y (b), (a) y (c), o (b) y (c). La composición puede contener los tres de estos agentes (a), (b) y (c).

En una modalidad, la composición es para uso en medicina veterinaria. Por lo tanto la composición se empaca y presenta para uso en

20 medicina veterinaria.

Típicamente, la composición es para uso en medicina veterinaria canina. Por lo tanto la composición se empaca y presenta para uso en

medicina veterinaria canina, por ejemplo se empaca y se presenta para uso en perros.

En una modalidad, la composición comprende adicionalmente cualquiera o más de:

5 (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

10 (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

15 En una modalidad de este aspecto, la composición comprende:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *S. zooepidemicus*; y/o

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *M. cynos*,

20 y, opcionalmente, cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydophila*;

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

5 (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

10 (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

En una modalidad preferida de este aspecto, la composición comprende:

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

15 (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro.

En otra modalidad preferida de este aspecto, la composición comprende:

20 (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;

y cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPV;

5 (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

10 (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

Por lo tanto se aprecia que también como los agentes (b) y (d), la composición puede contener cualquiera de dos de los agentes (c), (e), (f), (g) y (h), o cualquiera de tres o cualquiera de cuatro de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

15 En otra modalidad preferida de este aspecto, la composición comprende

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; y

20 (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;

y cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

5 (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
10 perro contra *B. bronchiseptica*.

Por lo tanto se aprecia que también como los agentes (a), (b) y (d), la composición puede contener cualquiera de dos de los agentes (c), (e), (f), (g) y (h), o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro, de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

15 Un octavo aspecto de la invención provee un equipo de partes para la composición de vacuna del primer aspecto de la invención, que comprende cualquiera o más de:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro;

20 (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*,

y opcionalmente un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Se aprecia que el equipo de partes puede contener cualquiera de dos de estos agentes, por ejemplo (a) y (b), (a) y (c) o (b) y (c). El equipo
5 puede contener los tres agentes (a), (b) y (c).

En una modalidad, el equipo comprende adicionalmente cualquiera o más de:

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

10 (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
15 perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

En una modalidad de este aspecto, el equipo comprende:

(a) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
20 perro contra *S. zooepidemicus*; y/o

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *M. cynos*,

y, opcionalmente, cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*;

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;

5 (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
10 perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

En una modalidad preferida de este aspecto, el equipo comprende:

15 (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro.

En otra modalidad preferida de este aspecto, el equipo
20 comprende:

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y

128

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;

y cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
5 perro contra una *Chlamydomphila*;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CAV-2;

10 (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra *B. bronchiseptica*.

Por lo tanto se aprecia que también como los agentes (b) y (d), el
15 equipo puede contener cualquiera de dos de los agentes (c), (e), (f), (g) y (h),
o cualquiera de tres o cualquiera de cuatro de los cinco agentes (c), (e), (f), (g)
y (h).

En otra modalidad preferida de este aspecto, el equipo
comprende:

20 (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S.*
zooepidemicus en un perro; y

(b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M.*
cynos en un perro; y

731

(d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;

y cualquiera o más de:

(c) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
5 perro contra una *Chlamydomphila*;

(e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CPIV;

(f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CAV-2;

10 (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra CHV; y

(h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un
perro contra *B. bronchiseptica*.

Por lo tanto se aprecia que también como los agentes (a), (b) y
15 (d), el equipo puede contener cualquiera de dos de los agentes (c), (e), (f), (g)
y (h), o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro, de los cinco agentes (c),
(e), (f), (g) y (h).

En un noveno aspecto, la invención provee un método para
elaborar un anticuerpo contra cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M.*
20 *cynos* o una *Chlamydomphila*, que comprende generar una respuesta inmune a
dicho cualquiera o más respectivos de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una
Chlamydomphila, o un fragmento inmunogénico de los mismos, en un animal, y

preparar un anticuerpo a partir del animal o a partir de una célula inmortal derivada del mismo.

Los métodos y técnicas para la producción de un anticuerpo monoclonal se conocen bien por una persona experta en la técnica, por ejemplo aquellos descritos en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982), incorporado en la presente invención como referencia.

Un décimo aspecto de la invención provee un método para la obtención de un anticuerpo contra cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*, que comprende seleccionar un anticuerpo a partir de un librería para exhibición del anticuerpo utilizando dicho cualquiera o más respectivos de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*, o un fragmento inmunogénico de los mismos.

En una modalidad del noveno y décimo aspectos, la *Chlamydomphila* es *C. abortus* o *C. psittaci* o *C. felis*. En otra modalidad la *Chlamydomphila* es *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*.

Un décimoprimer aspecto de la invención provee un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*. Este se puede elaborar mediante los métodos del noveno y décimo aspectos de la invención.

En una modalidad, el anticuerpo que se une específicamente a una *Chlamydomophila* se une a *C. abortus* o *C. psittaci* o *C. felis*. En otra modalidad el anticuerpo que se une específicamente a una *Chlamydomophila* se une a *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*.

5 En el contexto de estos aspectos y de aspectos subsecuentes de la invención, por "anticuerpo" nosotros incluimos no solamente moléculas totales de inmunoglobulina sino también fragmento de las mismas tales como Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos de los mismos que retienen el sitio de unión al antígeno. De manera similar en estos contextos, el término

10 "anticuerpo" incluye derivados de anticuerpos genéticamente modificados tal como moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) y dominios de los anticuerpos (dAbs). El término también incluye moléculas semejantes a anticuerpo las cuales se pueden producir utilizando técnicas para exhibición del fago u otras técnicas de selección al azar para moléculas las cuales se unen al organismo

15 particular o a las regiones del organismo particular. Por lo tanto, en estos contextos, el término anticuerpo incluye todas las moléculas las cuales contienen una estructura, preferiblemente una estructura peptídica, la cual es parte del sitio de reconocimiento (por ejemplo la parte del anticuerpo que se une o que combina con el epítopo o el antígeno) de un anticuerpo natural.

20 Los dominios variables pesados (V_H) y los dominios variables ligeros (V_L) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento del antígeno, un hecho primero reconocido por los experimentos tempranos de digestión con proteasa. La confirmación adicional se encontró por la "humanización" de

los anticuerpos de roedor. Los dominios variables de origen de roedor se pueden fusionar a los dominios constantes de origen de humano de tal manera que el anticuerpo resultante retiene la especificidad antigénica del anticuerpo parental de roedor (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851-6855).

Se conoce esa especificidad antigénica que se confiere por dominios variables y que es independiente de los dominios constantes a partir de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos del anticuerpo, todos los cuales contienen uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas semejantes a Fab (Better et al (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); moléculas Fv de cadena sencilla (ScFv) en donde los dominios del partícipe VH y VL están asociados vía un oligopéptido flexible (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85, 5879) y anticuerpos de dominio sencillo (dAbs) que comprenden dominios V_H aislados (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos del anticuerpo los cuales retienen sus sitios de unión específicos se encuentra en Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

Por "moléculas ScFv" nosotros nos referimos a las moléculas en donde los dominios del partícipe VH y VL están asociadas vía un oligopéptido flexible. Los anticuerpos diseñados, tales como los anticuerpos ScFv, se pueden elaborar utilizando las técnicas y métodos descritos en J. Huston et al, (1988) "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific

activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *E. coli*", Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 85, pp. 5879- 5883, y en A. Pluckthun, (Junio 1991) "Antibody engineering; Advances from use of *E. coli* expression systems", Bio/technology vol 9, Incorporado en la presente invención como referencia.

5 Las ventajas de la utilización de fragmentos del anticuerpo, más que los anticuerpos completos, son de varias veces de activación. El tamaño más pequeño de los fragmentos puede llevar a propiedades farmacológicas mejoradas, tal como mejor penetración al sitio blanco. Se remueven las funciones del efector de los anticuerpos totales, tal como la unión al
10 complemento. Se pueden expresar todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb y secretar a partir de *E. coli*, por lo tanto permitiendo la fácil producción de grandes cantidades de los fragmentos.

Los anticuerpos totales, y los fragmentos $F(ab')_2$ son "bivalentes". Por "bivalente" nosotros nos referimos a los anticuerpos y a los
15 fragmentos $F(ab')_2$ que tienen dos sitios de combinación del antígeno. En contraste, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes, que solamente tienen un sitio de combinación del antígeno.

Aunque el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, se prefiere si es un anticuerpo monoclonal. En ciertos casos, particularmente si el
20 anticuerpo se va a administrar repetidamente a un perro, se prefiere si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de perro o un anticuerpo "caninizado".

Se pueden producir los anticuerpos policlonales los cuales son poliespecíficos o monoespecíficos. Se prefiere que estos sean monoespecíficos. Los anticuerpos quiméricos se discuten por Neuberger et al (1998, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799).

5 Se prefiere si el anticuerpo es un anticuerpo "caninizado". Los anticuerpos preparados de manera adecuada que no son de perro pueden ser "caninizados" en formas conocidas, por ejemplo mediante la inserción de las regiones CDR de anticuerpos de ratón dentro de la estructura en marco de los anticuerpos de perro. Los anticuerpos caninizados se pueden elaborar
10 utilizando técnicas y métodos que corresponden a aquellos descritos para la humanización de anticuerpos en M. Verhoeven, C. Milstein y G. Winter (1988) "Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity", Science, 239, 1534-1536, y en C. Kettleborough et al., (1991) "Humanisation of a mouse monoclonal antibody by CDR grafting; The importance of framework
15 residues in loop conformation", Protein Engineering, 14 (7), 773-783, incorporado en la presente invención como referencia.

Se aprecia que un perro puede adquirir pasivamente inmunidad contra CIRD al ser administrado un anticuerpo que reacciona con un agente que participa en la enfermedad.

20 Por lo tanto, un decimosegundo aspecto de la invención provee un método para inmunizar pasivamente a un perro contra CIRD que comprende administrar al perro uno o más anticuerpos que se unen

específicamente a uno o más respectivos de *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, y una *Chlamydophila*.

Los anticuerpos que se unen específicamente a los *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, y la *Chlamydophila* se pueden elaborar u obtener
5 utilizando técnicas estándares tales como aquellas anteriormente descritas.

Se aprecia que la CIRD en un perro se puede tratar mediante la administración de un anticuerpo que reacciona con un agente que participa en la enfermedad.

En un decimotercera aspecto, la invención provee un método
10 para tratamiento de la CIRD en un perro que comprende administrar al perro uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más respectivos de *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, y una *Chlamydophila*.

En una modalidad del decimosegundo o decimotercera aspectos, el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. abortus*, o *C. psittaci* o *C. felis*. En otra modalidad el anticuerpo que se une
15 específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*.

En una modalidad del decimosegundo o decimotercera aspectos, el método comprende adicionalmente administrar anticuerpos que se unen
20 específicamente a cualquiera o más de CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B. bronchiseptica*.

Los anticuerpos que se unen específicamente a CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B. bronchiseptica* se pueden elaborar utilizando técnicas estándares tales como aquellas anteriormente descritas.

Un decimocuarto aspecto de la invención provee el uso de uno o
5 más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más respectivos de *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, y una *Chlamydophila*, en la preparación de un medicamento para inmunizar pasivamente a un perro contra la CIRD.

Un decimoquinto aspecto de la invención provee el uso de uno o
más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más respectivos de *S.*
10 *zooepidemicus*, *M. cynos*, y una *Chlamydophila*, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la CIRD en un perro.

En una modalidad del decimocuarto o decimoquinto aspectos, el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. abortus*, o *C. psittaci* o *C. felis*. En otra modalidad el anticuerpo que se une
15 específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*.

