



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIV
DE PATENT
INVENCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-184698-00000-0000

Fecha: 2013-08-02 16:39:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

TITULO: COMPOSICIONES PARA EL COMPLEJO DE ENFERMEDAD
RESPIRATORIA CANINA

SOLICITANTE: ZOETIS LLC.

DIRECCIÓN: 100 Campus Drive, Florham Park, New Jersey 07932.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 02 de agosto de 2013

P2013/000139

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. Poderes, si fuere el caso.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 417(ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

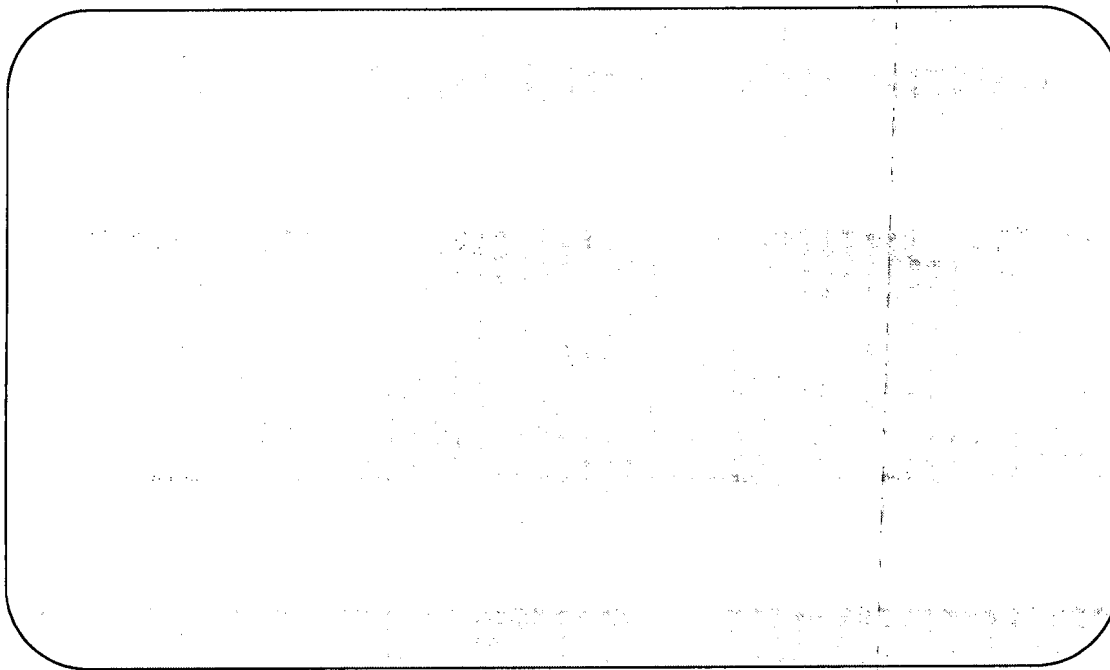
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

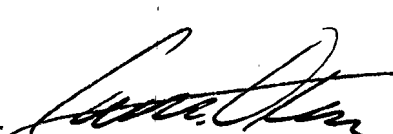
FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0075342
		Bogotá D.C., Julio 29 de 2013 - 16:26:14

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532446283	25/07/2013	8.925.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1. TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>
		=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-184698- -00000-0000
Fecha: 2013-08-02 16:39:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

4

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2012/050510

Omar Yousif ABDELMAGID

5958 Baywood Drive
Portage, MI 49024
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Joseph Michael BRICKER

9097 Richland Woods Drive
Richland, MI 49083
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Shelly Lynn SHIELDS

12200 Pine Lake Road
Plainwell, MI 49080
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

VF-100-100

OLARTEMOURE
OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

General Power

The undersigned,

domiciled in
100 Campus Drive, Florham Park, New Jersey 07932, United States of America

hereby appoint to **Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure** legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

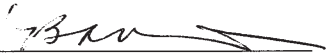
El suscrito,
ZOETIS P LLC

domiciliado en
100 Campus Drive, Florham Park, New Jersey 07932, United States of America

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure** nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual en la República de Colombia, República de Bolivia, República de Ecuador, República de Perú y la República Bolivariana de Venezuela ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones; formular enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Carlos R. Olarte
Juan G. Moure
Alexander Agudelo
Carlos A. Parra
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mónica Guevara
Andrés Alvarado
Ella Ponce
Liliana Galindo
María Clara Calderón
Mauricio Ávila
Laura Escobar
José Jairo Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid

Medellín
María Clara Múnera

Signature/Firma: 
Barbara L. Renda, Attorney-in-Fact Zoetis P LLC

Date/Fecha: 4 April 2013

City,Country/Ciudad,País: New Jersey, United States of America.

PCT

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application PFIZER INC., 61/439,597 Filed: 4 February 2011 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from ABDELMAGID, Omar Yousif to PFIZER INC., dated 11 February 2011 (11.02.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from BRICKER, Joseph Michael to PFIZER INC., dated 15 February 2011 (15.02.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from SHIELDS, Shelly Lynn to PFIZER INC., dated 15 February 2011 (15.02.2011)

PCT

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application PFIZER INC, 61/470,084, Filed: 31 March 2011 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i v)		an assignment from ABDELMAGID, Omar Yousif to PFIZER INC., dated 01 April 2011 (01.04.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from BRICKER, Joseph Michael to PFIZER INC., dated 14 April 2011 (14.04.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from SHIELDS, Shelly Lynn to PFIZER INC., dated 31 March 2011 (31.03.2011)



(51) International Patent Classification:

A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/10 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2012/050510

(22) International Filing Date:

3 February 2012 (03.02.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/439,597 4 February 2011 (04.02.2011) US
61/470,084 31 March 2011 (31.03.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ABDELMAGID, Omar, Yousif** [SD/US]; Pfizer Global Research & Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001 (US). **BRICKER, Joseph, Michael** [US/US]; Pfizer Global Research & Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001 (US). **SHIELDS, Shelly, Lynn** [US/US]; Pfizer Global Research & Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001 (US).(74) Agent: **KLEIMAN, Gabriel**; Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

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

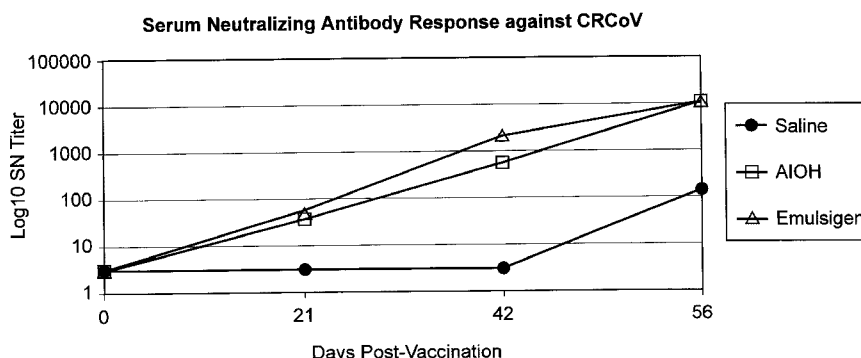
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS FOR CANINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX

FIG. 1

(57) Abstract: Provided herein are compositions comprising a canine influenza virus and a canine respiratory coronavirus. They can further comprise *Bordetella bronchiseptica*, pertactin, canine parainfluenza virus, and canine adenovirus serotype 2. The compositions are effective for treating or preventing canine respiratory diseases, including canine infectious respiratory disease complex.



Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

COMPOSITIONS FOR CANINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of immunology, and in particular to the field of immunogenic and vaccine compositions. It relates to such compositions for use against canine respiratory diseases, including canine infectious respiratory disease complex (CIRDC). The present invention also relates to methods for vaccinating against, treating, or preventing canine respiratory diseases in a canine.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Canine infectious respiratory disease complex (CIRDC) is a highly contagious disease that is common in dogs housed in crowded conditions, such as re-homing centers and boarding or training kennels. Many dogs suffer only from a mild cough and recover after a short time. However in some cases, a severe bronchopneumonia can develop.

The pathogenesis of CIRDC is considered to be multifactorial, involving several viruses and bacteria. Infectious agents known to be causative agents of CIRDC include canine respiratory coronavirus (CRCoV) (Erles et al., Virology, 310(2):216-223, 2003), canine influenza virus (CIV) (Crawford et al., Science, 310(5747):482-485, 2005), canine parainfluenzavirus (CPIV) (Binn et al., Exp. Biol. Med., 126:140-145, 1967), canine adenovirus serotype 2 (CAV-2) (Ditchfield et al., Can. Vet. J., 3:238-247, 1962), *Mycoplasma cynos* (Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004), and the bacterium *Bordetella bronchiseptica* (Bemis et al., Lab. Anim. Sci., 29:48-52, 1977).

CRCoV causes a highly contagious respiratory infection which is spread by direct dog-to-dog contact, aerosols of respiratory secretions, and contact with contaminated environments or people. Some dogs have a mild disease with symptoms consisting of cough, sneezing, and nasal discharge. Some dogs have a subclinical infection with no clinical signs, yet they shed virus that can infect other

dogs. Some dogs infected with CRCoV progress to pneumonia, particularly if co-infected with other respiratory pathogens.

Regarding CIV, equine influenza virus has been recognized as a major respiratory pathogen in horses since about 1956. Disease symptoms caused by equine influenza virus can be severe, and are often followed by secondary bacterial infections. Two subtypes of equine influenza virus are recognized, namely subtype-1, the prototype being A/Equine/Prague/1/56 (H7N7), and subtype-2, the prototype being A/Equine/Miami/1/63 (H3N8). Presently, the predominant virus subtype is subtype-2, the H3N8 strain. An influenza virus, H3N8 equine influenza virus, is able to infect canines, with fatalities in some cases as high as 36%. One explanation is that an interspecies transfer of the complete or a portion of the equine influenza virus to the dog resulted in a new canine specific influenza virus associated with acute respiratory disease (Crawford et al., 2005).

Disease caused by CPIV is common in the upper respiratory tract. Disease caused by CPIV alone can be mild or subclinical, with signs becoming more severe if concurrent infection with other respiratory pathogens occurs.

CAV-2 causes respiratory disease which, in severe cases, can include pneumonia and bronchopneumonia.

B. bronchiseptica has been reported as being a primary etiological agent in the respiratory disease tracheobronchitis or "kennel cough". It predisposes dogs to the influence of other respiratory agents, and frequently exists concurrently with them. Kennel cough is typically a condition of the upper airways, and is characterized by nasal discharge and coughing. To date, a number of vaccines are available for treatment of tracheobronchitis caused by *Bordetella bronchiseptica*, including Nobivac®, Bronchi-Shield®, Bronchicine® CAe, Vanguard® B, Univac 2, Recombitek® KC2, Naramune™-2 and Kennel-Jec™ 2. However, the majority of existing commercial vaccines require cumbersome intranasal administration as well as the addition of adjuvants, which can result in deleterious side-effects, such as burning and irritation. Viera Scheibner et al., *Nexus* Dec 2000 (Vol 8, No1). Subunit vaccines, such as those involving the use of p68 protein of *Bordetella bronchiseptica*

(pertactin), have been explored but to date have not been included in any commercial canine vaccines, possibly due to insufficient immunogenicity, adverse reactions, and/or formulation stability.

The pathology of CIRDC indicates that it is involved in lung damage and, in some cases, bronchopneumonia, but it is distinct from kennel cough (primary etiological agent: *B. bronchiseptica*) which mainly involves upper respiratory tract changes. Kennel cough is a milder syndrome than CIRDC, and does not have the wide range of pathology noted in CIRDC. CIRDC is also distinguished by an increased severity and mortality.

CIRDC is rarely fatal, but it delays re-homing of dogs at rescue centers, disrupts schedules in training kennels, and results in considerable treatment costs and welfare concerns. Vaccines are available against some of the infectious agents associated with CIRDC. However, despite the use of these vaccines, CIRDC is still prevalent world-wide, possibly due to the lack of efficacious vaccines against all the infectious agents involved in CIRDC.

Accordingly, there remains a need for an immunogenic composition, capable of being safely administered to a canine, which provides long-acting immunoprotection against the agents that cause CIRDC without deleterious side effects or interference with other antigens in a combination vaccine. The present disclosure fulfils these and other related needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention generally relates to immunogenic compositions which provide antigens that treat or prevent CIRDC. In one embodiment, an immunogenic composition comprises a canine influenza virus (CIV) and a canine respiratory coronavirus (CRCoV). In another embodiment, the immunogenic composition further comprises a *Bordetella bronchiseptica*. In another embodiment, the immunogenic composition further comprises an isolated pertactin antigen. In another embodiment, the immunogenic composition comprises a p68 pertactin antigen. In another embodiment, the pertactin antigen is a recombinant protein. In yet another

embodiment, the pertactin antigen is present at between about 1 µg and about 30 µg. In another embodiment, said pertactin antigen is prepared by solubilizing pertactin inclusion bodies in urea and optionally purifying by column chromatography. Said pertactin antigens are soluble and preferably substantially free of aggregates. In
5 another embodiment, the *Bordetella bronchiseptica* is a bacterin or a bacterial extract.

In one embodiment, the immunogenic composition comprises a CIV, a CRCoV, a *Bordetella bronchiseptica* and one or both antigens selected from canine parainfluenza virus (CPIV) and canine adenovirus type 2 (CAV-2). In another
10 embodiment, said immunogenic composition further comprises a p68 pertactin antigen. In another embodiment, the *Bordetella bronchiseptica* is a bacterin or a bacterial extract.

Another embodiment provides an immunogenic composition comprising a CIV, CRCoV, a *Bordetella bronchiseptica* component comprising *Bordetella*
15 *bronchiseptica* and an isolated pertactin antigen, and one or both antigens selected from canine parainfluenza virus (CPIV) and canine adenovirus type 2 (CAV-2). In a further embodiment, the immunogenic composition comprises both CPIV and CAV-2.

In another embodiment, the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments further comprises an isolated Bsp22 antigen.

20 In another embodiment, the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments is non-adjuvanted. In another embodiment, the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments comprises an adjuvant.

In another embodiment, the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments does not contain a non-respiratory antigen.

25 In yet another embodiment, the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments induces an immune response to a canine respiratory pathogen in a canine. In another embodiment, said canine respiratory pathogen is at least one of CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica*, and *Mycoplasma cynos*.

Another embodiment of the present invention provides a use of the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments for the treatment or prevention of infection from a canine respiratory pathogen in a canine. In another embodiment, said canine respiratory pathogen is at least one of CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica*, and *M. cynos*. In another embodiment, said composition prevents said infection for a period of about 6 months or more. In another embodiment, said composition prevents said infection for a period of about one year. In another embodiment, the present invention provides a use of the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of infection from a canine respiratory pathogen in a canine.

Another embodiment of the present invention provides the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments wherein said composition treats or prevents canine infectious respiratory disease complex (CIRDC) in a canine.

Another embodiment of the present invention provides a method of treating or preventing CIRDC in a canine comprising administering to said canine the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments. In another embodiment, said composition prevents CIRDC for a period of about 6 months or more. In another embodiment, said composition prevents CIRDC for a period of about one year. Another embodiment provides for a use of the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of CIRDC in a canine.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Serum Neutralizing Antibody Response against CRCoV.

Measurement of serum neutralizing antibody response against canine respiratory coronavirus (CRCoV) when dogs were vaccinated with saline, Aluminum hydroxide (AlOH)-adjuvanted, or Emulsigen®-adjuvanted compositions.

Figure 2. Nasal Virus Shedding Post-Challenge. Measurement of CRCoV

shed from the nasal passages when dogs were vaccinated with saline, AlOH-

adjuvanted, or Emulsigen®-adjuvanted compositions, followed by subsequent challenge with CRCoV.

Figure 3. Percent Animals Positive for CRCoV Tissue Virus on Day 4 Post-Challenge. Assessment of number of dogs positive for CRCoV in respiratory tissue when vaccinated with saline, AIOH-adjuvanted, or Emulsigen®-adjuvanted compositions, followed by subsequent challenge with CRCoV.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The definitions below apply to this disclosure. They supersede any contradictory definitions contained in each individual reference incorporated herein by reference. Words not defined have the meaning commonly used by one skilled in the art. Further, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular.

“About” or “approximately,” when used in connection with a measurable numerical variable, refers to the indicated value of the variable and to all values of the variable that are within the experimental error of the indicated value (e.g., within the 95% confidence interval for the mean), or within 10 percent of the indicated value, whichever is greater. If “about” is used in reference to time intervals in weeks, “about 3 weeks” is 17 to 25 days, and “about 2 to about 4 weeks” is 10 to 40 days.

“Adjuvant”, as used herein, refers to any substance which serves as a non-specific stimulator of the immune response. See below for a further description of adjuvants.

The term “animal”, as used herein, includes any animal that is susceptible to canine respiratory disease complex, including mammals, both domesticated and wild.

“Antibody”, as used herein, is any polypeptide comprising an antigen-binding site regardless of the source, method of production, or other characteristics. It refers to an immunoglobulin molecule or a fragment thereof that specifically binds to an antigen as the result of an immune response to that antigen. Immunoglobulins are serum proteins composed of “light” and “heavy” polypeptide chains having “constant” and “variable” regions and are divided into classes (e.g., IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM)

based on the composition of the constant regions. An antibody that is “specific” for a given antigen indicates that the variable regions of the antibody recognize and bind a specific antigen exclusively. The term includes, but is not limited to: a polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a monospecific antibody, polyspecific antibody, humanized antibody, a tetrameric antibody, a tetravalent antibody, a multispecific antibody, a single chain antibody, a domain-specific antibody, a single domain antibody, a domain-deleted antibody, a fusion protein, an ScFc fusion protein, a single-chain antibody, chimeric antibody, synthetic antibody, recombinant antibody, hybrid antibody, mutated antibody, and CDR-grafted antibodies. Antibodies can be intact immunoglobulins derived from natural sources or from recombinant sources, or can be immunoreactive portions of intact immunoglobulins. An “antibody” can be converted to an antigen-binding protein, which includes but is not limited to antibody fragments which include but are not limited to: Fab, F(ab')₂, an Fab' fragment, an Fv fragment, a single-chain Fv (ScFv) fragment, an Fd fragment, a dAb fragment, diabodies, a CDR3 peptide, a constrained FR3-CDR3-FR4 peptide, a nanobody, a bivalent nanobody, a small modular immunopharmaceutical (SMIPs), and a minibody and any of above mentioned fragments and their chemically or genetically manipulated counterparts, as well as other antibody fragments that retain antigen-binding function. Typically, such fragments would comprise an antigen-binding domain. As will be recognized by those of skill in the art, any of such molecules may be engineered (for example “germlined”) to decrease its immunogenicity, increase its affinity, alter its specificity, or for other purposes.

“Antigen” or “immunogen”, as used herein, refers to a molecule that contains one or more epitopes (linear, conformational or both) that upon exposure to a subject will induce an immune response that is specific for that antigen. An epitope is the specific site of the antigen which binds to a T-cell receptor or specific antibody, and typically comprises about 3 amino acid residues to about 20 amino acid residues. The term antigen refers to subunit antigens—antigens separate and discrete from a whole organism with which the antigen is associated in nature—as well as killed, attenuated or inactivated bacteria, viruses, fungi, parasites or other microbes. The

term antigen also refers to antibodies, such as anti-idiotypic antibodies or fragments thereof, and to synthetic peptide mimotopes that can mimic an antigen or antigenic determinant (epitope). The term antigen also refers to an oligonucleotide or polynucleotide that expresses an antigen or antigenic determinant in vivo, such as in DNA immunization applications.

“Antigenicity”, as used herein, refers to the capability of a protein or polypeptide to be immunospecifically bound by an antibody raised against the protein or polypeptide.

The term “*Bordetella bronchiseptica*” or “*B. bronchiseptica*” refers to: a live attenuated bacterium of *Bordetella bronchiseptica*, a killed whole cell extract (bacterin) of *Bordetella bronchiseptica* or a cellular bacterial extract of *Bordetella bronchiseptica*.

“Buffer” means a chemical system that prevents change in the concentration of another chemical substance. Proton donor and acceptor systems serve as buffers, preventing marked changes in hydrogen ion concentration (pH). A further example of a buffer is a solution containing a mixture of a weak acid and its salt (conjugate base), or a weak base and its salt (conjugate acid).

“Canine”, as used herein, includes what is commonly called the dog, but includes other members of the family *Canidae*.

The term “cell line” or “host cell”, as used herein, means a prokaryotic or eukaryotic cell in which a virus can replicate or be maintained.

The term “culture”, as used herein, means a population of cells or microorganisms growing in the absence of other species or types.

“Dose” refers to a vaccine or immunogenic composition given to a subject. A “first dose” or “priming dose” refers to the dose of such a composition given on Day 0. A “second dose” or a “third dose” or an “annual dose” refers to an amount of such composition given subsequent to the first dose, which can be but is not required to be the same vaccine or immunogenic composition as the first dose.

An “epitope” is the specific site of the antigen which binds to a T-cell receptor or specific antibody, and typically comprises from about 3 amino acid residues to about 20 amino acid residues.

5 “Excipient”, as used herein, refers to a non-reactive carrier component of a vaccine or immunogenic composition that is not an antigen.

“Fragment” refers to a truncated portion of a protein or gene. “Functional fragment” and “biologically active fragment” refer to a fragment that retains the biological properties of the full length protein or gene.

10 “Homology” or “percent homology” refers to the percentage of nucleotide or amino acid residues in the candidate sequence that are identical or similar with the residues in the comparator sequence(s) after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence homology, and also considering any conservative substitutions as part of the sequence homology.

15 “Homologs” or “species homologs” include genes found in two or more different species which possess substantial polynucleotide sequence homology, and possess the same, or similar, biological functions and/or properties. Preferably polynucleotide sequences which represent species homologs will hybridize under moderately stringent conditions, as described herein by example, and possess the same or similar biological activities and/or properties. In another aspect,
20 polynucleotides representing species homologs will share greater than about 60% sequence homology, greater than about 70% sequence homology, greater than about 80% sequence homology, greater than about 90% sequence homology, greater than about 95% sequence homology, greater than about 96% sequence homology, greater than about 97% sequence homology, greater than about 98%
25 sequence homology, or greater than about 99% sequence homology.

“Identity” or “percent identity” refers to the percentage of nucleotides or amino acids in the candidate sequence that are identical with the residues in the comparator sequence after aligning both sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any
30 conservative substitutions as part of the sequence identity.

“Immune response”, as used herein, in a subject refers to the development of a humoral immune response, a cellular immune response, or a humoral and a cellular immune response to an antigen. A “humoral immune response” refers to one that is at least in part mediated by antibodies. A “cellular immune response” is one
5 mediated by T-lymphocytes or other white blood cells or both, and includes the production of cytokines, chemokines and similar molecules produced by activated T-cells, white blood cells, or both. Immune responses can be determined using standard immunoassays and neutralization assays, which are known in the art.

“Immunogenicity”, as used herein, refers to the capability of a protein or
10 polypeptide to elicit an immune response directed specifically against an antigen.

An “immunogenic composition” is a preparation containing an immunogen, including, e.g., a protein, a peptide, a whole cell, inactivated, subunit or attenuated virus, or a polysaccharide, or combination thereof, administered to stimulate the recipient's humoral and cellular immune systems to one or more of the antigens
15 present in the immunogenic composition. “Immunization” is the process of administering an immunogenic composition and stimulating an immune or immunogenic response to an antigen in a host. Preferred hosts are mammals, such as dogs. Preferably, the immunogenic composition is a vaccine.

“Immunologically protective amount”, as used herein, is an amount of an
20 antigen effective to induce an immunogenic response in the recipient that is adequate to prevent or ameliorate signs or symptoms of disease, including adverse health effects or complications thereof. Either humoral immunity or cell-mediated immunity or both can be induced. The immunogenic response of an animal to a composition can be evaluated, e.g., indirectly through measurement of antibody
25 titers, lymphocyte proliferation assays, or directly through monitoring signs and symptoms after challenge with wild type strain. The protective immunity conferred by a composition or vaccine can be evaluated by measuring, e.g., reduction of shed of challenge organisms, reduction in clinical signs such as mortality, morbidity, temperature, and overall physical condition, health and performance of the subject.
30 The immune response can comprise, without limitation, induction of cellular and/or

humoral immunity. The amount of a composition or vaccine that is therapeutically effective can vary, depending on the particular organism used, or the condition of the animal being treated or vaccinated, and can be determined by a veterinarian.

“Intranasal” administration, as used herein, refers to the introduction of a substance, such as a vaccine or other composition, into a subject’s body through or by way of the nose, and involves transport of the substance primarily through the nasal mucosa.

“Isolated”, as used herein, means removed from its naturally occurring environment, either alone or in a heterologous host cell, or chromosome or vector (e.g., plasmid, phage, etc.). “Isolated bacteria,” “isolated anaerobic bacteria,” “isolated bacterial strain,” “isolated virus” “isolated viral strain” and the like refer to a composition in which the bacteria or virus are substantial free of other microorganisms, e.g., in a culture, such as when separated from its naturally occurring environment. “Isolated,” when used to describe any particularly defined substance, such as a polynucleotide or a polypeptide, refers to the substance that is separate from the original cellular environment in which the substance- such as a polypeptide or nucleic acid- is normally found. As used herein therefore, by way of example only, a recombinant cell line constructed with a polynucleotide of the invention makes use of the “isolated” nucleic acid. Alternatively, if a particular protein or a specific immunogenic fragment is claimed or used as a vaccine or other composition, it would be considered to be isolated because it had been identified, separated and to some extent purified as compared to how it may exist in nature. If the protein or a specific immunogenic fragment thereof is produced in a recombinant bacterium or eukaryote expression vector that produces the antigen, it is considered to exist as an isolated protein or nucleic acid. For example, a recombinant cell line constructed with a polynucleotide makes use of an “isolated” nucleic acid.

“Medicinal agent” refers to any agent which is useful in the prevention, cure, or improvement of a medical condition, or the prevention of some physiological condition or occurrence.

"Monoclonal antibody", as used herein, refers to antibodies produced by a single line of hybridoma cells, all directed towards one epitope on a particular antigen. The antigen used to make the monoclonal antibody can be provided as an isolated protein of the pathogen or the whole pathogen. A "hybridoma" is a clonal cell line that consists of hybrid cells formed by the fusion of a myeloma cell and a specific antibody-producing cell. In general, monoclonal antibodies are of mouse origin. However, monoclonal antibody also refers to a clonal population of an antibody made against a particular epitope of an antigen produced by phage display technology, or method that is equivalent to phage display, or hybrid cells of non-mouse origin.

"Oral" or "peroral" administration, as used herein, refers to the introduction of a substance, such as a vaccine or other composition, into a subject's body through or by way of the mouth and involves swallowing or transport through the oral mucosa (e.g., sublingual or buccal absorption) or both. Intratracheal is also a means of oral or peroral administration.

"Oronasal" administration, as used herein, refers to the introduction of a substance, such as a composition or vaccine, into a subject's body through or by way of the nose and the mouth, as would occur, for example, by placing one or more droplets in the nose. Oronasal administration involves transport processes associated with oral and intranasal administration.

"Parenteral administration", as used herein, refers to the introduction of a substance, such as a composition or vaccine, into a subject's body through or by way of a route that does not include the digestive tract. Parenteral administration includes subcutaneous, intramuscular, intraarterial, and intravenous administration. For the purposes of this disclosure, parenteral administration excludes administration routes that primarily involve transport of the substance through mucosal tissue in the mouth, nose, trachea, and lungs.

The term "pathogen" or "pathogenic microorganism", as used herein, means a microorganism - for example, CPIV, CAV-2, CRCoV, CIV, or *Bordetella*

bronchiseptica - which is capable of inducing or causing a disease, illness, or abnormal state in its host animal.

"Pertactin", as used herein, refers to an outer membrane protein of *Bordetella*. Preferably the pertactin is from *B. bronchiseptica* and most preferably, "p68", and is encoded by the gene, *prnA*. Pertactin can be isolated in its native form from *Bordetella bronchiseptica*, or it can be produced recombinantly. Sequences and examples of pertactin are provided in U.S. Patent No. 7,736,658, the content of which is hereby incorporated by reference. The pertactin antigen used herein includes lipidated forms of the protein.

"Pharmaceutically acceptable" refers to substances which, within the scope of sound medical judgment, are suitable for use in contact with the tissues of subjects without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit-to-risk ratio, and effective for their intended use.

"Polyclonal antibody", as used herein, refers to a mixed population of antibodies made against a particular pathogen or antigen. In general, the population contains a variety of antibody groups, each group directed towards a particular epitope of the pathogen or antigen. To make polyclonal antibodies, the whole pathogen, or an isolated antigen, is introduced by inoculation or infection into a host, which induces the host to make antibodies against the pathogen or antigen.

The term "polynucleotide", as used herein, means an organic polymer molecule composed of nucleotide monomers covalently bonded in a chain. DNA (deoxyribonucleic acid) and RNA (ribonucleic acid) are examples of polynucleotides with distinct biological function.

The term "polypeptide", as used herein, means an organic polymer molecule composed of two or more amino acids bonded in a chain.

"Preventing infection", as used herein, means to prevent or inhibit the replication of the bacteria or virus which causes the identified disease, to inhibit transmission of the bacteria or virus, to prevent the bacteria or virus from establishing itself in its host, or to alleviate the symptoms of the disease caused by infection. The treatment is considered therapeutic if there is a reduction in bacterial or viral load.

“Protection”, “protecting”, “protective immunity”, and the like, as used herein with respect to a vaccine or other composition, means that the vaccine or composition prevents or reduces the symptoms of the disease caused by the organism from which the antigen(s) used in the vaccine or composition is derived.

5 The terms “protection”, “protecting”, and the like, also mean that the vaccine or composition can be used to “treat” the disease, or one or more symptoms of the disease that already exists in a subject.

“Respiratory” administration, as used herein, refers to the introduction of a substance, such as a vaccine or other composition, into a subject’s body through or
10 by way of inhalation of a nebulized (atomized) substance. In respiratory administration, the primary transport mechanism involves absorption of the atomized substance through the mucosa in the trachea, bronchi, and lungs and is therefore different than intranasal or peroral administration.