En una modalidad del decimocuarto o decimoquinto aspectos, el medicamento comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B.*
20 *bronchiseptica*.

Un decimosexto aspecto de la invención provee una composición que comprende cualquiera dos o más de un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, un anticuerpo que se une

específicamente a *M. cynos*, y un anticuerpo que se une específicamente a una *Chlamydophila*.

En una modalidad, el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. abortus*, o *C. psittaci* o *C. felis*. En otra modalidad el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*.

En una modalidad, la composición comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B. bronchiseptica*.

También se apreciará que la invención incluye métodos y ensayos diagnósticos. Por lo tanto, la invención provee un método para determinar si un perro ha sido expuesto a una especie *Chlamydophila* asociada con la CIRDC, el método comprendiendo:

- (a) obtener una muestra adecuada a partir del perro; y
- (b) identificar una especie *Chlamydophila* asociada con la CIRDC, o un anticuerpo a la misma, en la muestra.

Típicamente, la especie *Chlamydophila* es una la cual tiene un ARN 23S que comprende la secuencia (cuando se muestra como ARN) de cualquiera de SEQ ID Nos: 1 a 8 (véase las figuras 5 y 8 las cuales muestran las secuencias parciales de ARN 23S, y el ejemplo 3).

La invención también provee un método para determinar si un perro tiene o es susceptible a la CIRDC, el método comprendiendo:

- (a) obtener una muestra adecuada a partir del perro; y

(b) identificar cualquiera o más de *S. zooepidemicus* o *M. cynos* o *Chlamydomphila*, o un anticuerpo a cualquiera de éstos, en la muestra.

Se apreciará que los métodos pueden detectar, en una modalidad, exposición presente al organismo por ejemplo mediante la
5 detección del organismo mismo o un componente del mismo (tal como una proteína o ácido nucleico) dentro de la muestra. Los métodos también pueden detectar la exposición pasada al organismo mediante la detección de los anticuerpos en la muestra los cuales se dirigen al organismo o a los componentes del mismo.

10 Típicamente, la muestra es cualquier muestra adecuada, incluyendo anticuerpo que contiene muestras tales como suero, saliva, lavado traqueal y lavado bronquiolar.

Por lo tanto la presencia del organismo en el perro a partir del cual se deriva la muestra se puede determinar mediante el análisis de la
15 muestra para la presencia del organismo o componente del mismo. Por ejemplo, para componentes de ácido nucleico, incluyendo ARN 23 S, el ácido nucleico se extrae y se puede copiar dentro del ADN si es necesario, y detectar, por ejemplo, utilizando técnicas implicadas en la hibridación de alta severidad, amplificación específica, secuenciación de nucleótidos y otros
20 métodos bien conocidos por la persona experta en la técnica (Sambrook et al (2001) anteriormente mencionado). Por "hibridación a una alta severidad" se entiende que el polinucleótido y el ácido nucleico al cual se hibrida tiene una similitud de secuencia nucleotídica adecuada que se puede hibridar de

manera similar bajo condiciones de alta severidad. Como se conoce bien en la técnica, la severidad de la hibridación de ácidos nucleicos depende de factores tales como la longitud de ácido nucleico sobre la cual se presenta la hibridación, grado de identidad de las secuencias hibridantes y de factores
 5 tales como temperatura, fuerza iónica y contenido de CG o AT de la secuencia.

Los ácidos nucleicos los cuales pueden hibridar a una alta severidad con las moléculas de ácido nucleico del organismo incluyen ácidos nucleicos los cuales tienen > 90% de identidad de secuencia, preferiblemente
 10 aquellos con > 95% o > 96% o > 97% o > 98, más preferiblemente aquellos con > 99% de identidad de secuencia, sobre al menos una porción del ácido nucleico del organismo.

Las condiciones típicas para hibridación de alta severidad las cuales llevan a la hibridación selectiva se conocen en la técnica, por ejemplo
 15 aquellas descritas en Sambrook et al 2001 (anteriormente mencionado), incorporado en la presente invención como referencia.

Un ejemplo de una solución típica para hibridación cuando un ácido nucleico se inmoviliza sobre una membrana de nylon y la sonda de ácido nucleico es de ≥ 500 bases es:

20 SSC 6 x (citratato de sodio salino)

dodecil sulfato de sodio al 0.5% (SDS)

100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado

La hibridación se lleva a cabo a 68°C. La membrana de nylon, con el ácido nucleico inmovilizado, se puede lavar a 68°C en SSC 0.1 x.

SSC 20 x se puede preparar de la siguiente manera. Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de H₂O. Ajustar el pH a 7.0 con unas pocas gotas de una solución 10 N de NaOH. Ajustar el volumen a 1 litro con H₂O. Dispensar en alícuotas. Esterilizar por autocableado.

Un ejemplo de una solución típica para hibridación cuando un ácido nucleico se inmoviliza en una membrana de nylon y la sonda es un oligonucleótido de entre 15 y 50 bases es:

- 10 cloruro de trimetilamonio 3.0 M (TMACI)
- fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.8)
- EDTA 1 mm (pH 7.6)
- SDS al 0.5%
- 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado,
- 15 desnaturalizado
- leche descremada deshidratada al 0.1%

La temperatura óptima para la hibridación usualmente se elige para que sea de 5°C por debajo de la T_i para la longitud de la cadena dada. T_i es la temperatura de fusión irreversible del híbrido formado entre la sonda y su secuencia blanco. Jacobs et al (1988) Nucl. Acids Res. 16, 4637 discuten la determinación de las T_is. La temperatura de hibridación recomendada para las moléculas de 17 elementos en TMACI 3M es de 48-50°C; para las moléculas

de 19 elementos, es de 55-57°C; y para las moléculas de 20 elementos, es de 58-66°C.

El ensayo de un componente de una proteína del organismo en una muestra a partir del perro se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Típicamente, dichos métodos son unión al anticuerpo, y el anticuerpo se une al organismo o a un componente del mismo.

Por ejemplo, la expresión de la proteína a partir del organismo se puede estudiar con métodos inmunohistológicos clásicos. En estos, el reconocimiento específico se provee por el anticuerpo primario (policlonal o monoclonal) pero el sistema de detección secundario puede utilizar anticuerpos fluorescentes, enzimas, u otros anticuerpos secundarios conjugados. Como un resultado, se obtiene una tinción inmunohistológica de una sección de tejido para examen patológico. Los tejidos también se pueden extraer, por ejemplo, con urea y detergente neutro, para la liberación de proteína para el ensayo de Western-blot o de dot/slot (Jalkanen, M., et al, J Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M., et al, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)). En esta técnica, la cual se basa en el uso de fases sólidas catiónicas, la cuantificación de la proteína se puede lograr utilizando proteína aislada como un estándar. Esta técnica también se puede aplicar para muestras de fluido corporal.

Otros métodos basados en anticuerpo útiles para detectar la expresión de proteína incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunosorbente asociado a enzima (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA).

Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal reactivo se puede utilizar tanto como un inmunoabsorbente y como una sonda marcada con enzima para detectar y cuantificar la proteína. La cantidad de proteína presente en la muestra se puede calcular con referencia a la cantidad presente en una preparación estándar utilizando un algoritmo por computadora de regresión lineal. Tal como ELISA para detectar un antígeno tumoral se describe en Iacobelli et al, Breast Cancer Research and Treatment 11: 19-30 (1988). En un ensayo de ELISA, dos anticuerpos monoclonales específicos distintos se pueden utilizar para detectar proteína en un fluido corporal. En este ensayo, uno de los anticuerpos se utiliza como el inmunoabsorbente y el otro como la sonda marcada con enzima.

Las técnicas anteriormente mencionadas se pueden conducir esencialmente como un ensayo de "un paso" o de "dos pasos". El ensayo de "un paso" implica poner en contacto la proteína con anticuerpo inmovilizado y, sin lavado, poner en contacto la mezcla con el anticuerpo marcado. El ensayo de "dos pasos" implica el lavado antes de poner en contacto la mezcla con el anticuerpo marcado. Otros métodos convencionales también se pueden emplear como sea adecuado. Usualmente es deseable inmovilizar un componente del sistema de ensayo en un soporte, por lo tanto permitiendo que otros componentes del sistema se pongan en contacto con el componente y fácilmente se remueve a partir de la muestra.

Las marcas enzimáticas adecuadas incluyen, por ejemplo, aquellas a partir del grupo oxidasa, las cuales catalizan la producción de

peróxido de hidrógeno mediante la reacción con el sustrato. La glucosa oxidasa se prefiere particularmente puesto que tiene una buena estabilidad y su sustrato (glucosa) es fácilmente disponible. La actividad de una marca de oxidasa se puede ensayar mediante la medición de la concentración del peróxido de hidrógeno formado por la reacción de anticuerpo marcado con enzima/sustrato. Además de las enzimas, otras marcas adecuadas incluyen radioisótopos, tales como yodo (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹²¹In), y tecnecio (^{99m}Tc), y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

10 Los anticuerpos al organismo o componentes de los mismos se pueden detectar utilizando, por ejemplo, la técnica bien conocida de ensayo inmunosorbente, tal como un ensayo inmunosorbente asociado a enzima (ELISA).

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención provee un ensayo inmunoabsorbente para detectar anticuerpos asociados con CIRD, el ensayo comprendiendo: una fase sólida revestida con cualquiera o más de (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro; y una marca conjugada detectable la cual se unirá a los anticuerpos unidos a la fase sólida.

Preferiblemente, la fase sólida es un pozo para microtitulación. Adicionalmente de manera preferible, el conjugado comprende anticuerpo

746

anti-anticuerpo de perro. Preferiblemente, el conjugado comprende una enzima, por ejemplo peroxidasa de rábano. Adicionalmente de manera preferible, el ensayo inmunosorbente también comprende un sustrato a partir de la enzima. La invención incluye un equipo de partes el cual incluye los

5 componentes del ensayo inmunosorbente. Por lo tanto el equipo de partes puede incluir una fase sólida tal como una placa para microtitulación, proteína a partir del organismo u organismos para revestir la fase sólida, una marca detectable conjugada, tal como un anticuerpo anti-perro, el cual se unirá a anticuerpos anti-organismo (o componente del mismo) unidos a la fase sólida.

10 Si la marca detectable conjugada es una enzima, el equipo de partes también puede incluir un sustrato para la enzima. El equipo también puede incluir una muestra control positivo que contiene un anticuerpo que se sabe que reacciona con el antígeno en el sustrato sólido, y una muestra control negativo.

15 La invención también incluye un sustrato de fase sólida revestido con cualquiera de uno o dos o los tres de (a), (b) y (c) como se definió anteriormente y en el primer aspecto de la invención. Típicamente, el agente que es capaz de generar una respuesta inmune es uno el cual también se unirá a un anticuerpo. Típicamente, el agente es una proteína antigénica.

20 Típicamente, la proteína está revestida en placas para microtitulación durante toda la noche a 4°C a 37°C, dependiendo de la estabilidad del antígeno. La proteína no unida se elimina con un regulador de pH para lavado tal como solución salina con pH regulado con fosfato o solución salina con pH regulado

con Tris. El suero u otras muestras se incuban en la placa, típicamente a 37°C por entre 1 y varias horas. El material no unido se lava, las placas se incuban con anticuerpo marcado con enzima (por ejemplo peroxidasa de rábano), tal como anti-IgG canina o IgM para muestras de suero, o anti-IgA canina para lavados pulmonares, por 1 a varias horas a 37°C. El anticuerpo no unido se lava y las placas se incuban con sustrato tal como OPD por aproximadamente 10 minutos, y la densidad óptica se mide en un fotómetro.