The terms “specific binding,” “specifically binds,” and the like, are defined as
15 two or more molecules that form a complex that is measurable under physiologic or assay conditions and is selective. An antibody or other inhibitor is said to “specifically bind” to a protein if, under appropriately selected conditions, such binding is not substantially inhibited, while at the same time non-specific binding is inhibited. Specific binding is characterized by high affinity and is selective for the compound or
20 protein. Nonspecific binding usually has low affinity. Binding in IgG antibodies, for example, is generally characterized by an affinity of at least about 10^{-7} M or higher, such as at least about 10^{-8} M or higher, or at least about 10^{-9} M or higher, or at least about 10^{-10} or higher, or at least about 10^{-11} M or higher, or at least about 10^{-12} M or higher. The term is also applicable where, e.g., an antigen-binding domain is specific
25 for a particular epitope that is not carried by numerous antigens, in which case the antibody carrying the antigen-binding domain will generally not bind other antigens.

“Specific immunogenic fragment”, as used herein, refers to a portion of a sequence that is recognizable by an antibody or T cell specific for that sequence.

“Subject”, as used herein, refers to any animal having an immune system,
30 which includes mammals, such as dogs.

“Substantially identical”, as used herein, refers to a degree of sequence identity of at least about 90%, at least about 95%, at least about 96%, at least about 97%, at least about 98%, or at least about 99%.

“Subunit vaccine”, and “subunit composition”, as used herein, refers to a type of vaccine or composition that includes one or more antigens- but not necessarily all antigens in the vaccine or composition - which are derived from or homologous to, antigens from a pathogen of interest, such as a virus, bacterium, parasite or fungus. Such a composition or vaccine is substantially free of intact pathogen cells or pathogenic particles, or the lysate of such cells or particles. Thus, a subunit vaccine or subunit composition can be prepared from at least partially purified, or substantially purified, immunogenic polypeptides from the pathogen or their analogs. Methods of obtaining an antigen or antigens in the subunit vaccine or subunit composition include standard purification techniques, recombinant production, or chemical synthesis. A “subunit vaccine” or “subunit composition” thus refers to a vaccine or composition consisting of a defined antigenic component or components of a virus, bacterium, or other immunogen.

“TCID₅₀” refers to “tissue culture infective dose” and is defined as that dilution of a virus required to infect 50% of a given batch of inoculated cell cultures. Various methods can be used to calculate TCID₅₀, including the Spearman-Kärber method, which is utilized throughout this specification. For a description of the Spearman-Kärber method, see B. W. Mahy & H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

“Therapeutic agent”, as used herein, refers to any molecule, compound, virus or treatment, preferably a virus attenuated or killed, or subunit or compound, that assists in the treatment of a viral, bacterial, parasitic or fungal infection, disease or condition caused thereby.

“Therapeutically effective amount”, as used herein, refers to an amount of an antigen or vaccine or composition that would induce an immune response in a subject (e.g., dog) receiving the antigen or vaccine or composition which is adequate to prevent or ameliorate signs or symptoms of disease, including adverse health

effects or complications thereof, caused by infection with a pathogen, such as a virus, bacterium, parasite or fungus. Humoral immunity or cell-mediated immunity, or both humoral and cell-mediated immunity, can be induced. The immunogenic response of an animal to an antigen, vaccine, or composition can be evaluated indirectly through measurement of antibody titers, lymphocyte proliferation assays, or directly through monitoring signs and symptoms after challenge with the wild type strain. The protective immunity conferred by a vaccine or composition can be evaluated by measuring reduction of challenge organism shed, and/or reduction in clinical signs, such as mortality, morbidity, temperature, and overall physical condition, health, and performance of the subject. The amount of a vaccine or composition that is therapeutically effective can vary, depending on the particular immunogen used, or the condition of the subject, and can be determined by one skilled in the art.

“Treat” or “treating”, as used herein, refers to reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing a disorder, condition or disease to which such term applies, or to preventing one or more symptoms of such disorder, condition or disease.

“Treatment”, as used herein, refers to the act of “treating”, as defined immediately above.

“Vaccine” or “vaccine composition,” as used herein, refers to an immunogenic composition selected from a virus or bacteria, either modified live, attenuated, or killed, or a subunit vaccine, or any combination of the aforementioned.

Administration of the vaccine to a subject results in an immune response. The vaccine can be introduced directly into the subject by any known route of administration, including parenterally, perorally, and the like. The terms mean a composition which prevents or reduces an infection, or which prevents or reduces one or more signs or symptoms of infection. The protective effects of a vaccine composition against a pathogen are normally achieved by inducing in the subject an immune response. Generally speaking, abolished or reduced incidences of infection, amelioration of the signs or symptoms, or accelerated elimination of the microorganism from the infected subjects are indicative of the protective effects of a

vaccine composition. The vaccine compositions of the present invention provide protective effects against infections caused by canine respiratory disease pathogens.

“Veterinarily acceptable”, as used herein, refers to substances which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of veterinary subjects without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit-to-risk ratio, and effective for their intended use.

“Veterinarily acceptable carrier”, as used herein, refers to a carrier medium that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient, and is not toxic to the veterinary subject to whom it is administered.

Antigens, Immunogenic Compositions, and Vaccines

The present disclosure provides immunogenic compositions and vaccines comprising one or more viruses and bacteria. The present disclosure provides immunogenic compositions and vaccines comprising one or more viruses and bacteria or subunits that are suitable for administration to a canine for treatment against CIRDC.

The canine respiratory coronavirus (CRCoV) described herein can be characterised as a coronavirus present in the respiratory tracts of dogs with infectious respiratory disease. CRCoV is phylogenetically most closely related to bovine coronavirus (BCoV), human coronavirus (HCoV) strain OC43 and hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV); enteric canine coronavirus (CCoV) is only distantly related to CRCoV. A representative example of a CRCoV suitable for use in the present invention includes a strain identified as CRCoV strain 4182 (Erles et al., Virus Res., 124:78-87, 2007).

The influenza virus antigens encompassed by this invention can be any identified influenza virus strain, from any bird or mammal, including but not limited to, influenza virus having the subtype H3 hemagglutinin and subtype N8 neuraminidase, or the H3N8 subtype, more commonly referred to as an H3N8 virus. The influenza can be of mammalian or avian origin, including but not limited to swine, equine or

canine origin. In one embodiment a canine influenza antigen is used. In one embodiment an equine influenza antigen is used. In one embodiment, a strain having the subtype glycoproteins designated H3 or N8 is used. In one embodiment, a strain having both subtype H3 and N8 glycoproteins is used.

5 The influenza antigens encompassed by this invention can be isolated from dogs, horses, pigs, and fowl, both domestic and wild. The animals chosen for sample collection should display acute and/or sub-acute clinical syndromes, which can include mild to severe respiratory symptoms and fever. Animals can also exhibit signs of anorexia and lethargy. Methods of virus isolation are well known to those skilled in the art including: inoculating mammalian or avian cell cultures, inoculating
10 embryonated eggs with nasal or pharyngeal mucus samples from clinical specimens, collection by swabbing of the nasal passage or throat, or by collecting tissues such as spleen, lung, tonsil and liver and lung lavage. The cytopathic effect of the virus can be observed in cell culture. Allantoic fluid or cell lysates can be tested for their
15 ability to agglutinate human, chicken, turkey or guinea pig red blood cells, presumptive evidence for the presence of an influenza virus.

 A representative example of an influenza strain suitable for use in the present invention includes a strain identified as A/canine/Iowa/9A1/B5/08/D12, which was deposited as PTA-7694 on 29 June 2006 at the American Type Culture Collection
20 (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, in compliance with Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. A representative strain of the CIV antigen is the CIV virus strain in the commercial vaccine, Vanguard® CIV (Pfizer, Inc). This invention also encompasses vaccines comprising a strain identified as Equine
25 Influenza Strain A/Equine/2/Miami/1/63. This strain was deposited at the ATCC, with accession number VR 317, in compliance with Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure.

 Additional examples of influenza viruses for use in the present invention are A/canine/Iowa/13628/2005, A/Equine/Kentucky/1998, A/Equine/Kentucky/15/2002,
30 A/Equine/Ohio/1/2003, A/Equine/Kentucky/1/1994,

A/Equine/Massachusetts/213/2003, A/Equine/Wisconsin/2003, A/Equine/NewYork/1999, and A/Equine/Newmarket/A2/1993. Other preferred strains and/or isolates of CIV include those disclosed in U.S. Patent Nos. 7,959,929 (particularly strains and HA sequences identified therein as Jacksonville/2005, Miami/2005, FL/242/03 and Florida/43/04), 7,384,642, 7,572,620 and 7,468,187, the contents of which, including all sequences, particularly HA sequences, and strains, are hereby incorporated by reference as if set forth fully herein. Additionally, a CIV strain suitable for use herein includes the Colorado CIV isolate described in Barrell et al., J. Vet. Intern. Med., 24 (6), 1524-1527 (2010), having accession number ADW41784.

The canine parainfluenza virus (CPIV) encompassed by this invention can be characterized as one of the viruses known to be a causative agent associated with kennel cough. A representative strain of the CPIV antigen is the attenuated CPI virus strain in the commercial vaccine, Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Another representative strain of the CPIV antigen is the attenuated CPI virus strain having the designation of "NL-CPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

The canine adenovirus, type 2 (CAV-2) encompassed by this invention can be characterized as one of the viruses also known to be a causative agent associated with kennel cough. A representative strain of the CAV-2 antigen is the attenuated CAV-2 virus strain in the commercial vaccine, Vanguard® Plus 5 (Pfizer). A representative strain of the CAV-2 antigen is the attenuated CAV-2 strain designated as the "Manhattan" strain (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

The *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) encompassed by this invention is described in Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004 and is the only species of mycoplasma commonly associated with respiratory disease. Immunogenic compositions against *M. cynos* are described in US 2007/0098739, incorporated herein by reference.

The *Bordetella bronchiseptica* component encompassed by this invention can be characterized as the bacterial causative agent associated with kennel cough. The immunogenic compositions and vaccines encompassed by the present invention can

be one or more of: a live attenuated *Bordetella bronchiseptica*, a *Bordetella bronchiseptica* bacterin or a bacterial extract. Additionally, the composition preferably also includes an isolated subunit antigen of *Bordetella bronchiseptica*.

In one embodiment the *Bordetella bronchiseptica* is prepared as a whole cell
5 sonicate purified through column chromatography as provided in Patent Application No. FR2571618, filed October 12, 1984. Another representative example of a *Bordetella bronchiseptica* is the bacterial extract Bronchicine™ CAe (Pfizer), which is prepared from antigenic material extracted from *Bordetella bronchiseptica* cells. Another example of *Bordetella bronchiseptica* is the live attenuated *Bordetella*
10 *bronchiseptica* strain B-C2 present in Nobivac® and/or the live *bronchiseptica* strain from Intra-Trac®, Bronchi-Shield®, Naramune™, Recombitek®, Univac, and/or Kennel-Jec™.

Additionally, a subunit is preferably also present (i.e., supplemented), in combination with the *Bordetella bronchiseptica* component. A representative example
15 of the subunit is an isolated pertactin antigen, preferably, a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen, particularly the recombinant *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen which is recognized by the p68-specific monoclonal antibody Bord 2-7 (described in US 7,736,658, which is incorporated herein by reference) and in one preferred embodiment, has an amino acid sequence as set forth in US 7,736,658 or having
20 homology thereto.

The recombinant p68 pertactin antigen is preferably prepared in a soluble form, such that native-like structure is preserved or restored during processing. Accordingly, one aspect of the invention provides a recombinant p68 that is substantially free (less than about 80%, 90%, 95% or even 99%) of aggregates. In
25 another embodiment the recombinant p68 is solubilised with urea, preferably about 0.1 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 3 M, or 6 M solution of urea. Thereafter, the p68 antigen can be purified, such as through column chromatography. One such solubilisation process is described in *Surinder et al.*, J. Bioscience and Bioengineering, v. 99(4), pgs 303-310 (2005).

Pertactin antigens used herein also include lipidated forms. Examples of production of lipidated proteins is provided in Erdile et al., *Infection and Immunity*, (1993) v.61(1), p. 81-90, incorporate by reference. The methods disclosed therein can be used to prepare posttranslationally modified pertactin proteins that contain an attached lipid moiety.

Furthermore, in another embodiment, an immunogenic composition comprises *Bordetella bronchiseptica* and an isolated Bsp22 antigen. In another embodiment, the immunogenic composition comprises *Bordetella bronchiseptica*, an isolated pertactin antigen, and an isolated Bsp22 antigen. The Bsp22 antigen can be prepared as provided in *Medhekar et al.*, *Molecular Microbiology* (2009) 71(2), 492–504. Preferably, the isolated Bsp22 antigen is present in conjunction with (i.e., in addition to) a *Bordetella bronchiseptica* extract and an isolated pertactin antigen, specifically recombinant p68.

“Bsp22” also includes lipidated forms of the antigen. Examples of production of lipidated proteins is provided in Erdile et al., *Infection and Immunity*, (1993) v.61(1), p. 81-90, incorporated by reference. The methods disclosed therein can be used to prepare posttranslationally modified Bsp22 proteins that contain an attached lipid moiety.

Viruses encompassed by the present invention can be propagated in cells, cell lines and host cells. Said cells, cell lines or host cells can be for example, but not limited to, mammalian cells and non-mammalian cells, including insect and plant cells. Cells, cell lines, and host cells in which viruses encompassed by the present invention can be propagated are readily known, and accessible to those of ordinary skill in the art.

In another embodiment, the immunogenic compositions described herein do not comprise non-respiratory antigens. Thus, one embodiment of the invention provides a composition as described herein with the proviso that it does not include a non-respiratory antigen. The non-respiratory antigens do not cause respiratory disease in a subject. Non-limiting examples of such non-respiratory antigens include

rabies virus, canine parvovirus, enteric canine coronavirus, *Leptospira* species, and *Borrelia burgdorferi*.

Bacteria encompassed by the present invention can be cultured and propagated using various culture media known to those of ordinary skill in the art, including both broth (liquid) and agar (solid; semi-solid) cultivation media. Some bacteria can also be cultured and propagated in mammalian cells or non-mammalian cells.

The viruses and bacteria encompassed by the present invention can be attenuated or inactivated prior to use in an immunogenic composition or vaccine.

Methods of attenuation and inactivation are well known to those skilled in the art. Methods for attenuation include, but are not limited to, serial passage in cell culture on a suitable cell line (viruses and some bacteria), serial passage in broth culture (bacteria), ultraviolet irradiation (viruses and bacteria), and chemical mutagenesis (viruses and bacteria). Methods for viral or bacterial inactivation include, but are not limited to, treatment with formalin, betapropiolactone (BPL) or binary ethyleneimine (BEI), or other methods known to those skilled in the art.

Inactivation by formalin can be performed by mixing the suspension containing the microorganism with 37% formaldehyde to a final formaldehyde concentration of 0.5%. The microorganism-formaldehyde mixture is mixed by constant stirring for approximately 24 hours at room temperature. The inactivated microorganism mixture is then tested for residual live organisms by assaying for growth on a suitable cell line or broth media.

For some antigens, inactivation by BEI can be performed by mixing the suspension containing the microorganism of the present invention with 0.1 M BEI (2-bromo-ethylamine in 0.175 N NaOH) to a final BEI concentration of 1 mM. For other antigens, the final BEI concentration is 2 mM. One skilled in the art would know the appropriate concentration to use. The virus-BEI mixture is mixed by constant stirring for approximately 48 hours at room temperature, followed by the addition of 1.0 M sodium thiosulfate to a final concentration of 0.1 mM. Mixing is continued for an

additional two hours. The mixture containing the inactivated microorganism is tested for residual live virus by assaying for growth on a suitable cell line or broth media.

Immunogenic compositions and vaccines encompassed by the present invention can include one or more veterinarily-acceptable carriers. As used herein, a
5 "veterinarily-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others
10 known to those skilled in the art. Stabilizers include albumin, among others known to the skilled artisan. Preservatives include merthiolate, among others known to the skilled artisan.

The adjuvant can be metabolizable, referring to adjuvants consisting of components that are capable of being metabolized by the target species such as
15 vegetable oil based adjuvants. A metabolizable adjuvant can be a metabolizable oil. Metabolizable oils are fats and oils that typically occur in plants and animals, and usually consist largely of mixtures of triacylglycerols, also known as triglycerides or neutral fats. These nonpolar, water insoluble substances are fatty acid triesters of glycerol. Triacylglycerols differ according to the identity and placement of their three
20 fatty acid residues or side chains.

The adjuvant can also be non-metabolizable, referring to adjuvants consisting of components that cannot be metabolized by the body of the animal subject to which the emulsion is administered. Non-metabolizable oils suitable for use in compositions of the present invention include alkanes, alkenes, alkynes, and their
25 corresponding acids and alcohols, the ethers and esters thereof, and mixtures thereof. Preferably, the individual compounds of the oil are light hydrocarbon compounds, i.e., such components have 6 to 30 carbon atoms. The oil can be synthetically prepared or purified from petroleum products. Preferred non-metabolizable oils for use in compositions described herein include mineral oil,
30 paraffin oil, and cycloparaffins, for example. The term "mineral oil" refers to a non-

metabolizable adjuvant oil that is a mixture of liquid hydrocarbons obtained from petrolatum via a distillation technique. The term is synonymous with "liquefied paraffin", "liquid petrolatum" and "white mineral oil." The term is also intended to include "light mineral oil," i.e., oil which is similarly obtained by distillation of

petrolatum, but which has a slightly lower specific gravity than white mineral oil.

Mineral oil can be obtained from various commercial sources, for example, J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). Light mineral oil is commercially available under the name DRAKEOL®.

Adjuvants include, but are not limited to, the Emulsigen® adjuvant system (MVP Laboratories; Ralston, NE), the RIBI adjuvant system (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alum, aluminum hydroxide gel, oil-in water emulsions, water-in-oil emulsions such as, e.g., Freund's complete and incomplete adjuvants, Block copolymer (CytRx; Atlanta, GA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), AMPHIGEN® adjuvant, saponin, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc.; Birmingham, AL) or other saponin fractions, monophosphoryl lipid A, Avridine lipid-amine adjuvant, heat-labile enterotoxin from *E. coli* (recombinant or otherwise), cholera toxin, muramyl dipeptide, squalene/pluronic block copolymer/surfactant (SP-oil), sulpholipobeta-cyclodextrin (SL-CD), liposomes containing an immunomodulator (e.g., CpG or poly I:C), muramyl dipeptide (MDP), iscomatrix (Quil A/phosphatidyl choline), CpG/DEAE-dextran/mineral oil (TXO), CpG, triterpenoids (e.g., Quil A or another purified or partially purified saponin preparation), sterols (e.g., cholesterol), immunomodulatory agents (e.g., dimethyl dioctadecyl ammonium bromide - DDA), polymers (e.g., polyacrylic acid such as CARBOPOL®), and Th2 stimulants (e.g., glycolipids such as Bay R1005®), and combinations thereof, among many other adjuvants known to those skilled in the art.

Non-limiting examples of various combinations that can be used include a triterpenoid plus a sterol (e.g., Quil A/cholesterol, also known as QAC), a triterpenoid plus a sterol, an immunomodulatory agent, and a polymer (e.g., Quil A/cholesterol/DDA/CARBOPOL®, also known as QCDC), and a triterpenoid plus a

sterol, an immunomodulatory agent, a polymer, and a Th2 stimulant (e.g., Quil A/cholesterol/DDA/CARBOPOL®, and Bay R1005®, also known as QCDCR).

The amounts and concentrations of adjuvants and additives useful in the context of the present invention can readily be determined by the skilled artisan. In one embodiment, the present invention contemplates immunogenic compositions and vaccines comprising from about 20 µg to about 2000 µg of adjuvant. In another embodiment, adjuvant is included in an amount from about 100 µg to about 1500 µg, or from about 250 µg to about 1000 µg, or from about 350 µg to about 750 µg. In another embodiment, adjuvant is included in an amount of about 500 µg/2 ml dose of the immunogenic composition or vaccine.

The immunogenic compositions and vaccines can also include antibiotics. Such antibiotics include, but are not limited to, those from the classes of aminoglycosides, carbapenems, cephalosporins, glycopeptides, macrolides, penicillins, polypeptides, quinolones, sulfonamides, and tetracyclines. In one embodiment, the present invention contemplates immunogenic compositions and vaccines comprising from about 1 µg/ml to about 60 µg/ml of antibiotic. In another embodiment, the immunogenic compositions and vaccines comprise from about 5 µg/ml to about 55 µg/ml of antibiotic, or from about 10 µg/ml to about 50 µg/ml of antibiotic, or from about 15 µg/ml to about 45 µg/ml of antibiotic, or from about 20 µg/ml to about 40 µg/ml of antibiotic, or from about 25 µg/ml to about 35 µg/ml of antibiotic. In yet another embodiment, the immunogenic compositions and vaccines comprise less than about 30 µg/ml of antibiotic.

Immunogenic compositions and vaccines encompassed by the present invention can include one or more polynucleotide molecules encoding for a virus or bacteria, or viral or bacterial protein. DNA or RNA molecules can be used in immunogenic compositions or vaccines. The DNA or RNA molecule can be administered absent other agents, or it can be administered together with an agent facilitating cellular uptake (e.g., liposomes or cationic lipids). Total polynucleotide in the immunogenic composition or vaccine will generally be between about 0.1 µg/ml and about 5.0 mg/ml. In another embodiment, the total polynucleotide in the

immunogenic composition or vaccine can be from about 1 µg/ml and about 4.0 mg/ml, or from about 10 µg/ml and about 3.0 mg/ml, or from about 100 µg/ml and about 2.0 mg/ml. Vaccines and vaccination procedures that utilize nucleic acids (DNA or mRNA) have been well described in the art, for example, U. S. Pat. No. 5,703,055, U.S. Pat. No. 5,580,859, and U.S. Pat. No. 5,589,466, all of which are incorporated herein by reference.

In addition to the viruses or bacteria described above, immunogenic compositions and vaccines encompassed by the present invention can include other additional antigens. Antigens can be in the form of an inactivated whole or partial preparation of the microorganism, or in the form of antigenic molecules obtained by genetic engineering techniques or chemical synthesis. Other antigens appropriate for use in accordance with the present invention include, but are not limited to, those derived from pathogenic viruses such as canine distemper virus, canine herpesvirus, canine influenza virus, rabies virus, pathogenic bacteria such as *Bordetella bronchiseptica*, *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Porphyromonas* spp., *Bacteriodes* spp., *Borrelia* spp., *Streptococcus* spp., including *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*, *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., including *Mycoplasma cynos*, and *Microsporum canis*. Antigens can also be derived from pathogenic fungi such as *Candida*, protozoa such as *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Babesia* spp., *Giardia* spp., *Leishmania* spp., or helminths such as *Taenia*, *Cuterebra*, *Echinococcus*, and *Paragonimus* spp.

Forms, Dosages, Routes of Administration

Immunogenic compositions and vaccines encompassed by the present invention can be administered to animals to induce an effective immune response against CIRDC. Accordingly, the present invention provides methods of stimulating an effective immune response by administering to an animal a therapeutically effective amount of an immunogenic composition or vaccine described herein.

Immunogenic compositions and vaccines described herein can be administered to an animal to vaccinate the animal subject against CIRDC. The immunogenic compositions and vaccines can be administered to the animal to prevent or treat CIRDC in the animal. Accordingly, described herein are methods of
5 vaccinating an animal against CIRDC, and preventing or treating CIRDC, comprising administering to the animal a therapeutically effective amount of an immunogenic composition or vaccine described herein.

Immunogenic compositions and vaccines encompassed by the present invention can be made in various forms depending upon the route of administration.
10 For example, the immunogenic compositions and vaccines can be made in the form of sterile aqueous solutions or dispersions suitable for injectable use, or made in lyophilized forms using freeze-drying techniques. Lyophilized immunogenic compositions and vaccines are typically maintained at about 4°C, and can be reconstituted in a stabilizing solution, e.g., saline or HEPES, with or without adjuvant.
15 Immunogenic compositions and vaccines can also be made in the form of suspensions or emulsions.

Immunogenic compositions and vaccines of the present invention include a therapeutically effective amount of one or more of the above-described microorganisms. Purified viruses and/or bacteria can be used directly in an
20 immunogenic composition or vaccine, or can be further attenuated, or inactivated. Typically, an immunogenic composition or vaccine contains between about 1×10^2 and about 1×10^{12} viral or bacterial particles, or between about 1×10^3 and about 1×10^{11} particles, or between about 1×10^4 and about 1×10^{10} particles, or between about 1×10^5 and about 1×10^9 particles, or between about 1×10^6 and about 1×10^8
25 particles. The precise amount of a microorganism in an immunogenic composition or vaccine effective to provide a protective effect can be determined by a skilled artisan.

The pertactin antigen is present at between about 1 µg and about 30 µg. More particularly, said pertactin is present at between about 5 µg and about 20 µg, more particular still, at between about 7 µg and about 15 µg, and even more particularly, at
30 about 5 µg, 10 µg, 15 µg or 20 µg.

The immunogenic compositions and vaccines generally comprise a veterinarily-acceptable carrier, in a volume of between about 0.5 ml and about 5 ml. In another embodiment the volume of the carrier is between about 1 ml and about 4 ml, or between about 2 ml and about 3 ml. In another embodiment, the volume of the carrier is about 1 ml, or is about 2 ml, or is about 5 ml. Veterinarily-acceptable carriers suitable for use in immunogenic compositions and vaccines can be any of those described hereinabove.

Those skilled in the art can readily determine whether a virus or bacteria needs to be attenuated or inactivated before administration. In another embodiment of the present invention, a virus or bacterium can be administered directly to an animal without additional attenuation. The amount of a microorganism that is therapeutically effective can vary, depending on the particular microorganism used, the condition of the animal and/or the degree of infection, and can be determined by a skilled artisan.

In accordance with the methods of the present invention, a single dose can be administered to animals, or, alternatively, two or more inoculations can take place with intervals of from about two to about ten weeks. Boosting regimens can be required, and the dosage regimen can be adjusted to provide optimal immunization. Those skilled in the art can readily determine the optimal administration regimen.

Immunogenic compositions and vaccines can be administered directly into the bloodstream, into muscle, into an internal organ, or under the skin. Suitable means for parenteral administration include intravenous, intraarterial, intramuscular, and subcutaneous administration. Suitable devices for parenteral administration include needle (including microneedle) injectors and needle-free injectors.

Parenteral formulations are typically aqueous solutions which can contain excipients such as salts, carbohydrates, proteins, and buffering agents (preferably to a pH of from about 3 to about 9, or from about 4 to about 8, or from about 5 to about 7.5, or from about 6 to about 7.5, or about 7 to about 7.5), but, for some applications, they can be more suitably formulated as a sterile non-aqueous solution or as a dried

form to be used in conjunction with a suitable vehicle such as sterile, pyrogen-free water or saline.

The preparation of parenteral formulations under sterile conditions, for example, by lyophilization, can readily be accomplished using standard pharmaceutical techniques well known to those skilled in the art.

The solubility of materials used in the preparation of parenteral solutions can be increased by the use of appropriate formulation techniques known to the skilled artisan, such as the incorporation of solubility-enhancing agents, including buffers, salts, surfactants, liposomes, cyclodextrins, and the like.

Compositions for parenteral administration can be formulated to be immediate or modified release. Modified release formulations include delayed, sustained, pulsed, controlled, targeted and programmed release. Thus, immunogenic compositions and vaccines can be formulated as a solid, semi-solid, or thixotropic liquid for administration as an implanted depot, providing modified release of the immunogenic compositions and vaccines.

Other means of immunogenic composition or vaccine administration include delivery by microneedle or needle-free (e.g. Powderject™, Bioject™, etc.) injection.

In cases where subcutaneous or intramuscular injection is used, an isotonic formulation is preferred. Generally, additives for isotonicity can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose. In particular cases, isotonic solutions such as phosphate buffered saline are used. The formulations can further encompass stabilizers such as gelatin and albumin. In some embodiments, a vasoconstrictive agent is added to the formulation. The pharmaceutical preparations according to the present invention are generally provided sterile and pyrogen-free.

However, it is well known by those skilled in the art that the formulations for the pharmaceutically accepted carrier are those pharmaceutical carriers approved in the regulations promulgated by the United States Department of Agriculture, or equivalent government agency in a foreign country such as Canada or Mexico, or any one of the European nations, for any canine vaccine, polypeptide (antigen) subunit immunogenic compositions and vaccines, recombinant virus vector vaccines,

and DNA vaccines. Therefore, the pharmaceutically accepted carrier for commercial production of the immunogenic compositions or vaccines is a carrier that is already approved or will be approved by the appropriate government agency in the United States of America or foreign country. The immunogenic compositions and vaccines
5 can further be mixed with an adjuvant that is pharmaceutically acceptable. In certain formulations of the immunogenic compositions and vaccines, the immunogenic composition or vaccine is combined with other canine immunogenic compositions or vaccines to produce a polyvalent product that can protect canine against a wide variety of diseases caused by other canine pathogens.

10 The immunogenic compositions described herein can prevent infection from a canine respiratory pathogen or can prevent CIRDC in a canine for a period of about three months or more. The compositions can prevent infection from said canine respiratory pathogen or can prevent CIRDC in said canine for a period of about six months or more. The compositions can prevent infection from said canine respiratory
15 pathogen or can prevent CIRDC in said canine for a period of about one year.

Detection and Diagnostic Methods

The extent and nature of the immune responses induced in the animal can be assessed by using a variety of techniques. For example, sera can be collected from
20 the inoculated animals, and tested for the presence or absence of antibodies specific for the immunogens. Detection of responding cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) in lymphoid tissues, indicative of the induction of a cellular immune response, can be achieved by assays such as T cell proliferation. The relevant techniques are well described in the art.

Kits

Inasmuch as it may be desirable to administer an immunogenic composition or vaccine in combination with additional compositions or compounds- for example, for the purpose of treating a particular disease or condition- it is within the scope of the
30 present invention that an immunogenic composition or vaccine can conveniently be

included in, or combined in, the form of a kit suitable for administration or co-administration of the compositions.

Thus, kits encompassed by the present invention can comprise one or more separate pharmaceutical compositions, at least one of which is an immunogenic
5 composition or vaccine in accordance with the present invention, and a means for separately retaining said compositions, such as a container, divided bottle, or divided foil packet. An example of such a kit is a syringe and needle, and the like. A kit of the present invention is particularly suitable for administering different dosage forms, for example, oral or parenteral, for administering the separate compositions at different
10 dosage intervals, or for titrating the separate compositions against one another. To assist one administering a composition encompassed by the present invention, the kit typically comprises directions for administration.