Preferiblemente, el sustrato sólido es un pozo para microtitulación.

10 Todos los documentos referidos en la presente invención se incorporan aquí, en su totalidad, como referencia. El listado o discusión de un documento previamente publicado en esta especificación no necesariamente debe ser tomado como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es conocimiento general común.

15 La invención a continuación se describirá con mayor detalle con la ayuda de las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1: Aislamiento de *S. canis* y *S. zooepidemicus* a partir de 209 perros mantenidos en la perrera con evaluación respiratoria clínica (n = número total de perros en cada grupo). Las barras de error representan los intervalos de confianza (95%).

Figura 2: Porcentaje de perros con CIRD, *S. canis* o *S. zooepidemicus* con tiempo en la perrera (n = número total de perros en cada

grupo partir de un total de 209 perros). Las barras de error representan los intervalos de confianza (95%).

Figura 3: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar por *M. cynos* en intervalos en incremento de severidad de la CIRD.

5 Figura 4: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar por *M. cynos* después de incrementar las longitudes de tiempo en las perreras.

Figura 5: 218 secuencias nucleotídicas parciales (SEQ ID NO: 1) del gen de ARNr 23S a partir de una *Chlamydophila* aislada a partir de un
10 perro con CIRD (DHB 10).

Figura 6: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar por *Chlamydophila* a niveles en incremento de severidad de la CIRD.

Figura 7: Secuencias parciales de ARNr 23S (DHB) alineadas con el ARNr 23S de todas las especies conocidas de *Chlamydia* y
15 *Chlamydophila* (Cabor- *C. abortus*, Cpsit- *C. psittaci*, Cfel- *C. felis*, Ccavi- *C. caviae*, Cpne- *C. pneumoniae*, Cpec- *C. pecorum*, Csuis- *C. suis*, Ctrac- *C. trachomatis*, Wad- *Waddlia*, Sim- *Simkania*).

Figura 8: 218 secuencias nucleotídicas parciales (SEQ ID NOs: 2-8) del gen de ARNr 23S a partir de varios aislados adicionales de una
20 especie de *Chlamydophila* aislada a partir de un perro con CIRD (DHB 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

Figura 9: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar por herpesvirus canino a niveles en incremento de CIRD.

EJEMPLO 1

La asociación de *Streptococcus equi* sub especies *zooepidemicus* con enfermedad respiratoria infecciosa canina

Resumen

La enfermedad respiratoria infecciosa canina (CIRD) es una infección multi-factorial que afecta a muchos perros mantenidos en la perrera a pesar del amplio uso de vacunación. Las vacunas actuales tienen el objetivo de proteger contra los agentes virales y un agente bacteriano particular, *Bordetella bronchiseptica*. Nosotros examinamos el papel de las especies estreptococcales en CIRD. El aislamiento e identificación de streptococci en el tracto respiratorio inferior de perros clínicamente sanos y aquellos con CIRD se utilizaron para correlacionar la presencia de especies estreptococcales específicas con la enfermedad respiratoria. Nosotros mostramos que la presencia de *S. equi* sub especies *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) está asociada con la severidad incrementada de la enfermedad en una población de perros mantenidos en la perrera con CIRD endémica.

Introducción

La CIRD es una infección que afecta a los perros de todas las edades y comúnmente se presenta cuando se alojan grandes números de perros en un confinamiento cerrado. La enfermedad tiene una elevada morbilidad con la tos seca característica de la laringitis en las etapas

tempranas, descargas nasales y/u oculares, y anorexia y depresión variable, la cual puede progresar hacia traqueobronquitis, neumonía e incluso la muerte en los casos más severos. Históricamente la enfermedad se ha observado como una infección compleja en la cual la prueba combinada o secuencial con
5 ambos agentes virales (CPIV y CAV-2) y bacterianos produce una mejoría sinérgica de las evaluaciones clínicas (Appel y Binn, 1987). El agente bacteriano más común detectado durante la enfermedad es *B. bronchiseptica* (McCandlish et al, 1978), pero otras especies bacterianas tales como *Pasteurella sp*, *Mycoplasma sp.* y estreptococos β -hemolíticos (β hS) se han
10 asociado con la enfermedad (McCandlish et al, 1978; Rosendal, 1978; Thrusfield et al, 1991).

Muchos estudios que implican el aislamiento bacteriano a partir del tracto respiratorio superior (cavidad oral y nasal) y tracto respiratorio inferior (traqueal y pulmones) de ambos perros enfermos y perros sanos
15 mencionan la presencia de β hS (Smith, 1967; McCandlish et al, 1978; McKiernan et al, 1982; Azetaka y Konishi, 1988). Sin embargo, a pesar de la variedad de especies de β hS encontradas en el tracto respiratorio superior de perros, solamente unas pocas investigaciones se han enfocado en las especies de β hS implicadas en la enfermedad de vías aéreas inferiores
20 (Garnett et al, 1982; Angus et al, 1997). Aunque las especies de β hS en el tracto respiratorio canino se evidencian por Biberstein et al, (1980) este estudio no pudo distinguir entre la conducción en el tracto respiratorio superior y el tracto respiratorio inferior. Además, incluso aunque el aislamiento se

realizó a partir de pacientes en hospitales veterinarios la razón para referencia y por lo tanto cualquier asociación a las condiciones clínicas específicas se omitió. La β hS más común en perros, *S. canis*, un *Streptococcus* Lancefield Group G, es un comensal normal de la mucosa genital y respiratoria así como de la piel (Timoney, 1987; Quinn et al, 1999). El *Streptococcus canis* (*S. canis*) previamente se ha aislado a partir de las amígdalas de 60 a 73% de perros sanos (Smith, 1967; Sadatsune y Moreno, 1975; Biberstein y Hirsh, 1999). *S. canis* ocasiona una variedad de infecciones esporádicas y oportunistas en perros, incluyendo neumonía, septicemia, abscesos, otitis, mastitis, piometra, proctitis, síndrome de choque tóxico y fascitis necrosante (Biberstein y Hirsh, 1999; Quinn et al, 1999).

Además de *S. canis* β hS de otros Lancefield Groups, tales como A, C y E, también se han aislado a partir de perros (Biberstein et al, 1980). *S. zooepidemicus*, Lancefield Group C, se encontró como un comensal de la mucosa del tracto respiratorio superior de mamíferos (Timoney et al, 1988; Quinn et al, 1999). Se asocia con diversos síndromes de enfermedad incluyendo enfermedad de vías aéreas inferiores, neumonía fetal y cervicitis en caballos (Chanter, 1997; Biberstein y Hirsh, 1999), neumonía en llamas (Biberstein y Hirsh, 1999), septicemia y artritis en cerdos (Timoney, 1987), mastitis en vacas y cabras (Timoney et al, 1988), septicemia en aves de corral, pericarditis y neumonía en corderos (Timoney, 1987), linfadenitis en conejillos de Indias (Quinn et al, 1999) y glomerulonefritis en humanos (Balter et al, 2000). En perros *S. zooepidemicus* ha sido asociado con infecciones de

heridas, septicemia (Quinn et al, 1999) y neumonía hemorrágica necrosante aguda (Garrett et al, 1982). En este estudio nosotros buscamos establecer cuáles especies de β hS están presentes en el tracto respiratorio tanto de perros sanos como de aquellos con CIRD.

5

Materiales y métodos

Poblaciones de estudio y muestreo.

La población del estudio principal (n=209, lavados bronquiales alveolares, BAL) comprendió animales a partir de una perrera para re-
10 alojamiento bien establecida (~600 perros) con una historia de CIRD endémica. A la entrada de la perrera todos los perros fueron vacunados con KAVAK DA₂ PiP69 (Fort Dodge) una vacuna viva atenuada para virus del desarreglo, CAV-2, CPIV y parvovirus canino y KAVAK L contra Leptospirosis.
15 La presencia de ambos coronavirus de canino (CRCV) y B. bronchiseptica se han demostrado en perros con CIRD en este centro (Chalker et al, 2003; Erles et al, 2003). Cada semana esta perrera debe sacrificar algunos perros por razones de seguridad y a partir de estos perros se seleccionaron 2-3 perros para toma de muestras. Las muestras BAL se tomaron mediante el siguiente
20 método a partir de un total de 209 perros individuales durante un período de 2 años de 1999 a 2001. Durante las primeras 2 horas después de la eutanasia las tráqueas fueron prensadas justo por arriba de la bifurcación para prevenir cualquier contaminación traqueal del pulmón durante la toma de muestras.

Utilizando un tubo de catéter estéril luego se colocaron 50 ml de solución salina balanceada de Hanks dentro del lóbulo pulmonar apical izquierdo. Luego este lóbulo pulmonar se masajeó manualmente por 30 segundos y se retiró la BAL. A los perros sacrificados también se les clasificó de conformidad con la severidad de la evaluación respiratoria clínica dentro de las siguientes categorías: (1) sin signos respiratorios, n=71 (2) tos leve, n=37 (3) tos y descarga nasal, n=76 (4) tos y descarga nasal con depresión y/o falta de apetito =9 (5) bronconeumonía supurativa, n=16.

Después de tomar la muestra de BAL se tomó una sección de tejido pulmonar a partir del lóbulo distal derecho para análisis histológico. Los bloques de tejido fijados en formalina (solución salina con formalina al 10%) se embebieron en parafina, y las secciones estándares teñidas con hematoxilina y eosina se observaron bajo un microscopio de luz (X40, X100, X400). La presencia o ausencia de neutrófilos intra-alveolares fue evidente.

El número total de días que cada perro pasó en la perrera se registró y el tiempo en la perrera se calculó en semanas. La edad y condición clínica a la entrada a la perrera de cada animal de registro y se realizó una evaluación compuesta de la condición clínica basada en el estado nutricional, pelaje, comportamiento, apetito y un examen clínico general (temperatura, velocidad de pulso, velocidad de respiración) como sigue: buena (1), mala (2), muy mala (3).

Se incluyó una población adicional de perros como un grupo control que comprendía de perros mascotas alojados con síntomas

AA

respiratorios clínicos con referencia a la bacteriología diagnóstica en el RVC durante un periodo de 2 años (1998 a 2000) (n=71, BAL). Las muestras a partir del grupo control se recolectaron utilizando una técnica guiada endoscópicamente como se describe por Cocoran (1998). Todas las muestras en el estudio se mantuvieron a 4°C hasta que se llevaron a cabo las pruebas bacteriológicas, y la evaluación durante las 24 horas de la toma de la muestra exceptuando el cálculo de CFU per ml que se llevó a cabo sobre BAL congelados.

10 Aislamiento bacteriano e identificación.

Un volumen de 50 µl de BAL se sembró por duplicado sobre placas de Agar Columbia Blood (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con 5% de sangre estéril de oveja, y se incubaron tanto aeróbicamente como anaeróbicamente por 24 horas a 37°C. Las colonias β-hemolíticas se identificaron y luego se purificaron hacia colonias particulares. Las bacterias Gram-positivas catalasa-negativas se identificaron como streptococci mediante morfología colonial y celular, y luego se seroagruparon mediante Aglutinación con perlas de látex en portaobjetos (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) hacia grupos Lancefield. Luego los aislados se identificaron al nivel de especie mediante utilización bioquímica y acción enzimática utilizando el equipo de identificación manual API20STREP (bioMérieux UK Ltd., Basingstoke, Reino Unido).