Another kit encompassed by the present invention can comprise one or more reagents useful for the detection of an infected animal. The kit can include reagents
15 for analyzing a sample for the presence of whole microorganisms, polypeptides, epitopes or polynucleotide sequences. The presence of virus, bacteria, polypeptides, or polynucleotide sequences can be determined using antibodies, PCR, hybridization, and other detection methods known to those of skill in the art.

Another kit encompassed by the present invention can provide reagents for
20 the detection of antibodies against particular epitopes. Such reagents are useful for analyzing a sample for the presence of antibodies, and are readily known and available to one of ordinary skill in the art. The presence of antibodies can be determined using standard detection methods known to those of skill in the art.

In certain embodiments, the kits can include a set of printed instructions, or a
25 label indicating that the kit is useful for the detection of infected animals.

Antibodies

Antibodies can either be monoclonal, polyclonal, or recombinant. The antibodies can be prepared against the immunogen or a portion thereof. For
30 example, a synthetic peptide based on the amino acid sequence of the immunogen,

or prepared recombinantly by cloning techniques, or the natural gene product and/or portions thereof can be isolated and used as the immunogen. Immunogens can be used to produce antibodies by standard antibody production technology well known to those skilled in the art. Antibody fragments can also be prepared from the antibodies by methods known to those skilled in the art, and include Fab, F(ab')₂, and Fv fragments.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by standard methods in immunology known in the art. In general, ELISAs and Western blotting are the preferred types of immunoassays. Both assays are well known to those skilled in the art. Both polyclonal and monoclonal antibodies can be used in the assays. The antibody can be bound to a solid support substrate, conjugated with a detectable moiety, or be both bound and conjugated as is well known in the art. The binding of antibodies to a solid support substrate is also well known in the art. The detectable moieties contemplated for use in the present invention can include, but are not limited to, fluorescent, metallic, enzymatic and radioactive markers such as biotin, gold, ferritin, alkaline phosphatase, b-galactosidase, peroxidase, urease, fluorescein, rhodamine, tritium, ¹⁴C, and iodination.

The present invention is further illustrated by, but by no means limited to, the following examples.

Examples

Example 1. Evaluation of CRCoV-Containing Vaccines

Sixty 8 to 9-week-old beagle dogs in good general health were used in the study. All animals received physical examination upon arrival and again on study day -2 or -1. Animals were observed once daily for general health status from arrival study day -8 to study day 39. Tympanic temperatures were collected starting on study day -1 prior to vaccination. Blood samples (approximately 5 mL) for serology were collected in SST tubes on study days 0 and 21 prior to each vaccination.

The CRCoV vaccine strain was derived from strain CRCoV.669, deposited with the ATCC as PTA-11444 in compliance with Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. The CIV vaccine strain was derived from that deposited with the ATCC as PTA-7694. The CPIV and CAV-2 isolates were derived from virus seeds used to formulate vaccines in the Vanguard® vaccine line (Pfizer). The antigens were prepared at the highest passages of virus (Master Seed Virus+5). The vaccine compositions contained an adjuvant consisting of Quil A (20 ug), cholesterol (20 ug), dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA; 10 ug), and Carbopol® (a polyacrylic acid; 0.05% v/v). The CRCoV antigen was formulated to target 1.3 relative antigen units (RAU) per dose. Experimental vaccines were tested for sterility.

A heterologous CRCoV isolate ("Max" strain; passage 1) was used as the challenge material. The virus stock material was propagated and titered on HRT18G cells, and was determined to have a titer of $10^{7.1}$ TCID₅₀/mL. This challenge material was tested and confirmed satisfactory for sterility, and free of mycoplasma or canine/feline extraneous agents.

One animal was vaccinated on day 21; all remaining animals were vaccinated on study day 22. Animals were vaccinated subcutaneously with the appropriate vaccine or placebo according to the study design shown in Table 1. The first vaccination was administered in the right shoulder region (study day 0) and the second vaccination was administered in the left shoulder region (study day 22).

Table 1. Study Design

Group	IVP	N	Vaccination ¹		Challenge ²		Necropsy
			Study Days	Route	Study Day	Dose	Study Day
T01	Adjuvanted Placebo QuilA/cholesterol/DDA/Carbopol (QC/DC)	10	0 and 22	SC	42	10 ⁶ TCID ₅₀	46
T02	Adjuvanted Placebo (QC/DC)	10					56
T03	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 (QC/DC)	10					46
T04	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 (QC/DC)	10					56
T05	CRCoV monovalent RTU (QC/DC; emulsified)	10					46
T06	CRCoV monovalent RTU (QC/DC; emulsified)	10					56

¹ Investigational Veterinary Product (IVP) was administered (SC) subcutaneously.

² Challenge dose with CRCoV Max isolate at passage 1 intranasally.

RTU: Ready-to-use liquid vaccine.

After the first vaccination, animals were observed daily (from study days 1 through 8) for post vaccination injection swelling. After the second vaccination, animals were observed daily for post vaccination injection swelling through day 29.

5 Observations were continued twice weekly for animals that had injection site swelling/pain beyond the days listed above, until swelling/pain resolved. Tympanic temperatures were collected daily for one week after each vaccination.

Blood samples (approximately 8 mL) for serology were collected in SST tubes on study day 42 prior to challenge. Tympanic temperatures were collected on study
10 days 40, 41, and 42 pre-challenge. Two types of oropharyngeal swabs (VTM [Virus Transport Medium] for virus isolation, and Amies for bacterial isolation) were collected from each dog prior to challenge on study day 42. Animals were observed once daily pre-challenge on study days 40, 41, and 42, for clinical signs of respiratory disease to establish baseline values.

15 On study day 42, all animals were challenged intranasally (IN) with the CRCoV challenge virus at a target challenge dose of 10⁶/mL/dog. All animals were sedated

prior to challenge administration by intravenous injection of Domitor®. After sedation, each animal received 1.0 mL of challenge virus, given approximately 0.5 mL per nostril slowly using a syringe without a needle. After challenge administration, sedation was reversed by an intramuscular injection of Antisedan®.

5 Tympanic temperatures, clinical observations, and oropharyngeal swabs were collected daily post-challenge from study day 42 to 56. Blood samples (approximately 5 mL) for serology were collected on study day 46 and study day 56 (prior to necropsy).

10 At necropsy, the complete lung and trachea was aseptically removed and placed on a sterile drape, and the lung lobes were evaluated grossly for lung lesions (consolidation). Each lung lobe was scored for percentage of lung consolidation. One lung set had insufficient exsanguination, and was not evaluated. The trachea was transected, the lumen evaluated for gross pathology, and any findings were recorded.

15 After the lungs had been scored, the right caudal lung lobe was lavaged by flushing with approximately 30.0 mL of media for bacteriological analysis and virus isolation. A pair of tissue samples was collected from the trachea and the nasal cavity, one for virus isolation and the second for histopathology. The right cranial lung lobes were divided into three samples, including one for bacteriology sampling.

20 Blood for serology was collected on pre-determined study days.

Results. All animals were confirmed by IFA testing to be negative for antibodies (IFA titer <40) against CRCoV before study day 0. Oropharyngeal swabs evaluated for CRCoV virus isolation confirmed that all animals were free of CRCoV on study day 0 prior to vaccination. Placebo-vaccinated controls remained CRCoV

25 seronegative until study day 42. The group was confirmed CRCoV-free by virus isolation on study day 42, indicating lack of extraneous CRCoV in the facility. All dogs were confirmed to be free of *Bordetella bronchiseptica* on study day 42.

An ELISA assay was used to measure the CRCoV antigen concentration in the vaccine as relative antigen unit (RAU) against a specific batch of CRCoV

30 designated reference antigen. CRCoV antigen was determined to be 0.5 RAU/dose.

Following vaccination, the majority of the vaccinated dogs, including the placebo-vaccinated group, developed an injection swelling at the injection site. For the monovalent vaccinated group, the swelling sizes were generally small (2 cm or less in the longest dimension) in the majority of the vaccinates. These swellings resolved within two weeks for the majority of the dogs. There was no pain or systemic reactions related to the vaccine in any of the vaccinated dogs. No clinical fever ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$) was observed, except in one dog, although the elevated temperature in that dog was not related to vaccination (the temperature was collected prior to the second vaccination). These findings indicate that the monovalent vaccine causes only injection swellings within what is expected for an adjuvanted vaccine.

Serum neutralization titers were tabulated and compared between groups. All monovalent-vaccinated dogs (100%) developed SN titers (GMT 371) three weeks after the second vaccination, indicating active immunization. A strong post-challenge (anamnestic) serum-neutralizing response was measured on day 56 in the combination vaccinated dogs (GMT 6,915) compared to the placebo-vaccinated dogs (GMT 471). These results were statistically significantly different, and indicate that the CRCoV vaccine antigen effectively stimulated and primed the immune responses of dogs against CRCoV infection.

Following challenge, all placebo-vaccinated animals (100%) shed virus in their oropharyngeal secretions at least for one day between day 1 and day 6 post-challenge, indicating induction of CRCoV infection. The monovalent vaccine significantly reduced ($p = 0.0237$) the mean number of days with oropharyngeal shedding (2.1 days) when compared to placebo (3.3 days), indicating vaccine efficacy in reducing CRCoV infection.

All placebo-vaccinated dogs (100%) tested positive for virus isolation on day 4 post-challenge in their trachea, nasal cavity, and lungs, indicating CRCoV infection of the respiratory organs. There was no virus isolated from any organ on day 14 post-challenge, suggesting a typical respiratory viral infection similar to canine influenza. By contrast, the monovalent vaccine prevented infection in 90% and 50% of the vaccinated dogs' lungs ($p\text{-value} < 0.0001$) and trachea ($p\text{-value} < 0.0237$),

respectively. This indicates that the monovalent vaccine induced sufficient immunity that prevented virus infection in these critical organs. There were no significant differences in the rate of nasal cavity infection between vaccinates and controls.

The CRCoV challenge caused only mild clinical signs under experimental conditions. Ocular and nasal discharges and conjunctivitis were reported in dogs across treatment groups. There were 5 animals reported with clinical fever ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$) during the post challenge period- two in the placebo groups, one in a monovalent vaccine group, and two in the combination vaccine groups.

Gross evaluation of the lungs, trachea, and nasal turbinates was performed on day 4 and 14 post-challenge. There was no remarkable gross lesion reported, except that two dogs- one in T05, one in T01- had low levels of lung consolidation; Two dogs- one in T01, one in T03 had focal areas of necrosis in the nasal turbinates.

For histopathology, lung, trachea, and nasal cavity tissues were examined and scored. Depending on the extent of changes observed, a score (0 to 4) was assigned. Changes attributable to the challenge were most notable in the nasal turbinates, then the trachea, and finally the lungs. This is consistent with a respiratory challenge virus that has its primary effect on the upper respiratory tract (nasal turbinates and trachea), with a subsequent and lesser effect on the lower respiratory tract (lung). This demonstrates that the CRCoV infection caused tissue pathology in the respiratory organs.

Previous studies have shown that ciliary damage in the trachea on day 4 post-challenge is a characteristic pathologic sequel of CRCoV infection. The data showed that the monovalent vaccine prevented tracheal ciliary damage in 60% of the animals when compared to placebo vaccinated (30% normal animals), but the reduction was not significant ($P=0.1538$). Diagnostic bacteriology performed on lungs and lung lavages confirmed that all animals were negative for *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella* spp., *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus canis*. Lung, lung lavage, or both were positive for *Mycoplasma* spp. in only 4 animals. This finding suggests that the lesions were specific for, and resulting from, the virus infection.

In summary, all CRCoV-vaccinated dogs (100%) in T03-T06 developed serum neutralizing titers three weeks after the second vaccination, indicating active immunization. The monovalent vaccine induced immune responses in the vaccinates that reduced virus shedding in oropharyngeal secretions and in respiratory organs. It also reduced tracheal ciliary damage in vaccinates compared to placebo-vaccinated controls. The histopathological examination showed that the monovalent vaccine prevented tracheal ciliary damage in 60% of the animals when compared to placebo-vaccinated animals (30%).

Example 2. Efficacy Testing of a Bivalent CRCoV/CIV Vaccine in Dogs

Sixty 7- to 8-week old beagle dogs in good general health were used in the study. All animals received a physical examination upon arrival on study day -9. All animals, with the exception of one dog that was removed on study day -7, received a second physical examination on study day -2, and deemed suitable for the study.

Animals were observed once daily for general health status from arrival study day -7 to study day 39. Blood samples (approximately 6 mL) for serology were collected in serum separation tubes (SST) on study days 0 and 21 prior to each vaccination. Two sets of nasal swabs- one for CRCoV and one for CIV virus isolation- were collected from each dog prior to vaccination on Day 0 to confirm freedom from CRCoV and CIV. Tympanic temperature was collected and documented on Days -1 and 0 prior to vaccination, to establish a baseline prior to vaccination. Tympanic temperatures were collected prior to second vaccination on Day 21. Animals were palpated on the shoulder region on study days 0 and 21 prior to vaccination, to ensure that no pre-existing lesions were present on the injection site area.

One dog in T04 was removed from the study due to respiratory distress on study day -7. One dog in T05 was removed from the study due to respiratory distress on study day 0 prior to vaccination. Additionally, two animals were removed from the study post-inclusion due to conditions unrelated to the conduct of the study. One dog in T06 was removed from study on study day 21 prior to receiving the second

vaccination due to respiratory distress. One dog in T02 was removed from the study on day 21 prior to receiving the second vaccination, due to unresolved keratoconjunctivitis and prolapsed nictitans.

Two bivalent vaccines were prepared, an inactivated CRCoV/inactivated CIV vaccine adjuvanted with Emulsigen® at 5% v/v, and an inactivated CRCoV/inactivated CIV vaccine adjuvanted with Rehydragel™ at 5% v/v (Table 2). The CRCoV vaccine strain was derived from that deposited with the ATCC as PTA-11444. The CIV vaccine strain was derived from what was deposited with the ATCC as PTA-7694. Both antigen bulks used to make the vaccines were produced at maximum passage of virus and cells, to meet immunogenicity requirements. The CRCoV antigen was formulated to target 1.55 RAU/dose. The CIV antigen was formulated to target 640 HA Units/dose.

Table 3. Study Design

Group	IVP	N	Vaccination ¹		Challenge ²		Necropsy
			Study Days	Route	Study Day	Dose	Study Day
T01	Saline	10	0 and 21	SC	42	10 ⁶ TCID ₅₀	46
T02	Saline	9					56
T03	CRCoV-CIV 5% AIOH	10					46
T04	CRCoV-CIV 5% AIOH	9					56
T05	CRCoV-CIV 5% Emulsigen®	9					46
T06	CRCoV-CIV 5% Emulsigen®	9					56

¹ Investigational Veterinary Product (IVP) was administered subcutaneously (SC).

² Target challenge dose of CRCoV Max isolate (passage 1), administered intranasally. AIOH: Aluminum hydroxide gel

A heterologous CRCoV isolate ("Max" strain; passage 1) was used as the challenge material. The virus stock material was propagated and titrated on HRT18G cells and determined to have a titer of 10^{7.1} TCID₅₀/mL. This challenge material was

tested and confirmed satisfactory for sterility testing, being free of mycoplasma and canine/feline extraneous agents.

Animals were vaccinated with the appropriate vaccine or placebo on Days 0 and 21 (Table 2.). The first vaccination was administered in the right shoulder region on Day 0, and the second vaccination was administered in the left shoulder region on Day 21.

Animals were observed daily for injection swelling/pain after first vaccination from study days 0 to 8, and thereafter on study days 12, 15, 19, 21, 22, and 26. On study day 8, swelling observations for 18 animals were inadvertently not recorded. On study day 21, extra observations for right shoulder (first dose vaccination) observations were recorded for some animals.

After vaccination on study day 21, animals were observed daily for injection swelling/pain post vaccination on study days 21 to 29, and thereafter on study days 33, 36, and 40. All swellings resulting from the second vaccination were resolved by study Day 40. Tympanic temperatures were collected on Vaccination Days 0 to 7 and 21 to 28, approximately 3 hours following each vaccination.

Blood samples (approximately 6 mL) for serology were collected in SST tubes on study day 42 prior to challenge. Also prior to challenge, tympanic temperatures were collected on study days 40, 41, and 42, to establish baseline values. Two types of nasal swabs (VTM for CRCoV virus isolation; Amies for bacterial isolation) were collected from each dog prior to challenge on study day 42. Animals were observed once daily pre-challenge on study days 40, 41, and 42 for clinical signs of respiratory disease, to establish baseline values.

Each group of six dogs from all treatment groups was administered the challenge virus by aerosolization of 19 mL of challenge material in the Plexiglass chamber for approximately 30 minutes. The volume of challenge virus nebulized in the chamber was adjusted proportionally when less than six dogs were challenged at a time. Virus titration performed on CRCoV challenge samples collected after challenge administration confirmed that the amount of live challenge virus aerosolized in the chamber contained $10^{5.1}$ TCID₅₀ / mL. Post challenge, tympanic

temperatures, clinical observations, and nasal swabs (Sterile Dacron Swabs, Puritan 25-806-1PD) for virus isolation (VTM tubes) were collected daily from dogs from study day 42 to 56. Blood samples (approximately 6 mL) for serology were collected on study day 46 and study day 56 prior to necropsy.

5 At necropsy, the complete lung and trachea were aseptically removed and placed on a sterile drape. The lung lobes were evaluated grossly for lung lesions (consolidation). Each lung lobe was scored for percentage of lung consolidation. Lung sets from two animals had insufficient exsanguination, and could not be evaluated and scored. The trachea was transected, the lumen evaluated for gross
10 pathology, and any findings were recorded. After the lungs had been scored, each right caudal lung lobe was lavaged by flushing with approximately 30.0 mL of VTM (no antibiotic) for diagnostic bacteriological analysis and for virus isolation.

 After the lungs were scored, tissue samples were collected from the trachea, and nasal cavity, and the whole left middle lung lobe was collected for
15 histopathology. Tissue samples were collected from the trachea, the nasal cavity, and right cranial lung lobe for virus isolation and for bacteriology.

 Blood for serology was collected on pre-determined study days.

 Nasal swabs (Amies transport medium without charcoal) were collected from each dog only on study day 42 (prior to challenge) for diagnostic bacteriology. These
20 swabs were tested for the presence of *Bordetella* spp., *Pasteurella* spp., *Staphylococcus* spp., *Mycoplasma* spp. and *Streptococcus canis*.

Results. Fifty-nine beagle puppies were confirmed by IFA testing to be negative for antibodies (IFA titer <40) against CRCoV on study day 0 prior to vaccination. Serum samples were also tested by serum neutralization and confirmed
25 to be negative (SN titer <20) for antibodies to CRCoV. Nasal swabs evaluated for CRCoV virus isolation confirmed that all animals were free of CRCoV virus on study day 0 prior to vaccination. CIV virus and antibody testing on study day 0 confirmed that the animals to be free of CIV virus and CIV HAI antibodies (HAI titer <8). Based on these two criteria, the animals were confirmed susceptible, and therefore suitable
30 for evaluation of the efficacy and safety of CRCoV and CIV vaccines. Saline-

vaccinated controls remained CRCoV seronegative until study day 42. All animals were confirmed CRCoV-free by virus isolation study day 42, indicating lack of extraneous CRCoV exposure in the facility. All dogs were confirmed to be free of *Bordetella bronchiseptica* on study day 42 (pre-challenge).

5 Dogs were vaccinated with two formulations containing inactivated CRCoV and inactivated CIV antigens, adjuvanted with either Emulsigen® or Rehydragel™. CRCoV antigen potency in the vaccine was measured by a double-antibody sandwich ELISA, employing a CRCoV-specific serum neutralizing monoclonal antibody 41.1.1. Measured against a designated reference antigen, potency was
10 determined to be 1.14 RAU/dose. The guinea pig HAI titer of CIV was 955. (Pass criterion was an HAI titer ≥ 161 .)

 Ten out of the 19 animals that received the Emulsigen® formulation (T05 and T06) developed measureable injection swelling after the first vaccination. There was scratching reported in the majority of dogs immediately following vaccination. Pain to
15 touch was reported in only 2 dogs. Except for one dog, the swellings in this group were all resolved by the next day. There was a slight numerical increase in injection swelling in size and frequency after the second vaccination, but they were all within what is expected as a typical reaction to an adjuvanted vaccine. There was no
20 systemic reaction reported in any of the vaccinated dogs, as confirmed by the lack of clinical fever ($\leq 39.5^\circ \text{C}$). These findings indicate that this vaccine formulation is safe to administer to dogs at this age group, and the safety profile is within what is expected for an adjuvanted vaccine.

 The majority of dogs (T03 and T04) that received the Rehydragel™
25 formulation developed injection swelling after each vaccination. The swellings appeared three days after the first vaccination, with the majority of swellings resolved by study day 19. A similar reaction was seen after the second vaccination, where the majority of swellings resolved by study day 36. The injection swellings were generally small in size, and typical of Alum adjuvant reactions. There was no pain and no fever reported, confirming the lack of systemic reaction to vaccination. These findings

indicate that this vaccine formulation is safe to administer to dogs at this age group, and the safety profile is within what is expected for an adjuvanted vaccine.

Serum neutralization titers were tabulated, and compared between groups (Figure 1). Both vaccine formulations induced serum neutralizing antibody (SN) responses in all the vaccinated dogs after the first dose, indicating active immunization (Figure 1). The geometric mean SN response (GMT for Rehydralgel™ = 552; GMT for Emulsigen® = 2030) increased after the second vaccination, indicating a booster effect of the second vaccination. Both vaccine formulations resulted in a robust anamnestic SN response after challenge (GMT for Rehydralgel™ = 10,725 and Emulsigen® = 11,584 on study day 56 for the remaining dogs in the study), indicating an effective immune memory response. It is important to note that the antibody response to CRCoV was achieved in the presence of a CIV antigen, indicating lack of interference between the antigens in the bivalent vaccine.

Fifty-six dogs remaining in the study were challenged on study day 42 by aerosolization. Post-challenge nasal virus isolation demonstrated that all saline-vaccinated dogs (100%) shed challenge virus for at least three days between days 1 and 6 post challenge, indicating the infection of dogs by CRCoV, with a 4.5 mean number of days of shedding (Figure 2). The two vaccine formulations significantly reduced the virus shedding to 2.6 days ($p < 0.0001$) and 3.4 days ($p = 0.0042$) for Rehydralgel™ and Emulsigen®, respectively. These findings indicate that the vaccines induced efficacy that resulted in reduction of virus infection.

Tissue virus isolation data showed that 90-100% of the dogs in the saline-vaccinated group were positive for virus in their nasal cavity, trachea, and lung tissues on study day 4 post-challenge, indicating infections of the respiratory organs (Figure 3). By contrast, both vaccines significantly reduced the percentage of animals positive for virus isolation in the lungs ($p < 0.0001$) and in the nasal cavity ($p < 0.002$). While both vaccines reduced virus isolation in the trachea (virus isolated from 70% for Rehydralgel™ group and from 44% for Emulsigen® group), only the Emulsigen® formulation resulted in significant reduction of virus isolation when compared to the saline controls ($p = 0.0089$). There was no virus isolated from any animals on day 14

post-challenge, indicating that the CRCoV infection is rapid in entering and leaving the respiratory tissues, a scenario similar to canine influenza. The virus isolation data indicate that both vaccine formulations significantly reduced virus infection in dogs.

The CRCoV challenge caused only mild respiratory clinical signs under experimental conditions. Ocular and nasal discharges were reported in dogs across treatment groups.

Except for one animal on study day 41 (one day prior to challenge) in the saline control group, all animals had normal temperatures prior to challenge. There were two animals in the saline control group reported with clinical fever after challenge. Both dogs had temperatures of 39.6° C on day 2 post-challenge (study day 44). One of those dogs showed fever again (40° C) on day 4 post-challenge. That dog received treatment for concurrent gastroenteritis. This may explain the fever response following CRCoV challenge in this dog, since this virus has not been shown previously to cause fever under experimental condition. There was no clinical fever reported in any of the vaccinated dogs.

Gross necropsy evaluation of the lungs, trachea, and nasal turbinates was performed on day 4 and 14 post-challenge. There was no remarkable gross lesion reported, except for lung consolidation in two dogs from T05, two dogs from T01, and one dog from T02. The cause of these lesions was unclear, but unlikely due to CRCoV, since the lesions were not consistent, and CRCoV has not been shown to cause lung consolidation. Examination of the diagnostic bacteriology of the tissues did not suggest the involvement of any other pathogen.

The lung, trachea, and nasal cavity tissue sections were examined and scored. Depending on the extent of changes observed, a score (0 to 4) was assigned. Previous studies conducted have shown that the ciliary damage in the tracheal epithelia on day 4 post-challenge is a characteristic pathologic effect associated with CRCoV infection. (Priestnall et al 2009) The histopathology data revealed that 70% of saline-vaccinated dogs experienced some degree of tracheal ciliated-epithelial damage on day 4 post-challenge. By contrast, both vaccines reduced the number of affected dogs to 40% for the Rehydragel™ (p=0.1184) and

0% for the Emulsigen® ($p=0.0003$). This indicates that the vaccines induced efficacy that protected against or reduced the tracheal mucociliary damage, an important innate defense mechanism, in infected dogs.

To assess potential involvement of other respiratory pathogens in the study, animals were tested for diagnostic bacteriology prior to challenge (nasal swabs) and after challenge (lung tissue/lavage). Results obtained demonstrated that the animals were mostly free of other respiratory pathogens, indicating that the clinical outcome measured after challenge was due specifically to CRCoV infection.

In summary, all CRCoV-CIV-vaccinated dogs (100%) developed CRCoV serum neutralizing antibody titers three weeks after the second vaccination, indicating active immunization followed by strong post-challenge anamnestic response, indicating good priming of the immune system. The two vaccine formulations significantly reduced viral shedding. Both vaccine formulations significantly reduced the percentage of animals positive for virus isolation in the lungs ($p<0.0001$) and in the nasal cavity ($p<0.002$). Both vaccines reduced virus isolation in the trachea, albeit only the Emulsigen® formulation resulted in significant reduction of virus isolation when compared to the saline controls ($p=0.0089$). Both of the vaccines also reduced the number of tracheal ciliated-epithelial affected dogs. Efficacy of the CRCoV antigen in these vaccines was achieved in the presence of CIV antigen, indicating lack of interference on the CRCoV by CIV fraction.

Example 3. Safety and Efficacy of *Bordetella bronchiseptica*-Containing Vaccines in Dogs

Fifty (50) dogs, divided into 5 treatment groups, were selected for the study. Animals were determined to be fit for the study based on a physical examination on Day -4,

Blood samples (approximately 8 mL) for serology were collected in SST tubes from all animals on Study Days -2, 21 and 28 prior to each vaccination. The serum samples collected on Day -2 were used to confirm animals were free of *B.*

bronchiseptica. Nasal swabs were collected prior to vaccination on Day 0, and tested

for the presence of *B. bronchiseptica*. Tympanic temperatures were collected starting on Day -4, to establish a baseline prior to vaccination.

Animals were vaccinated with the appropriate vaccine on Days 0, 21, and 28 according to the study design shown in Table 4. The vaccines were administered subcutaneously to each dog in the right shoulder region for the first vaccination, and in the left shoulder region for the second vaccination.

Table 4. Study Design

Group	IVP	N	Vaccination ¹			Challenge ²		
			Vol (mL)	Study Days	Route	Study Day	Target Dose/Dog	Route
T01	<i>B. bronchiseptica</i> (inactivated) + Pertactin (10µg) No Adjuvant	10	1.0	0 and 28	SC	56	10 ⁹	Intranasal (aerosol; chamber)
T02	Saline	10	1.0	0 and 28				
T03	<i>B. bronchiseptica</i> (inactivated) + Pertactin (10µg) No Adjuvant	10	1.0	0 and 21				
T04	CRCoV/CIV/CPIV / CAV2 rehydrated with <i>B. bronchiseptica</i> (inactivated) + Pertactin (10µg) No Adjuvant	10	1.0	0 and 28				
T05	CRCoV/CIV/CPIV / CAV2 rehydrated with water (diluent)	10	1.0	0 and 28				

¹ Investigational Veterinary Product (IVP) was administered (SC) subcutaneously.

² Target challenge dose of 10⁹ organisms of *Bordetella bronchiseptica* strain.

All animals were observed on vaccination Days 0, 21, and 28 for injection site reactions following vaccination. They were observed daily for injection reactions post vaccination from Days 1 to 7 and 22-35. Tympanic temperatures were collected on Days 0 to 7 and 21 to 35.

5 Blood samples (approximately 6 mL) for serology were collected on Day 55, one day prior to challenge. Tympanic temperatures were collected on Days 54, 55, and 56 prior to challenge. Nasal swabs were collected on Day 55, one day prior to challenge, and tested for the presence of *B. bronchiseptica*. Animals were observed twice daily (a.m. and p.m.), approximately 30 minutes each session on Days 54 and
10 55, and in the a.m. on Day 56, for clinical signs of respiratory disease, in order to establish baseline values.

Bordetella bronchiseptica challenge strain was used to prepare a target challenge dose of 10^9 CFU/4 mL/dog. On Day 56, dogs from all treatment groups were challenged intranasally with *B. bronchiseptica* by aerosolization in a Plexiglas
15 chamber for a total of 30 minutes for each pen challenged. Five dogs from the same pen (one from each treatment group) were challenged at a time.

Tympanic temperatures was recorded once daily after challenge from Days 56 to 77. Clinical observations were performed twice daily (a.m. and p.m.), for approximately 30 minutes in each room per each session, from Day 56 and until Day
20 76 and once (a.m.) on Day 77. Briefly, cough, nasal discharge, sneeze, ocular discharge, retch, and depression were observed using the following scoring system: Absent (0), Mild (1), Moderate (2), and Severe (3). Nasal swabs were collected on Days 59, 62, 66, 69, 74, 76 and 77, to determine shedding of challenge organisms.

Blood samples (approximately 6 mL) for serology were collected on Day 77.
25 Nasal swabs for isolation of *B. bronchiseptica* were collected using swabs and transport media.

Agglutinating antibodies to *B. bronchiseptica* were determined by the Micro Agglutination Test (MAT). Serum samples from treatment groups T04 and T05 from Days 0, 28, 55, and 77 were titrated for CRCoV antibodies by serum neutralization
30 and IFA, and for CIV by HAI. *B. bronchiseptica* isolation from nasal swabs was

performed according to standard procedure. Each sample was tested qualitatively for the presence or absence of bacteria.