Con el objeto de identificar infecciones mezcladas 3 colonias a partir de los primeros 12 perros en el estudio se evaluaron tanto para Aglutinación con perlas de látex en portaobjetos como para API20STREP. Las diluciones seriales de BAL en solución salina con pH regulado con fosfato (Sigma-Aldrich Co. Ltd., Dorset, Reino Unido) se sembraron por triplicado, se incubaron como se describió anteriormente y se calcularon las CFU por ml de BAL. El crecimiento de hS se evaluó como sigue: ninguno (0), < 100 CFU por ml (1), 100 a 1000 CFU por ml (2), y > 1000 CFU por ml (3).

10 Análisis estadístico

Un nivel de importancia o probabilidad de un error tipo I (α) de 0.05 se supuso para todos los análisis. La presencia de *S. zooepidemicus* con la edad, condición clínica a la entrada a la perrera, semanas en la perrera, la presencia de neutrófilos Intra-alveolares y evaluaciones respiratorias clínicas se analizaron utilizando la prueba para análisis estadístico de X^2 con software Prism (versión 3.0, GraphPad Software Inc, San Diego, EUA). La correlación de crecimiento bacteriano y evaluación respiratoria se determinó mediante el uso de las evaluaciones medias combinadas para el crecimiento de *S. zooepidemicus* para cada evaluación respiratoria, se analizó con evaluación de Prism ANOVA de un sentido (no-paramétrica). La presencia de *S. canis*, *S. zooepidemicus* y la enfermedad respiratoria en los perros muestreados de la perrera con tiempo en semanas también se calculó.

Resultados

Los estreptococos β -hemolíticos se aislaron a partir de ambas poblaciones de estudio, y se aislaron a partir de BAL de mascotas alojadas que fue marcadamente diferente de las muestras de perros en la perrera (1.4% alojados, 23.9% en la perrera, análisis X^2 *** $p=0.000$). Todos los aislados hS se encontraron que son positivos a *S. canis* o a *S. zooepidemicus*. No se encontraron infecciones mezcladas con diferentes grupos Lancefield o especies, además todas las placas individuales produjeron colonias de morfología uniforme. Tanto *S. canis* como *S. zooepidemicus* se aislaron a partir de los perros muestreados de la perrera, mientras que solamente un aislado particular de *S. zooepidemicus* y no de *S. canis* se aisló a partir de las mascotas alojadas. Se encontró que *S. zooepidemicus* es la especie hS predominante en los perros muestreados de la perrera (92.0%). Se examinó la conducción de ambos *S. canis* y *S. zooepidemicus* en los perros muestreados de la perrera dentro de cada grado de evaluación respiratoria clínica (figura 1). *S. canis* estuvo presente tanto en perros con y sin evaluaciones clínicas, y el aislamiento no incrementó con la severidad de la enfermedad. En contraste, fue menos probable que los perros sanos tuvieran *S. zooepidemicus* en el tracto respiratorio inferior que los animales enfermos análisis X^2 , ** $p=0.004$) y el aislamiento de *S. zooepidemicus* se incrementó dramáticamente con la evaluación respiratoria clínica incrementada, a partir de 9.7% en perros sin síntomas a 87.5% en aquellos perros con bronconeumonía supurativa (análisis X^2 , *** $p=0.000$). Los perros con mayores evaluaciones respiratorias

también fueron más probables de tener una mayor media de evaluación de crecimiento bacteriano de *S. zooepidemicus* que los perros clínicamente sanos (análisis de ANOVA de un sentido *** $p=0.000$. R cuadrada = 0.194, $F=22.265$). La edad y condición clínica del animal a la entrada a la perrera no
5 tuvo efecto sobre el aislamiento de *S. zooepidemicus* (análisis X^2 , edad $p=0.341$, condición clínica a la entrada $p=0.295$).

El porcentaje de perros con CIRD en la perrera se incrementó dramáticamente de 21.1% en la semana 1 a 70.1% en la semana 2, y la CIRD no disminuyó en la población hasta después de la cuarta semana (figura 2).
10 Aunque no se detectaron diferencias significativas, el número de perros con *S. zooepidemicus* en el pulmón se incrementó por 20.6% con el tiempo en la perrera a partir de 16.7% en la semana 1 a 34.4% en la semana 3 (figura 2), mientras que no se observó dicha tendencia con *S. canis*.

El análisis histológico reveló que los perros con *S.*
15 *zooepidemicus* más probablemente tenían neutrófilos intra-alveolares que aquellos sin *S. zooepidemicus* (análisis X^2 , ** $p= 0.006$). En perros con evaluaciones bacterianas mayores, la neumonía supurativa aguda o la neumonía necrotizante con agregación de macrófago de moderada hacia marcada se evidenció más frecuentemente, similar a los hallazgos de Gamett
20 et al, (1982) en perros con neumonía estreptococal hemorrágica inducida por *S. zooepidemicus* (HSP). No fueron evidentes células bacterianas en las secciones teñidas con H y E.

Discusión

En este estudio nos enfocamos en las especies de *βhS* presentes en el tracto respiratorio inferior de perros caseros y perros mantenidos en perrera, con y sin enfermedad respiratoria. Aunque *S. canis* es la *βhS* predominante del tracto respiratorio en perros (Biberstein et al, 1980) y se aisló a partir del tracto respiratorio inferior de algunos perros mantenidos en perrera en este estudio, no estuvo asociada con CIRD en los perros mantenidos en perrera. En contraste, un aislamiento en incremento de *S. zooepidemicus* se asoció con la severidad en incremento de la CIRD. Los perros con cualquier síntoma respiratorio fueron más probablemente que tuvieran *S. zooepidemicus* en el tracto respiratorio inferior que los animales más sanos en la perrera y *S. zooepidemicus* se encontró en una proporción más baja de las mascotas alojadas en comparación con los perros mantenidos en la perrera.

Streptococcus equi sub especies zooepidemicus previamente ha sido asociada con HSP en perros (Garnett et al, 1982). El síndrome HSP fue una infección severa en una colonia cerrada de beagles, en la cual la muerte repentina resultante sin evaluaciones clínicas previas. Los hallazgos de la necropsia incluyeron exudados hemorrágicos abundantes dentro de la tráquea y del árbol bronquial, con enrojecimiento oscuro difuso de los pulmones. Además, se presentaron hemorragias equimóticas en un intervalo de otros tejidos. La enfermedad se reprodujo por inoculación intra-traqueal con *S. zooepidemicus* en un perro. De manera interesante en este estudio, los perros

con mayores evaluaciones de crecimiento de *S. zooepidemicus* fueron más probables para que tuvieran neutrófilos intra-alveolares y comparten características histológicas con los pulmones descritos por Garnett et al, (1982) en HSP en comparación con aquellos perros con bajas evaluaciones
5 de crecimiento.

La CIRD históricamente ha sido considerada como una enfermedad compleja, que implica tanto agentes bacterianos como virales. De hecho, se han descrito muchos otros agentes en esta población de perros mantenidos en perreras, incluyendo CRCV (Eries et al, 2003) y *B. bronchiseptica* (Chalker et al, 2003). Aunque el potencial patogénico de CRCV
10 no ha sido aclarado, los datos por Eries et al (2003) muestran que CRCV predomina en aquellos perros con enfermedad respiratoria leve (evaluación 2) y de manera similar Chalker et al (2003) encontró que los perros con *B. bronchiseptica* predomina en aquellos perros con enfermedad moderada
15 (evaluación 3).

Nosotros encontramos que *Streptococcus zooepidemicus* se asocia más comúnmente solamente con los casos más severos de CIRD (evaluación 4-5) indicando que puede actuar como un invasor secundario. De hecho, las especies β hS se han descrito previamente como invasores
20 secundarios en el "complejo" de la CIRD (McCandlish et al, 1978). Sin embargo, aún no se sabe si *S. zooepidemicus* desempeña un papel principal en la enfermedad respiratoria en estos animales o meramente invade el tracto respiratorio después del daño por otros patógenos. La evidencia

epidemiológica sugiere que en caballo *S. zooepidemicus* puede ser un patógeno principal en la enfermedad respiratoria (Wood et al, 1993; Chanter, 1997) pero generalmente se considera que es un patógeno oportunista (Walker y Timoney 1998; Anzai et al, 2000). Incluso si *S. zooepidemicus* no es una causa principal de la CIRD en estos perros, la alta relación de aislamiento a partir de los perros con bronconeumonía supurativa (87.5%) apoya la hipótesis de que *S. zooepidemicus* es responsable para los signos clínicos más severos observados en esta perrera. El bajo aislamiento a partir de las mascotas caseras (1.4%) con la enfermedad respiratoria indica que este agente puede no ser una infección respiratoria común y podría ser un problema particular en esta perrera. Aunque cualesquiera perreras previas no fueron tomadas en consideración es probable que algunos de los perros mascotas caseras en este estudio hayan sido mantenidos en perreras en algún momento. El papel desempeñado por *S. zooepidemicus* en otros casos de CIRD en perros mantenidos en perreras no ha sido evaluado.

El aislamiento de *S. zooepidemicus* a partir de estos perros se incrementa con el tiempo en la perrera, indicando que los pulmones de estos perros se infectan con esta bacteria. Dicha infección se podría presentar ya sea a partir de infecciones sub-clínicas del tracto respiratorio superior o a partir de una cepa patogénica particular. Un sistema de tipificación mediante un PCR para el gen de la proteína variable semejante a M SzP permite la separación de los 15 serotipos conocidos de *S. zooepidemicus* hacia cinco grupos distintos, HV1-5 (Walker y Timoney, 1998). Los análisis con este

sistema de tipificación por Anzai et al, (2000) encontraron que las variantes coloniales particulares de *S. zooepidemicus* se encuentran en el pulmón neumónico de equino mientras que los diversos tipos se encuentran en las amígdalas de los caballos sanos. Sería de interés sub-tipificar los aislados de

5 *S. zooepidemicus* implicados en esta epidemia de la CIRD para determinar si una variante colonial particular está presente en la población enferma, y también para examinar la relación, si existe alguna, de los aislados de *S. zooepidemicus* de canino que se tienen con relación a aquellos que ocasionan la enfermedad respiratoria en caballos y en otros animales. La neumonía

10 asociada con *S. zooepidemicus* se presenta en los caballos de todas las edades y la neumonía hemorrágica se presenta en caballos viejos que han sido estresados por el transporte (Anzai et al, 2000). En esta epidemia de CIRD los perros más jóvenes y aquellos con una mala condición clínica a las entrada a la perrera fueron igualmente susceptibles a la infección con *S.*

15 *zooepidemicus* como los perros más viejos y aquellos que estaban sanos a la entrada.

En esta terapia antibiótica de la perrera se proporciona un intervalo de infecciones, y el tratamiento no se otorga rutinariamente a los perros con CIRD excepto en los casos de bronconeumonía severa. Es posible

20 que el tratamiento podría haber influenciado el espectro bacteriano mencionado en este estudio. Sin embargo el examen de las epidemias naturales de la enfermedad respiratoria puede proveer información valiosa que no se puede obtener por medio de otros métodos.

Se sabe que la CIRDC es una enfermedad multi-factorial en la que participan diversos agentes incluyendo CAV-2, CPiV, *B. bronchiseptica* y *Mycoplasma spp.* En esta perrera en la cual grandes números de perros a partir de una variedad de las locaciones se reúnen y se alojan, están presentes varios patógenos y la severidad de la enfermedad puede reflejar esto.

EJEMPLO 2

La asociación de *Mycoplasma cynos* con enfermedad respiratoria

10

Infecciosa canina

La presencia de *M. cynos* se investigó mediante el cultivo del organismo y la identificación mediante análisis de PCR. En un estudio de 184 perros mantenidos en una perrera encontramos que el porcentaje de perros con *M. cynos* en la tráquea o pulmón se incrementa con los signos de la enfermedad respiratoria a partir de 10% en perros sanos a 31% en perros enfermos (figura 3).

Nosotros también notamos que la enfermedad respiratoria se incrementa con el tiempo en la perrera y de la primera semana en los perros que en la perrera no es detectable *M. cynos* en la tráquea, mientras que hacia la segunda semana 24% de los 184 perros fueron positivos para *M. cynos* en la tráquea indicando que 24% de la población había sido afectada con esta

bacteria. Un incremento similar pero más pequeño también se reservó para la colonización del pulmón (de 15% a 23%) (véase la figura 4).

EJEMPLO 3

5 La asociación de *Chlamydomophila* con enfermedad respiratoria infecciosa canina

Nosotros estudiamos 210 perros mediante análisis de PCR para la presencia de *Chlamydomophila*. Un fragmento de 218 pb del gen de ARNr 23 S se amplificó a partir de la *Chlamydomophila* mediante la siguiente PCR. Las condiciones de reacción, 95°C 5 minutos (x 1 ciclo), 95°C 30 segundos, 50°C 30 segundos, 72°C 1 minuto (x 40 ciclos) y 72°C 5 minutos. La mezcla de reacción de PCR de 50 µl total, incluyó 5.0 µl de regulador de pH libre de magnesio 10 x (Promega), MgCl₂ 1.5 mM (Promega), 0.5 µl de (0.5 Unidades) ADN polimerasa Taq (Promega), mezcla de nucleótidos para PCR 0.2 mM (Promega), iniciador hacia adelante 0.025 µg C1 (5'-GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAG GA-3', SEQ ID NO: 9) y iniciador reverso C2 (5'-TGGCTCATCATGCAAAAGGCA-3', SEQ ID NO: 10), 40 µl de agua y 2 µl de muestra de ADN del tejido.

20 Un producto de PCR obtenido a partir de 8 perros se confirmó como una *Chlamydomophila* mediante análisis de secuencia y comparación del producto de PCR con todas las secuencias disponibles en GenBank mediante análisis Fasta. La secuencia parcial del gen de ARNr 23 S de una de dichas

secuencias (DHBC10) se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO: 1). Esta secuencia de 218 pb es 99.08% idéntica a la misma región en *Chlamydomophila abortus* y 98.6% idéntica a *Chlamydomophila psittaci* y 96.3% idéntica a *Chlamydomophila felis* y sobre los análisis filogenéticos preliminares (método clustal con Megalign) la mayoría de los agrupamientos de secuencias se encuentran en una clada distinta (figura 7). Las secuencias parciales de ARNr 23 S de incluso otros aislados de *Chlamydomophila* se muestran en la figura 8 (SEQ ID NOs: 2-8).

En este estudio encontramos un incremento en la detección de *Chlamydomophila* con un incremento en la severidad de la enfermedad respiratoria tanto en la tráquea como en el pulmón. Se encontró un ligero incremento de detección de 10% en las muestras de la tráquea (de 25% a 34%). Se encontró una diferencia más dramática en la detección de *Chlamydomophila* en el pulmón, con un incremento de 0% perros sanos a 37.5% en perros con CIRD (figura 6). Además, se evidenció un incremento en el número total de perros que fueron positivos mediante PCR para *Chlamydomophila* de 25% en perros sanos a 50% en perros con enfermedad severa (figura 6).

EJEMPLO 4

La asociación de herpesvirus canino con enfermedad respiratoria

Infecciosa canina

5 Se encontró una dependencia incrementada de herpesvirus
canino en perros con síntomas respiratorios más severos (figura 9). Cuando
se monitorearon las respuestas al anticuerpo a CHV durante un período
tiempo de un año, los perros mantenidos en la perrera con epidemias
frecuentes de la enfermedad respiratoria mostraron seroconversiones a CHV
10 más frecuentemente (58.3%) que los perros a partir de una perrera
comparable sin epidemias (8.3%).

Referencias

Angus, J. C., Jang, S. S., Hirsh, D. C., (1997). Microbiological
15 study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory
tract disease: 264 cases (1989-1995). J Am. Vet. Med. Assoc. 210, 55-58.

Anzai, T., Walker, J. A., Blair, M. B., Chambers, T. M., Timoney,
J. F., (2000). Comparison of the phenotypes of *Streptococcus zooepidermicus*
isolated from tonsils of healthy horses and specimens obtained from foals and
20 donkeys with pneumonia. Am. J Vet. Res. 61, 162-166.

Appel MJ, Percy DH. SV-5-like parainfluenza virus in dogs.
(1970) J Am Vet Med Assoc. 1970 Junio 15; 156 (12): 1778-81

Appel, M., Binn, L. N., 1987. Canine Infectious Tracheobronchitis
Short review: Kennel Cough. En: Appel M. (Ed.), Virus Infections of
Carnivores. Elsevier. Oxford. pp. 201-211.

Arizmendi F, Grimes JE, Relford RL. (1992). Isolation of
5 Chlamydia psittaci from pleural effusion in a dog. J Vet Diagn Invest. 4 (4):
460-3.

Azetaka, M., Konishi, S., (1988). Kennel cough complex:
confirmation and analysis of the outbreak in Japan. Jap. J Vet. Sci. 50, 851-
858.

10 Balter, S., Benin, A., Pinto, S. W. L., Teixeira, L. M., Alvim, G. G.,
Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliot, J., Facklam, R., Schuchat, A.,
(2000). Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. Lancet. 355, 1776-1780.

Barile, M. F. (1985) Immunization against mycoplasma infections
p 451- 492. En S. Razin and M. F. Barile (Ed.) The Mycoplasmas, vol 4.
15 Mycoplasma pathogenicity. Academic Press, Inc, Orlando, Florida.

Barile M. F. et al., (1985). Current status on the controls of
mycoplasma diseases of man, animals, plants and insects. Bull. Inst. Pasteur.
83: 339- 373.

Bemis, D. A., Carmichael, L. E., y Appel, M. J. (1977a). Naturally
20 occurring respiratory disease in a kennel caused by Bordetella bronchiseptica.
Cornell Vet. 67, 282-93.

Bemis DA, Greisen HA, y Appel MJ. (1977b). Pathogenesis of
canine bordetellosis. J Infect Dis 135: 753-762.

Biberstein, E. L., Brown, C., Smith, T., (1980). Serogroups and Biotypes among beta-hemolytic streptococci of canine origin. J. Clin. Microbiol. 11, 558-561.

Biberstein, E. L., Hirsh, D. C., (1999). Streptococci. En: Hirsh, D. C., Zee, Y. C., (Eds.) Veterinary Microbiology. Blackwell Science. Oxford. pp 120-126.

Binn, L. N., Eddy, G. A., Lazar, E. C., Helms, J., y Mumane, T. (1967). Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. Proc Soc Exp Biol Med 126, 140-5

10 Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J, Rycroft AN. Respiratory Disease in Kennelled Dogs: Serological Responses to Bordetella bronchiseptica Lipopolysaccharide Do Not Correlate with Bacterial Isolation or Clinical Respiratory Symptoms. Clin Diagn Lab Immunol. 10 (3): 352-6. 2003

15 Chanter, N., (1997) Streptococci and enterococci as animal pathogens. J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 83, 100S-109S.

Cocoran, B. (1998). Cytological collection techniques. En: Luis Fuentes, V. Swift, S., (Eds.), Manual of small animal cardiorespiratory medicine and surgery. British Small Anim. Vet. Assoc. Cheltenham. pp. 75-79.

20 Ditchfield, J., Macpherson, L. W., y Zbitnew, A. (1962). Association of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("kennel cough"). Can. Vet. Jour. 3, 238-247

Ellis JA, Haines DM, West KH, Burr JH, Dayton A, Townsend HG, Kanara EW, Konoby C, Crichlow A, Martin K, Headrick G. (2001) Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 218 (3): 367-75. 2001

- 5 Erles, K., Toomey, C., Brooks, H. W., Brownlie, J. (2003). Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*. En prensa.

- Farrow JA, et al. (1984). "Taxonomic studies on *Streptococci* of serological groups C, G and L and possibly related taxa". *Syst. Appl. Microbiol.*
10 5: 483- 493.

Fraser G, Norval J, Withers AR, Gregor WW. (1985) A case history of psittacosis in the dog. *Vet Rec.* 1989 85 (3): 54-8.

- Fukushi H, Ogawa H, Minamoto N, Hashimoto A, Yagami K, Tamura H, Shimakura S, Hirai K. (1985) Seroepidemiological surveillance of
15 *Chlamydia psittaci* in cats and dogs in Japan. *Vet Rec.* 117 (19): 503-4.

Garnett, N. L., Eydeloth, R. S., Swindle, M. M., Vonderfecht, S. L., Strandberg, J. D., Luzarraga, M. B., (1982). Hemorrhagic streptococcal pneumonia in newly procured research dogs. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 1371-1374.

- 20 Gresham AC, Dixon CE, Bevan BJ. (1996) Domiciliary outbreak of psittacosis in dogs: potential for zoonotic infection. *Vet Rec.* 138 (25): 622-3.

Jang SS, Ling GV, Yamamoto R, Wolf AM. (1984) *Mycoplasma* as a cause of canine urinary tract infection. *J Am Vet Med Assoc* 185 (1): 45-7

Karpas, A., King, N. W., Garcia, F. G., Calvo, F., y Cross, R. E. (1968a). Canine tracheobronchitis: Isolation and characterization of the agent with experimental reproduction of the disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 127, 45- 52.

5 Karpas A, Garcia FG, Calvo F, Cross RE. (1968b) Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. *Am J Vet Res.* 29 (6): 1251-7.

Keil, D. J., y Fenwick, B. (1998). Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 10 15, 200-7.

Lambrechts N, Picard J, Tustin RC. (1999) Chlamydia-induced septic polyarthritis in a dog. *J. S Afr Vet Assoc.* 70 (1): 40-2).

Lou, T. Y., y Wenner, H. A. (1963). Natural and experimental infection of dogs with reovirus, type1: pathogenicity of the strain for other 15 animals. *Am. J. Hyg.* 77, 293-304.

McCandlish, I. A. P., Thompson, H., Cornwell, H. J. C., Wright, N. G., 1978. A study of dogs with kennel cough. *Vet. Rec.* 102, 298-301.

McKiernan, B. C., Smith, A. R., Kissil, M., 1982. Bacterial Isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. *J. Am. Anim. Hospl. Assoc.* 20 20, 139-142.

Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., Carter, G.R., (Eds.), 1999. *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby. pp. 129-130.

Randolph JF, Moise NS, Scarlett JM, Shin SJ, Blue JT, Bookbinder PR. (1993). Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. Am J Vet Res. Marzo; 54 (3):387-91.

Rosendal, S. (1972). Acta Vet. Scand. 13: 137.

Rosendal & Vinther (1977). Experimental mycoplasma pneumonia in dogs: electron microscopy of infected tissue. Acta Pathol Microbiol Scand [B] 85B (6): 462-5.

Rosendal, S. (1978). Canine Mycoplasmas: Pathogenicity of Mycoplasmas associated with distemper pneumonia. J. Infect. Dis. 138 (2), 203-210.