Results. Fifty (50) healthy approximately 8-week-old beagle puppies were confirmed by nasal swab culture isolation to be free of *B. bronchiseptica* organisms on Day 0. Serum samples evaluated for *B. bronchiseptica* agglutinating antibodies by the MAT confirmed that all puppies were susceptible with MAT titers of ≤ 8 on Day -2.

All experimental vaccines evaluated in this study produced mild to no injection swellings after the first vaccination. Injection swellings were limited to study day 0 for the majority of vaccinates. Mild to no injection swellings were also reported after the second vaccination. The injection site swellings when they occurred, resolved between one to three days after the second vaccination. Scratching was reported predominantly in the 5-way combination group (T04). There was no clinical fever reported after vaccinations. There were no injection swellings reported in the saline group. The data confirmed the safety of the vaccines.

The colony count performed before and after challenge inoculation confirmed that an average of 1.45×10^8 CFU *Bordetella* per dog were aerosolized in the chamber. Challenge inoculation induced cough in all saline control dogs (T02) with a mean percentage observation coughed of 43.5% and 12.2 days coughed. Treatment group T05, vaccinated with 4-way viral only (CRCoV/CIV/CPIV/CAV2) without *Bordetella* antigen developed cough similar to the saline control with a mean percentage observation coughed of 43.4% and 12.2 days coughed. These findings indicate that the challenge was adequate and consistent to evaluate the test vaccines.

Dogs in treatment group T01 vaccinated with the *Bordetella* vaccine were significantly protected against challenge (3.6 days coughed, $p < 0.0001$) when compared to the control group (12.2 days coughed). The same vaccine also significantly protected dogs in T03 when given at 3-weeks interval regimen (5.8 days coughed, $p = 0.0004$). The reduction in cough scores in these two groups (T01 vs T03)

was not significantly different (p -value=0.1883) suggesting that the level of protection for the vaccine given with a 3 or 4 weeks interval, is similar.

Dogs in T04 that received the non-adjuvanted 5-way combination vaccine were significantly (p =0.0016) protected against *Bordetella* challenge (6.6 days coughed) when compared to the saline controls (12.2 days coughed), and when compared to T05 receiving the 4-way viral (CRCoV/CIV/CPIV/CAV2) combination (12.1 days coughed, p =0.0019) indicating efficacy of the *Bordetella* fraction in the combination vaccine lacking adjuvant.

Serological evaluation of the viral fractions in the 5-way combination vaccine was possible for only two fractions, the CIV and CRCoV, where dogs were confirmed seronegative on study day -2. CIV HAI response in the 4-way vaccine group (T04) on study day 56 were numerically similar to that in the 5-way vaccine group (T05) and indicate lack of interference by the *Bordetella* fraction on the CIV antigen. CRCoV SN responses on study day 56 were numerically higher in the 4-way vaccine group (T04) than in the 5-way vaccine group (T05), indicating possible interference by the *Bordetella* on the CRCoV fraction. However, these findings are not conclusive since these vaccines were not adjuvanted and the formulation was not optimized and CRCoV challenge was not conducted to test efficacy.

The monovalent *Bordetella* vaccine was confirmed to be safe and efficacious. The efficacy of the monovalent vaccine was demonstrated when the vaccine was given at 21- or 28-day intervals. The *Bordetella* fraction was also shown to be efficacious when given in a 5-way non-adjuvanted combination vaccine.

Example 4. Multivalent serology study

Forty dogs, approximately 8 weeks of age and in good general health, were pre-screened for *Bordetella bronchiseptica* by Micro Agglutination Test (MAT), and for canine respiratory coronavirus (CRCoV) by indirect fluorescent antibody assay (IFA). Serum neutralization (SN) was also used to evaluate antibody levels. On Day 0, all dogs were negative for antibodies to *Bordetella bronchiseptica* as determined by MAT (≤ 16), and negative for antibodies to CRCoV as determined by IFA (< 40). All

dogs were also free of *Bordetella bronchiseptica* and CRCoV, as determined by nasal swab isolation test prior to first vaccination (Day 0).

Dogs were divided into 5 treatment groups of 8 dogs each, and vaccinated according to the study design shown in Table 1. The vaccines were administered to each dog in the right shoulder region for the first vaccination, and in the left shoulder region for the second vaccination.

Table 2. Study Design

Treatment Group	Investigational Veterinary Product (IVP)	Adjuvant	N	Vaccination ¹	
				Study Days	Route
T01	CAV2/CPIV/CPV/L4	5% Rehydragel	8	0 and 21	Subcutaneously (SC)
T02	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	QCDC	8		
T03	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	1% EMA ¹ / 3% Neocryl/ 5% Emulsigen SA	8		
T04	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	QCDC	8		
T05	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	QCDC	8		

¹ EMA= ethylene maleic anhydride

Following the second vaccination, due to complications, groups T04 and T05 were removed from the study. Dogs in the remaining groups (T01, T02, and T03) were observed daily for post vaccination reactions, and monitored for body (tympenic) temperature for 7 days after each vaccination. Blood samples were collected from dogs on Days 0, 21, 42 and 56 to measure antibody responses.

Serum samples from Day 0, 21, 42 and 56 were tested for agglutinating antibodies to *Bordetella bronchiseptica* by the MAT assay. Serum samples from the same days were also titrated for CRCoV antibodies by serum neutralization, for CIV by HAI, and for CAV-2 and CPI antibodies by serum neutralization. Geometric mean antibody titers were obtained for each treatment group.

The test vaccines in groups T02 and T03 induced antibody responses in all (100%) the vaccinated dogs after the second dose, indicating active immunization against the viral antigens. The antibody response increased after the second vaccination in the majority of vaccinated dogs, indicating a booster effect of the second vaccination. It is important to note that the antibody responses among the viral fractions was achieved in the presence of multiple viral and bacterial (*B. bronchiseptica*) antigens, indicating lack of immunological interference. The MAT serology is not correlative to protection against *Bordetella*, but is rather a valuable screening tool to enroll suitable study animals. In conclusion, based on the immunological response in vaccinated dogs, efficacy of the viral antigens is predicted in the 5 way multivalent vaccine.

Example 5. Duration of Immunity Study

The purpose of this study is to demonstrate the duration of immunity of a multivalent respiratory combination vaccine in dogs. The vaccine contains the following antigenic components: modified-live CAV-2, modified-live CPIV, inactivated CIV, inactivated CRCoV and a *Bordetella bronchiseptica* extract supplemented with a recombinant antigen, either pertactin, Bsp22, or both.

All animals are in good general health, and have not received any vaccinations for any of the pathogens for which the vaccine is designed to protect against. Dogs are divided into multiple sets of treatment groups. Each set consists of two treatment groups, a control group receiving a placebo vaccine, and a vaccinate group receiving the test vaccine. Animals are vaccinated twice, approximately 2-4 weeks apart. They are observed for injection site reactions following each vaccination.

Approximately 3-12 months following vaccination, each set of two treatment groups (vaccinates and controls) are challenged with one of the pathogens for which the vaccine is designed to protect against. Clinical observations are performed leading up to and following challenge. Nasal swabs for isolation of the challenge pathogen are collected during the post challenge period. Blood from each animal is collected for obtaining serum, which is used for subsequent analytical analysis.

Clinical signs of respiratory disease, pathogen shedding post challenge, and serological responses are used as criteria to judge the efficacy of vaccines.

All of the foregoing references are hereby incorporated by reference as if set forth fully herein.

5 Having thus described in detail various embodiments of the present invention, it is to be understood that the invention defined by the appended claims is not to be limited to particular details set forth in the above description as many apparent variations thereof are possible without departing from the spirit or scope of the present invention.

10

CLAIMS

We claim:

1. An immunogenic composition comprising a canine influenza virus (CIV) and a canine respiratory coronavirus (CRCoV).
- 5 2. The immunogenic composition of claim 1, further comprising *Bordetella bronchiseptica*.
3. The immunogenic composition of claim 2, further comprising a p68 pertactin antigen.
4. The immunogenic composition of claim 2, wherein said *Bordetella*
10 *bronchiseptica* is a bacterin or a bacterial extract.
5. The immunogenic composition of claim 2, further comprising one or both antigens selected from canine parainfluenza virus (CPIV) and canine adenovirus type 2 (CAV-2).
6. The immunogenic composition of claim 5, wherein the one or both antigens are
15 CPIV and CAV-2.
7. The immunogenic composition of any one of claims 2 to 6, further comprising an isolated Bsp22 antigen.
8. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said composition is non-adjuvanted.
- 20 9. The immunogenic composition of any one of claims 1 to 7, further comprising an adjuvant.
10. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said composition does not contain a non-respiratory antigen.
11. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said
25 composition induces an immune response to a canine respiratory pathogen in a canine.
12. The immunogenic composition of claim 11, wherein said canine respiratory pathogen is at least one of CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica*, and *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*).

13. A use of the immunogenic composition of any one of claims 1 to 10 for the treatment or prevention of infection from a canine respiratory pathogen in a canine.
14. The use of claim 13, wherein said canine respiratory pathogen is at least one of CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica*, and *M. cynos*.
15. The use of claim 13 or 14, wherein said composition prevents said infection for a period of about six months or more.
16. The use of claim 13 or 14, wherein said composition prevents said infection for a period of about one year.
17. A use of the immunogenic composition of any one of claims 1 to 10 in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of infection from a canine respiratory pathogen in a canine.
18. The immunogenic composition of any one of claims 1 to 10, wherein said composition treats or prevents canine infectious respiratory disease complex (CIRDC) in a canine.
19. A method of treating or preventing CIRDC in a canine comprising administering to said canine the immunogenic composition of any one of claims 1 to 10.
20. The method of claim 19, wherein said composition prevents CIRDC for a period of about six months or more.
21. The method of claim 19, wherein said composition prevents CIRDC for a period of about one year.
22. A use of the immunogenic composition of any one of claims 1 to 10 in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of CIRDC in a canine.

FIG. 1

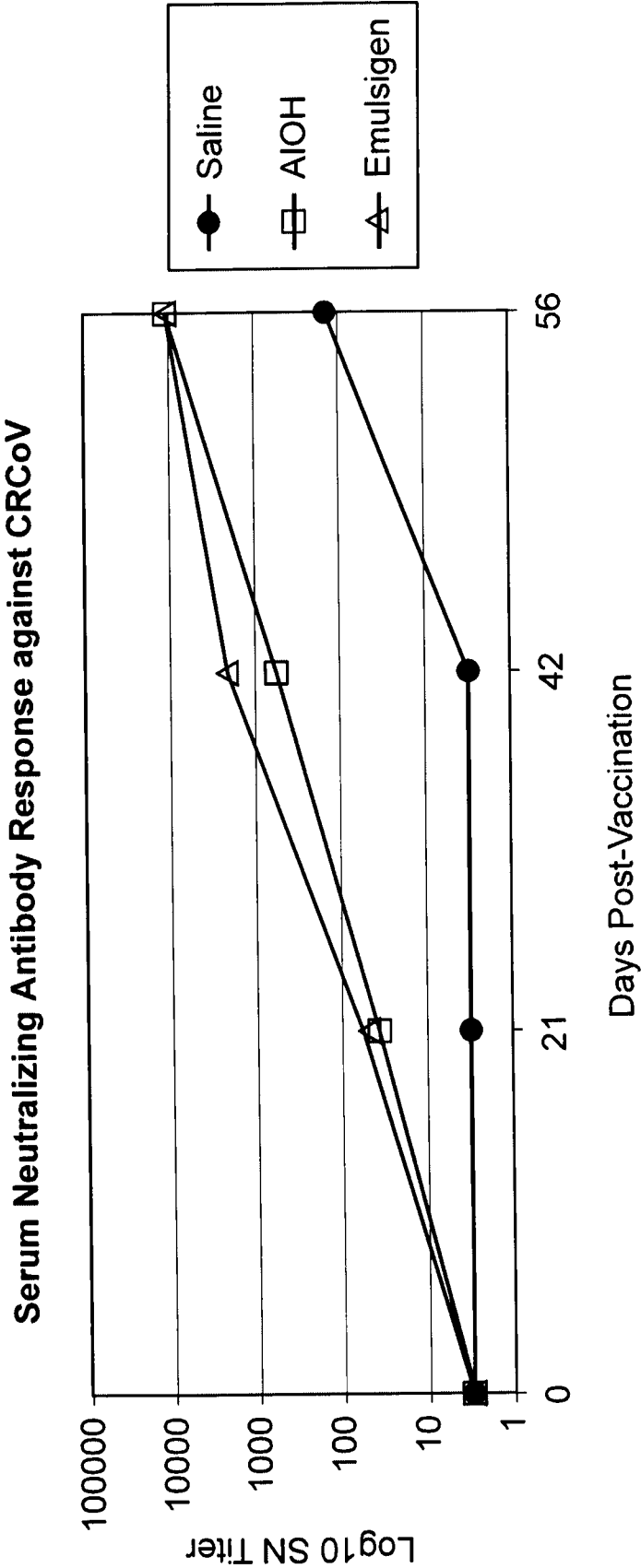
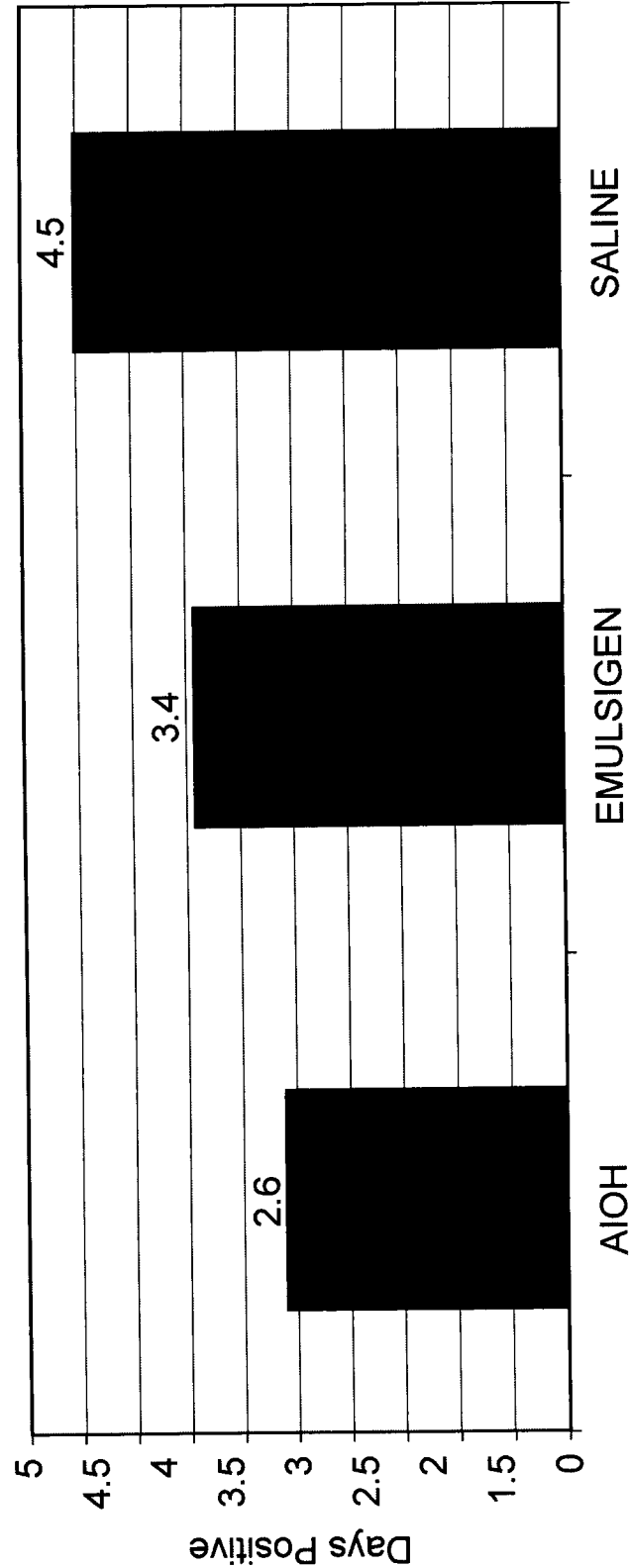