Sadatsune, T., Moreno, G., 1975. Contribution to the study of b-haemolytic streptococci isolated from dogs. Arq. Inst. Biol. Sao. Paulo. 42, 257-264.

Sako T, Takahashi T, Takehana K, Uchida E, Nakade T, Umemura T, Taniyama H. (2002) Chlamydial infection in canine atherosclerotic lesions. Atherosclerosis. 162 (2): 253-9.

Smith J. E., 1967. The aerobic bacteria of the nose and tonsils of healthy dogs. Comp. Path. 71, 28-433.

Storz, J. (1988) Microbiology of Chlamydia. p. 168 Ed A. L. Barron, Boca Raton, CRC Press.

Swango LJ, Wooding WL Jr, Binn LN. 1970. A comparison of the pathogenesis and antigenicity of infectious canine hepatitis virus and the A26-61 virus strain (Toronto). J Am Vet Med Assoc. 1970 Junio 15; 156 (12): 687-96.

5 Thompson H, McCandlish IAP, Wright NG: (1976) Experimental respiratory disease in dogs due to *Bordetella bronchiseptica*. Res Vet Sci 20: 16-23.

Thrusfield, M. V., Aitken, C. G. G., Murihead, R. H., (1991). A field investigation of kennel cough: incubation period and clinical signs. J. Small Anim. Pract. 32, 215-220.

Timoney, J. F. (1987). The Streptococci. En: Gyles, C. L., Thoen C. O., (Eds.) Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University Press. pp. 12-13.

Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W., Barlough, J. E., (Eds), 1988. The Genus *Streptococcus*. En: Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. Comstock Publishing Associates, Londres. pp. 181-187.

Ural O, Tuncer I, Dikici N, & Aridogan B. (2003). *Streptococcus zooepidemicus* meningitis and bacteraemia. Scand J Infect Dis. 35 (3): 206-207.

Walker, J. A., Timoney, J. F., (1998). Molecular basis of variation in protective SzP proteins of *Streptococcus zooepidemicus*. Am. J Vet. Res. 59, 1129-1133.

169

X72

Walker RL & Runyan CA (2003). Identification of variations in SzP proteins of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* and the relationship between protein variants and clinical signs of infection in horses. *Am J Vet Res.* 64 (8): 976-81.

5 Werth D, Schmeer N, Muller HP, Karo M, Krauss H. (1987). Demonstration of antibodies against *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* in dogs and cats: comparison of the enzyme immunoassay, immunoperoxidase technic, complement fixation test and agar gel precipitation test *Zentralbl Veterinarmed B.* 34 (3): 165-76.

10 Wood, J. L. N., Burrell, M. H., Roberts, C. A., Charter, N., Shaw, Y., (1993). *Streptococci* and *Pasteurella* spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. *Equine Vet. J.* 25, 314-318.

 Young S, Storz J, Maierhofer CA. (1972) Pathologic features of experimentally induced chlamydial infection in dogs. *Am J Vet Res.* 33(2):
15 377-83.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna para vacunación de perros que comprende cualquiera o más de: (a) un agente capaz de generar una
5 respuesta inmune contra *Streptococcus equi sub especies zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro.

10 2. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro comprende *S. zooepidemicus* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica
15 dicha fracción o dicho derivado.

3. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos* o un
20 derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

4. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz

de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila* comprende *Chlamydomphila abortus* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *Chlamydomphila abortus* o un derivado de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

5 5. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila* comprende *Chlamydomphila psittaci* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *Chlamydomphila psittaci* o un derivado de la misma, o un
10 ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

6. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila* comprende *Chlamydomphila felis* inactivada o atenuada, o un fragmento
15 inmunogénico de *Chlamydomphila felis* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

7. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra una *Chlamydomphila*
20 comprende *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia suis* o *Chlamydia trachomatis* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de las mismas, o un derivado de las mismas, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

8. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

9. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera
5 de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada además porque comprende adicionalmente cualesquiera uno o más de: (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra coronavirus respiratorio canino (CRCV); (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro
10 contra parainfluenzavirus de canino (CPIV); (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra adenovirus tipo 2 canino (CAV-2);
(g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra herpesvirus de canino (CHV); y (h) un agente capaz de generar una respuesta
inmune en un perro contra *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*).

10. La composición de vacuna de conformidad con la
15 reivindicación 9, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV comprende CRCV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de los mismos, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

11. La composición de vacuna de conformidad con la
20 reivindicación 10, caracterizada además porque el fragmento inmunogénico de CRCV comprende la proteína Spike o la proteína hemaglutinina-esterasa (HE), o una porción inmunogénica de la proteína Spike o HE.

12. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV comprende CPIV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

13. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2 comprende CAV-2 inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

14. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV comprende CHV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

15. La composición de vacuna de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizada además porque el agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* comprende *B. bronchiseptica* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

16. Una composición que comprende cualesquiera uno o más de: (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydophila* en un perro, para uso en medicina.

17. La composición de conformidad con la reivindicación 16, para uso en medicina veterinaria.

18. La composición de conformidad con la reivindicación 17, para uso en medicina veterinaria canina.

19. La composición de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 16 a 18, caracterizada además porque comprende adicionalmente cualquiera o más de: (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CRCV; (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV; (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2; (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

20. Un método para elaborar un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydophila* que comprende generar una respuesta inmune a cualquiera o más respectivos entre *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydophila*, o un fragmento inmunogénico de los mismos en un animal, y preparar un

anticuerpo a partir del animal o a partir de una célula inmortal derivada a partir de éste.

21. Un método para obtener un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila* que comprende seleccionar un anticuerpo a partir de una librería para exhibición de anticuerpo utilizando cualquiera o más respectivos entre *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*, o un fragmento inmunogénico de los mismos.

22. Un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*.

23. Una composición que comprende cualquiera dos o más de un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, un anticuerpo que se une específicamente a *M. cynos*, y un anticuerpo que se une específicamente a una *Chlamydomphila*.

24. La composición de conformidad con la reivindicación 23, caracterizada además porque comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera o más de CRCV, CPIV, CAV-2, CHV, y *B. bronchiseptica*.

25. Una composición de vacuna que comprende: (b) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (d) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CRCV en un perro.

26. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada además porque comprende adicionalmente

177

cualquiera o más de: (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro; (e) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CPIV; (f) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2; (g) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y (h) un agente capaz de generar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica*.

27. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 25 ó 26, caracterizada además porque comprende adicionalmente: (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro.

28. Un método para determinar si un perro ha sido expuesto a una especie de *Chlamydomphila* asociada con CIRD, el método comprendiendo: (a) obtener una muestra adecuada a partir del perro; y (b) identificar una especie *Chlamydomphila* asociada con CIRD, o un anticuerpo a la misma, en la muestra.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque la especie *Chlamydomphila* asociada con CIRD tiene ARNr 23S que comprende la secuencia (cuando se muestra como RNA) de cualesquiera de SEQ ID No: 1 a 8.

30. Un método para determinar si un perro tiene o es susceptible a CIRD, el método comprende: (a) obtener una muestra adecuada a partir del perro; y (b) identificar cualquiera o más de *S. zooepidemicus* o *M. cynos* o *Chlamydomphila*, o un anticuerpo a cualesquiera de éstos, en la muestra.

ABD

31. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado además porque el *S. zooepidemicus* o *M. cynos* o *Chlamydomphila* se identifica utilizando un anticuerpo.

32. El método de conformidad con la reivindicación 30,
5 caracterizado además porque el *S. zooepidemicus* o *M. cynos* o *Chlamydomphila* se identifica utilizando un ácido nucleico.

33. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado además porque el anticuerpo anti-*S. zooepidemicus* se detecta utilizando un *S. zooepidemicus* o una porción antigénica del mismo.

10 34. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado además porque el anticuerpo anti-*M. cynos* se detecta utilizando un *M. cynos* o una porción antigénica del mismo.

35. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado además porque el anticuerpo anti-*Chlamydomphila* se detecta
15 utilizando una *Chlamydomphila* o una porción antigénica del mismo.

36. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 28 a 34, caracterizado además porque la muestra es una muestra que contiene anticuerpo tal como suero, saliva, lavado traqueal o lavado branquiolar.

20 37. Un ensayo inmunoabsorbente para detectar anticuerpos asociado con CIRD, el ensayo comprendiendo: una fase sólida revestida con cualquiera o más de (a) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; (b) un agente capaz de generar una

respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y (c) un agente capaz de generar una respuesta inmune contra una *Chlamydomphila* en un perro; y una marca conjugada detectable la cual se unirá a los anticuerpos unidos a la fase sólida.

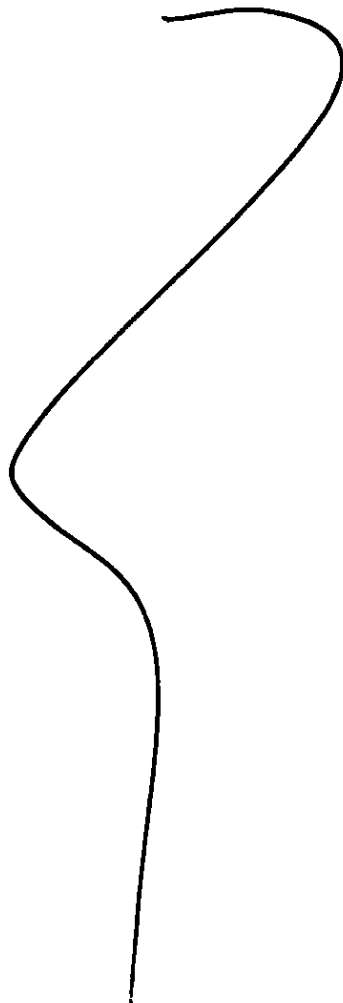
5 38. El ensayo inmunoabsorbente de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado además porque la fase sólida contiene cualquiera de dos o tres de (a), (b) y (c).

39. Un sustrato de fase sólida revestido con cualquiera entre uno o dos o los tres de (a), (b) y (c) como se define en la reivindicación 37.

10

15

20



Listado de Secuencias

- <110> THE ROYAL VETERINARY COLLEGE
<120> Composición de vacuna
<130> RUCV/P30948PC
<140> PCT/GB2004/002865
<141> 2004-07-01
<150> GB 0315323.6
<151> 2003-07-01
<160> 10
<170> SeqMin99
<210> 1
<211> 218
<212> DNA
<213> Desconocido
<220>
<223> Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chamydophila aislada de perro con enfermedad respiratoria infecciosa canina (CIRD)
<400> 1
agtggctctc ccagattcag actaggtttc acgtgcctag cccactcag gtatcgata 60
gagctctctg tttttctgtc tccgagcta tccacctga tcttctact ttccagaagt 120
attcgactaa aacttaagt cccatgttat cgacctaca accccacatt aaaaatgttg 180
tttggtatc tccctttcg cccgcgcta cacaggga 218
<210> 2
<211> 221
<212> DNA
<213> Desconocido
<220>
<223> Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chalanydophila aislada de perro con CIRD
<400> 2
gacagtgttc tcccagatt cavactaggt ttccgtgtc tagccctact caggratoga 60
ctagagtctc ttgttttttc gtctacggga ctatcacct gtatcgttct actttccaga 120
agtattcgac taaaacttaa gatcccatgt tatcgacct acaacccac attaaaaatg 180
cggtttggtc ttctccctt tgcctgcgg ctacacaggg a 221
<210> 3
<211> 224
<212> DNA
<213> Desconocido
<220> Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chalanydophila
<223> aislada de perro con CIRD
<400> 3

```

tgagagtggc tccccagat tcagactagg ttccacgtgt ctagecctac tcaggtatcg 60
atagagtct cttgttttt cgtctacggg actaacaccc tgtatcgttc tactttccag 120
agtattcga ctaaaactta agatcccatg ttatcgaacc tataacocca cattaaaaac 180
gtggtttggc cttctccctt ttctgctcgk csgytatcac aggg 224

```

<210> 4
 <211> 221
 <212> DNA
 <213> Desconocido

<220> Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chalanydophila
 <223> aislada de perro con CIRD

```

<400> 4
gadagtggc tccccagatt cadactaggc ttccacgtgc tagcctact caggtatcga 60
atagagtct cttgtttttt gctctacggg ctatcaccc tttatcgttc acttttcaga 120
agtattcga caawcttaa gatcccatgt tatcgacct accacccac attwwwaatg 180
tgglttggc ttctccctt tygctcgcc ctacacagg a 221

```

<210> 5
 <211> 217
 <212> DNA
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chalanydophila
 aislada de perro con CIRD

```

<400> 5
tgagagtggc tccccagat tcagactagg tttcacgtgt ctagecctac tcaggtatcg 60
aatagagtct cttgtttkt cgtctacggg actatcaccc tgtatcgttc tactttccca 120
gaagtattcg actaaaact taagatcccc atgtrattcga cctacaacc cccacatdas 180
aaagtgggtt tggctttct ccttttgcgt cgcgct 217

```

<210> 6
 <211> 221
 <212> DNA
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chalanydophila
 aislada de perro con CIRD

```

<400> 6
gabagtggc tccccagatt cagactaggc ttccacgtgc tagcctact caggtatcga 60
atagagtct cttgtttttt gctctacggg ctatcaccc tttatcgttc acttttcaga 120
agtattcga caaaacttaa gatcccatgt tatcgacct accacccac attaaaaatg 180
tggtttggc ttctccctt togtcgccg ctactcagg a 221

```

<210> 7
 <211> 220
 <212> DNA
 <213> Desconocido

<220>

<223> **Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chalanydophila aislada de perro con CIRD**

<400> 7
 tgagag-ggt cccccagat tcagtcaaa tctcaegtgt tccgaccccac tcaggatact 60
 attagattta ttgagaatht taattucagg agtateccct tctatgctct agtttccaac 120
 taattcctct attctcttta attacacatt atagtcctac saccccccnaa lgcaagcctt 180
 ggggttgctc taatcccagt tegtctgccc ctacacuggg 220

<210> 0
 <211> 220
 <212> DNA
 <213> Desconocido

<220>
 <223> **Secuencia del gen ARNr 23S parcial de Chalanydophila aislada de perro con CIRD**

<220> 13
 <222> 174
 <223> N puede ser A, C, G, o T

<400> 8
 tgagagtggt stccccagat tcagactagg ttccaegtgt ctggccctac tcagggtatcg 60
 aatagagctct sttgcttttt tgcctacgag actatcaccc tgtatcggtc tactttccag 120
 aagtattcga ctaaaactta agatcccatg ttatcgaccc tacaacccca catnaaaaat 180
 gtggtttggt ctctccccc ttcgtctgcc gctacacagg 220

<210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> **Plantilla de PCR**

<400> 9
 gatgccttgg cattgatagg cgatgaag 28

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> **Plantilla de PCR**

<400> 10
 tggctcatca tgcaaaaggc a 21

FIGURA 1

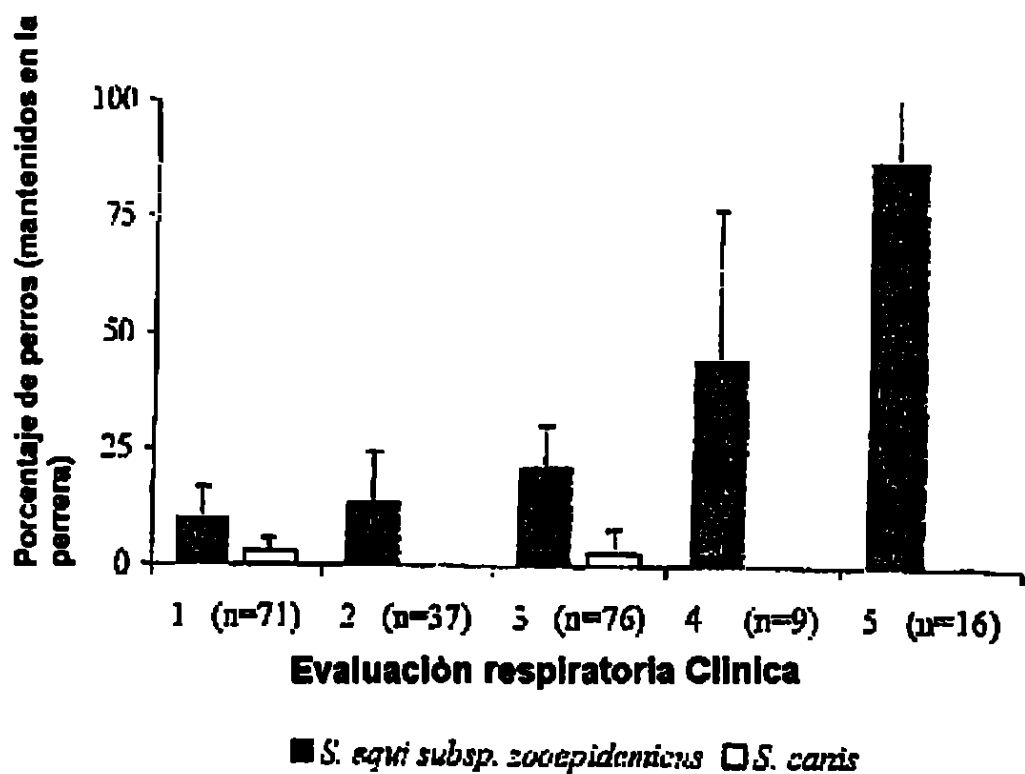


FIGURA 2

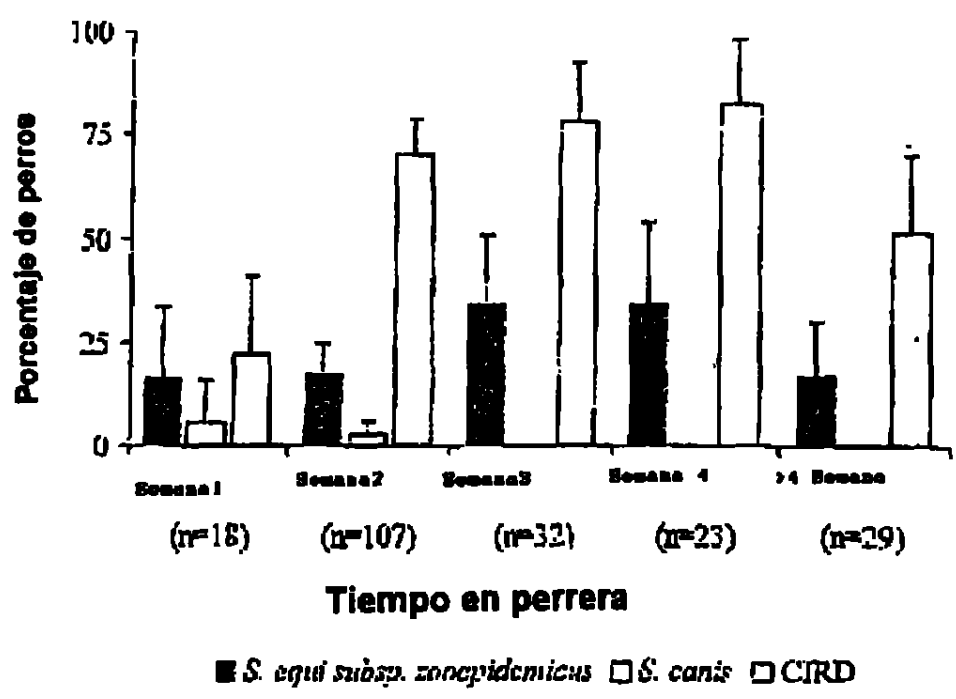


FIGURA 3

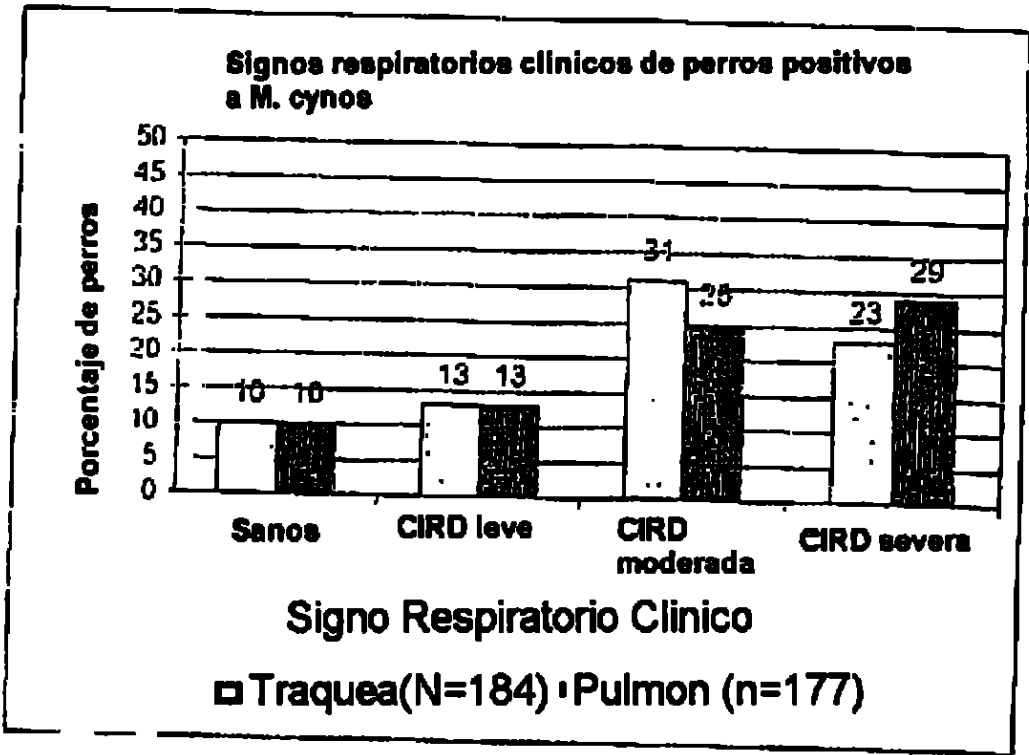


FIGURA 4

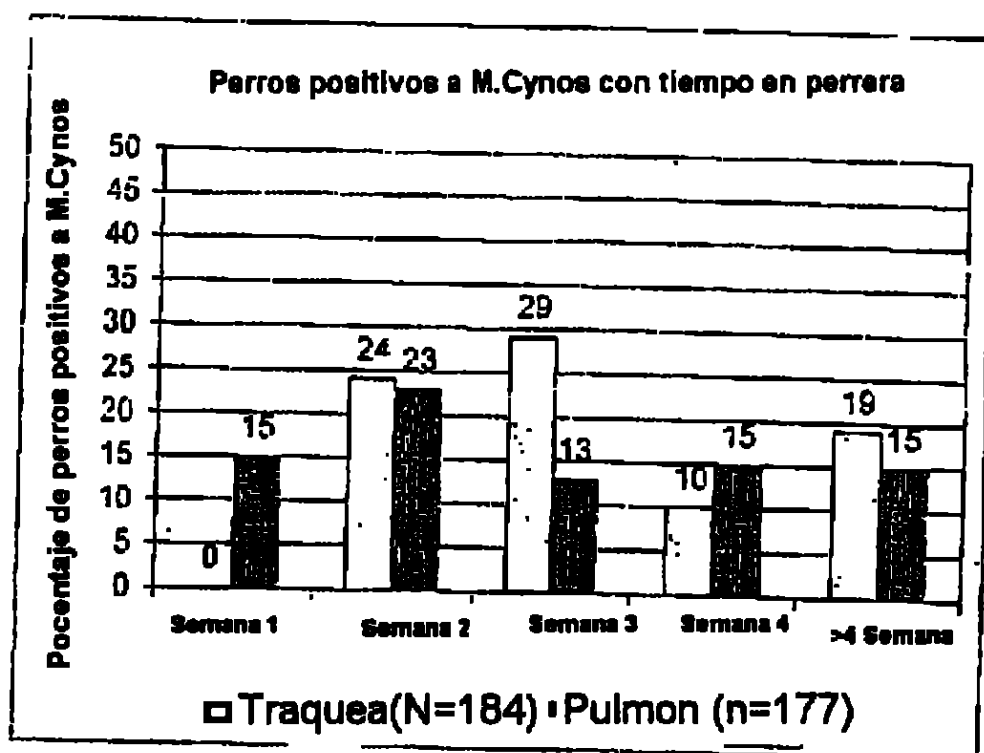


FIGURA 5

ASTGTTCTCC CCGAATTCAG ACTAGGTTTC ACCTGCCCTAG CCCTACTCAG
CTATCGAATA GAGTCTCTTG TTTTCTCGTC TACGGGACTA TCACCCTGTA
TCGTTCTACT TTCCAGAGT ATTGGACTAA AACTTAAGAT CCCATGTTAT
CGACCCTACA ACCCCACATT AAAATGTGG TTTGGTCTTC TCCCCTTTTG
CTCGCCSCTA CACAGGGA (SEQ ID NO: 1)

FIGURA 6

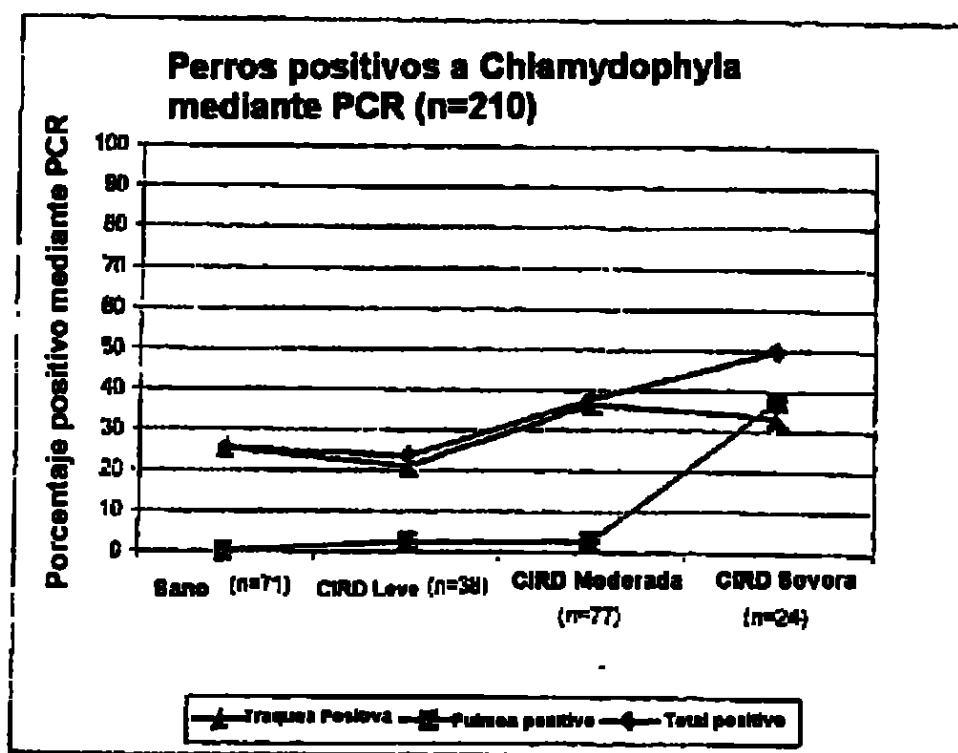


FIGURA 7

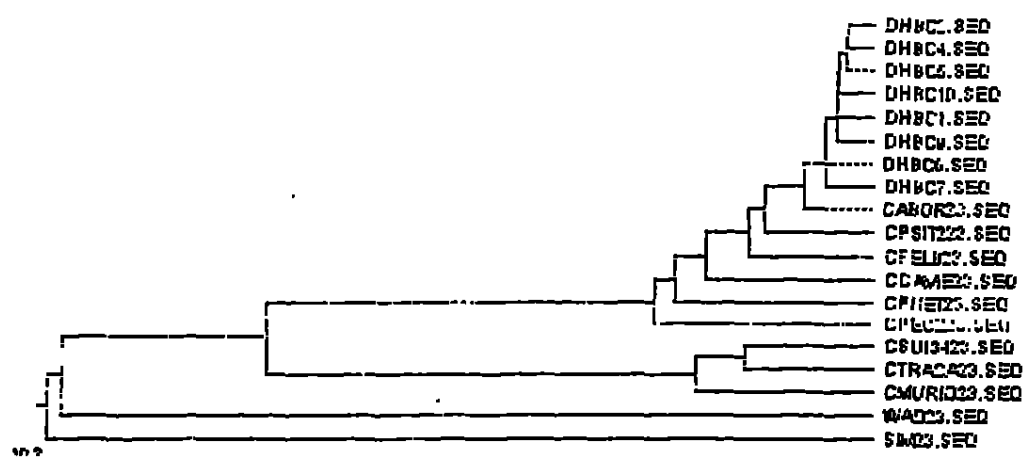


FIGURA 8

DHBC2

GACAGTGGTC TCCCCAGATT CACTACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTTC GTCTACGGGA CTATCACCCCT
 GTATCGTTCT ACTTTCCAGA AGTATTGAC TAAAACTTAA GATCCCATGT
 TATCGACCCCT ACAACCCCAAC ATTAAATATG TGGTTTGGTC TTCTCCCCTT
 TCGCTCGCCG CTACACAGGG A (SEQ ID NO: 2)

DHBC4

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TTTCACGTGT CTAGCCCTAC
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTTT CGTCTACGGG ACTAACACCC
 TGTATCGTTC TACTTTCCAG AAGTATTCGA CTAAAACTTA AGATCCCATG
 TTATCGACCC TACAACCCCA CATTAATAAT GTGGTTTGGT CTTCTCCCCT
 TTTCGCTCGK CCGYTATCAY CAGGG (SEQ ID NO: 3)

DHBC5

GADAGTGGTC TCCCCAGATT CADACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTTC GTCTACGGGA CTATCACCCCT
 GTATCGTTCT ACTTTCCAGA AGTATTGAC TAAWWCTTAA GATCCCATGT
 TATCGACCCCT ACAACCCCAAC ATTWWWWATG TGGTTTGGTC TTCTCCCCTT
 TYGCTCGCCG CTACACAGGG A (SEQ ID NO: 4)

DHBC6

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TKTCACGTGT CTAGCCCTAC
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTTKT CGTCTACGGG ACTATCACCC
 TGTATCGTTC TACTTTCCCA GAAGTATTCG ACTAAAHCT TAAGATCCCC
 ATGTTATCGA CCCTACAAAC CCCACATDAA AAATGTGGTT TGGTCTTCTC
 CCCTTTGCTT CGCCGCT (SEQ ID NO: 5)

DHBC7

GABAGTGGTC TCCCCAGATT CAGACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTTC GTCTACGGGA CTATCACCCCT
 GTATCGTTCT ACTTTCCAGA AGTATTGAC TAAAACTTAA GATCCCATGT
 TATCGACCCCT ACAACCCCAAC ATTAAAAATG TGGTTTGGTC TTCTCCCCTT
 TCGCTCGCCG CTACTCAGGG A (SEQ ID NO: 6)

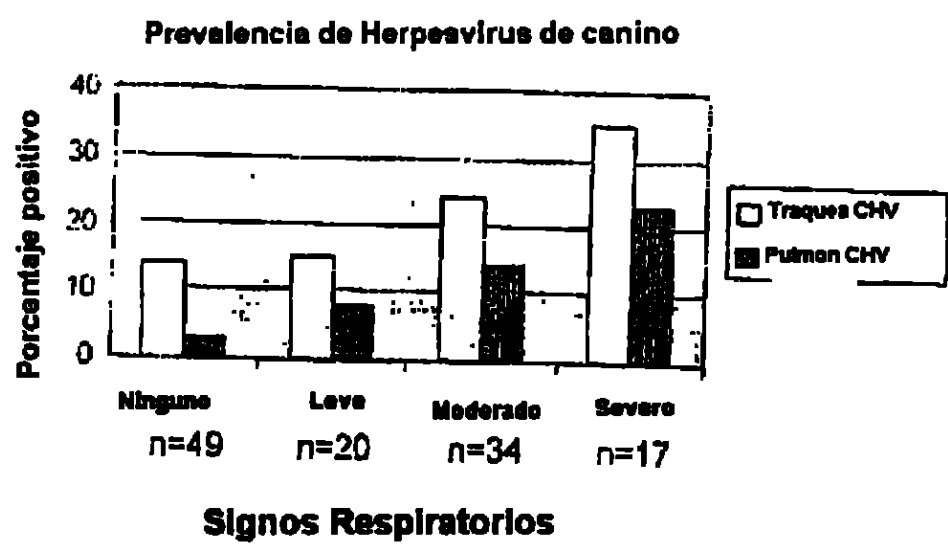
DHBC8

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGTCAAAA TATCAGGTGT TCCGACCTAC
 TCAGGATACT ATTACTATTA TTGACATNPT TAATTACAGG AGTATCACCT
 TCTATGCTCT AGTTTCCAAC TAATTCATCT ATTCTCTTTA ATTACACATT
 ATAGTCCTAC AAACCCCMMAA TGCAAGCATT GGGTTTGTCC TAATCCCAGT
 TCGCTCGCCG CTACACAGGG (SEQ ID NO: 7)

DHBC9

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TTTCACGTGT CTAGCCCTAC
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTTT TGTCTACGGG ACTATCACCC
 TGTATCGTTC TACTTTCCAG AAGTATTCGA CTAAAACTTA AGATCCCATG
 TTATCGACCC TACAACCCCA CATTAATAAT GTGGTTTGGT CTTCTCCCCT
 TTCGCTCGCC GCTACACAGG (SEQ ID NO: 8)

FIGURA 9



192



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 80
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 186
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

195

193

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

REFERENCIA	Radicación No.	6 6744
	Solicitud internacional	GB2004/002865
	Fecha inicio fase nacional	01/02/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2660

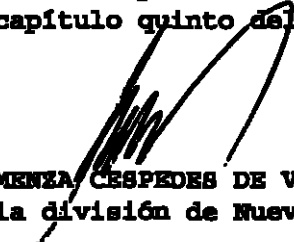
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 03 MAR 2006
jramos

196