FIG. 2

Nasal Virus Shedding Post-Challenge

Mean Number of Days with Nasal Virus Isolation



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/145 A61K39/215 A61K39/10
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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)

EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/082012 A1 (SHIELDS SHELLY L [US] ET AL) 12 April 2007 (2007-04-12)	1-6,8-22
Y	paragraph [0002] paragraph [0066] paragraph [0108] paragraph [0113]	7
A	----- WO 2007/118206 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]; DUBOVI EDWARD J [US]) 18 October 2007 (2007-10-18) paragraph [0070]; claims 6,12	1-22
A	----- WO 2004/011651 A1 (ROYAL VETERINARY COLLEGE [GB]; BROWNLIE JOHN [GB]; CHALKER VICTORIA JA) 5 February 2004 (2004-02-05) page 54, line 11 - page 59, line 18 ----- -/--	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2012

Date of mailing of the international search report

07/05/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/047728 A2 (WYETH CORP [US]; GUGISBERG KIM [US]; GILL MICHAEL [US]; CHU HSIEN-JUE) 26 April 2007 (2007-04-26) abstract claims 1-27	1-22
A	----- WO 2007/048086 A2 (UNIV IOWA STATE RES FOUND INC [US]; YOON KYOUNG-JIN [US]; COOPER VICKI) 26 April 2007 (2007-04-26) paragraph [0012] paragraph [0078]	1-22
A	----- WO 2006/106424 A2 (PHARMACIA & UPJOHN CO LLC [US]; DOMINOWSKI PAUL JOSEPH [US]; FRANTZ JO) 12 October 2006 (2006-10-12) page 4, paragraph 6 page 13, paragraph 2 page 37, paragraph 3 - page 41, paragraph 2; example 5	1-22
A	----- WO 01/90143 A2 (PASTEUR INSTITUT [FR]; GUIISO MACLOUF NICOLE [FR]; BOURSAUX EUDE CAROLI) 29 November 2001 (2001-11-29) page 3, paragraph 3 page 16, paragraph 5 page 17, lines 12-14 claims 52,49	1-22
A	----- US 2004/185062 A1 (DOMINOWSKI PAUL J [US] ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23) paragraphs [0062] - [0065] paragraph [0067]	1-22
A	----- WO 2006/038115 A1 (PFIZER PROD INC [US]; FRANTZ JOSEPH [US]; NEWBY THOMAS JACK [US]; TUCK) 13 April 2006 (2006-04-13) page 13, lines 21-25	1-22
A	----- WO 2005/002618 A1 (ROYAL VETERINARY COLLEGE [GB]; BROWNLIE JOHN [GB]; CHALKER VICTORIA JA) 13 January 2005 (2005-01-13) page 3, paragraph 3 page 6, paragraph 3 page 14, paragraph 4 - page 15, paragraph 2 page 23, paragraph 2 - page 28, paragraph 4 page 29, paragraph 2 - page 30, paragraph 1	1-22
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEDHEKAR BOB ET AL: "Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo", MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 71, no. 2, January 2009 (2009-01), pages 492-504, XP002673904, ISSN: 0950-382X the whole document -----	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/050510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007082012 A1	12-04-2007	US 2007082012 A1	12-04-2007
		US 2008254063 A1	16-10-2008
WO 2007118206 A2	18-10-2007	US 2007253981 A1	01-11-2007
		WO 2007118206 A2	18-10-2007
WO 2004011651 A1	05-02-2004	AT 491793 T	15-01-2011
		AU 2003244822 A1	16-02-2004
		CA 2492333 A1	05-02-2004
		CA 2727782 A1	05-02-2004
		DK 1525313 T3	14-03-2011
		EP 1525313 A1	27-04-2005
		EP 2182066 A2	05-05-2010
		JP 4644486 B2	02-03-2011
		JP 2005533513 A	10-11-2005
		MX PA05001098 A	08-09-2005
		NZ 537778 A	30-04-2008
		NZ 556442 A	31-03-2009
		PT 1525313 E	14-03-2011
		SI 1525313 T1	31-03-2011
		US 2007248616 A1	25-10-2007
		US 2009081780 A1	26-03-2009
		WO 2004011651 A1	05-02-2004
WO 2007047728 A2	26-04-2007	AR 056712 A1	17-10-2007
		EP 1941033 A2	09-07-2008
		WO 2007047728 A2	26-04-2007
WO 2007048086 A2	26-04-2007	AR 056133 A1	19-09-2007
		AT 491468 T	15-01-2011
		AU 2006304895 A1	26-04-2007
		BR PI0617407 A2	26-07-2011
		CA 2626452 A1	26-04-2007
		EP 1933866 A2	25-06-2008
		HK 1112846 A1	01-04-2011
		JP 2009511080 A	19-03-2009
		KR 20080046706 A	27-05-2008
		NZ 567017 A	24-12-2010
		RS 20080174 A	15-07-2009
		US 2007098742 A1	03-05-2007
		US 2009035325 A1	05-02-2009
		WO 2007048086 A2	26-04-2007
WO 2006106424 A2	12-10-2006	AR 053042 A1	18-04-2007
		AU 2006231916 A1	12-10-2006
		CA 2604488 A1	12-10-2006
		EP 1871410 A2	02-01-2008
		US 2006251674 A1	09-11-2006
		WO 2006106424 A2	12-10-2006
WO 0190143 A2	29-11-2001	AT 393166 T	15-05-2008
		AU 6752701 A	03-12-2001
		DE 60133734 T2	14-05-2009
		DK 1284993 T3	28-07-2008
		EP 1284993 A2	26-02-2003
		ES 2303833 T3	01-09-2008
		JP 2003533990 A	18-11-2003
		PT 1284993 E	11-06-2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/050510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 0190143 A2	29-11-2001
-----		-----	-----
US 2004185062 A1	23-09-2004	US 2004185062 A1	23-09-2004
		US 2008175860 A1	24-07-2008
		US 2008226670 A1	18-09-2008
-----		-----	-----
WO 2006038115 A1	13-04-2006	AT 524193 T	15-09-2011
		AU 2005290921 A1	13-04-2006
		BR PI0516253 A	26-08-2008
		CA 2583689 A1	13-04-2006
		CN 101035558 A	12-09-2007
		CN 101791398 A	04-08-2010
		DK 1799253 T3	28-11-2011
		EP 1799253 A1	27-06-2007
		ES 2370750 T3	22-12-2011
		JP 4163245 B2	08-10-2008
		JP 2008239627 A	09-10-2008
		JP 2008515873 A	15-05-2008
		KR 20070050499 A	15-05-2007
		KR 20080096610 A	30-10-2008
		NZ 553867 A	29-10-2010
		NZ 576898 A	31-03-2011
		PT 1799253 E	10-11-2011
		SI 1799253 T1	30-11-2011
		WO 2006038115 A1	13-04-2006
		ZA 200702166 A	26-11-2008
-----		-----	-----
WO 2005002618 A1	13-01-2005	AT 442857 T	15-10-2009
		AU 2004253344 A1	13-01-2005
		BR PI0412194 A	22-08-2006
		CA 2530797 A1	13-01-2005
		CN 1845754 A	11-10-2006
		EP 1638599 A1	29-03-2006
		EP 2050463 A2	22-04-2009
		ES 2356396 T3	07-04-2011
		JP 2007526884 A	20-09-2007
		KR 20060106809 A	12-10-2006
		MX PA06000278 A	07-04-2006
		NZ 544453 A	30-04-2009
		US 2007098739 A1	03-05-2007
		US 2008220018 A1	11-09-2008
		US 2011059128 A1	10-03-2011
		WO 2005002618 A1	13-01-2005
		ZA 200600918 A	25-07-2007
-----		-----	-----

COMPOSICIONES PARA EL COMPLEJO DE ENFERMEDAD RESPIRATORIA CANINA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología, y en particular al campo de composiciones inmunogénicas y de vacuna. Se refiere a dichas composiciones para su uso contra enfermedades respiratorias caninas, incluyendo complejo de enfermedad respiratoria infecciosa canina (CERI). La presente invención también se refiere a procedimientos para vacunar contra,
10 tratar o prevenir enfermedades respiratorias caninas en un cánido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 El complejo de enfermedad respiratoria infecciosa canina (CERI) es una enfermedad altamente contagiosa que es común en perros alojados en
15 condiciones de hacinamiento, tales como centros de realojo y perreras residenciales o de entrenamiento. Muchos perros padecen solamente una tos suave y se recuperan después de un período corto. Sin embargo en algunos casos, puede desarrollarse una bronconeumonía grave.

 Se considera que la patogénesis de CERI es multifactorial, implicando
20 varios virus y bacterias. Los agentes infecciosos que se sabe que son agentes causantes de CERI incluyen coronavirus respiratorio canino (CRCoV) (Erles y col., Virology, 310 (2):216-223, 2003), virus de la gripe canina (CIV) (Crawford y col., Science, 310 (5747):482-485, 2005), virus paragripal canino (CPIV) (Binn y col., Exp. Biol. Med., 126:140-145, 1967), adenovirus canino de serotipo 2
25 (CAV-2) (Ditchfield y col., Can. Vet. J., 3:238-247, 1962), *Mycoplasma cynos*

(Chalker y col., Microbiology, 150:3491-3497, 2004), y la bacteria *Bordetella bronchiseptica* (Bemis y col., Lab. Anim. Sci., 29:48-52, 1977).

CRCoV provoca una infección respiratoria altamente contagiosa que se propaga por contacto directo entre perros, aerosoles de secreciones respiratorias y contacto con ambientes o personas contaminados. Algunos
5 perros tienen una enfermedad leve con síntomas que consisten en tos, estornudos y descarga nasal. Algunos perros tienen una infección subclínica sin señales clínicas, pero difunden virus que puede infectar a otros perros. Algunos perros infectados con CRCoV progresan a neumonía, particularmente
10 si se co-infectan con otros patógenos respiratorios.

Con respecto a CIV, el virus de la gripe equina se ha reconocido como un patógeno respiratorio principal en caballos desde aproximadamente 1956. Los síntomas de enfermedad provocados por virus de la gripe equina pueden ser graves, y con frecuencia se siguen de infecciones bacterianas secundarias.
15 Se reconocen dos subtipos de virus de gripe equina, concretamente subtipo-1, siendo el prototipo A/Equino/Praga/1/56 (H7N7) y el subtipo-2, siendo el prototipo A/Equino/Miami/1/63 (H3N8). En la actualidad, el subtipo de virus dominante es el subtipo-2, la cepa H3N8. Un virus de la gripe, virus de gripe equina H3N8, es capaz de infectar a cánidos, con muertes en algunos casos de
20 hasta el 36 %. Una explicación es que una transferencia entre especies del virus de la gripe equina completo o una parte del mismo al perro dio como resultado un nuevo virus de gripe específico canino asociado con enfermedad respiratoria aguda (Crawford y col., 2005).

La enfermedad provocada por CPIV es habitual en el tracto respiratorio
25 superior. La enfermedad provocada por CPIV solamente puede ser leve o

subclínica, volviéndose las señales más graves si se produce infección simultánea con otros patógenos respiratorios.

CAV-2 provoca enfermedad respiratoria que, en casos graves, puede incluir neumonía y bronconeumonía.

5 Se ha indicado que *B. bronchiseptica* es un agente etiológico primario en la enfermedad respiratoria traqueobronquitis o “tos de las perreras”. Predispone a los perros a la influencia de otros agentes respiratorios, y frecuentemente existe simultáneamente con ellos. La tos de las perreras es normalmente una
10 afección de las vías respiratorias superiores, y se caracteriza por descarga nasal y tos. Hasta la fecha, están disponibles varias vacunas para el tratamiento de traqueobronquitis provocada por *Bordetella bronchiseptica*, incluyendo Nobivac®, Bronchi-Shield®, Bronchicine® CAe, Vanguard® B, Univac 2, Recombitek® KC2, Naramune™-2 y Kennel-Jec™ 2. Sin embargo, la mayoría de vacunas comerciales existentes requieren administración intranasal
15 incómoda así como la adición de adyuvantes, que pueden dar como resultado efectos secundarios deletéreos, tales como quemadura e irritación. Viera Scheibner y col., *Nexus* Dic. 2000 (Vol. 8, Nº 1). Se han explorado vacunas subunitarias, tales como las que implican el uso de proteína p68 de *Bordetella bronchiseptica* (pertactina), pero hasta la fecha no se han incluido en ninguna
20 vacuna canina comercial, posiblemente debido a inmunogenicidad insuficiente, reacciones adversas y/o estabilidad de la formulación.

 La patología de CERI indica que está implicada en el daño pulmonar y, en algunos casos, bronconeumonía, pero es distinta de la tos de las perreras (agente etiológico primario: *B. bronchiseptica*), que implica principalmente
25 cambios en el tracto respiratorio superior. La tos de las perreras es un

síndrome más leve que CERI, y no tiene el amplio intervalo de patología observado en CERI. CERI también se distingue por una gravedad y mortalidad aumentadas.

CERI es letal en pocas ocasiones, pero retarda el realojo de perros en centros de rescate, altera los programas en las perreras de entrenamiento y da como resultado costes de tratamiento considerables y preocupaciones sobre el bienestar. Están disponibles vacunas contra algunos de los agentes infecciosos asociados con CERI. Sin embargo, a pesar del uso de estas vacunas, CERI aún prevalece en todo el mundo, posiblemente debido a la falta de vacunas eficaces contra todos los agentes infecciosos implicados en CERI.

En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de una composición inmunogénica, que pueda administrarse con seguridad a un cánido, que proporcione inmunoprotección de larga actuación contra los agentes que provocan CERI sin efectos secundarios deletéreos o interferencia con otros antígenos en una vacuna de combinación. La presente divulgación satisface estas y otras necesidades relacionadas.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención generalmente se refiere a composiciones inmunogénicas que proporcionan antígenos que tratan o previenen CERI. En una realización, una composición inmunogénica comprende un virus de gripe canina (CIV) y un coronavirus respiratorio canino (CRCoV). En otra realización, la composición inmunogénica comprende además una *Bordetella bronchiseptica*. En otra realización, la composición inmunogénica comprende además un antígeno de pertactina aislado. En otra realización, la composición inmunogénica comprende un antígeno de pertactina p68. En otra forma de

realización, el antígeno de pertactina es una proteína recombinante. En otra realización más, el antígeno de pertactina está presente en entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 30 µg. En otra realización, dicho antígeno de pertactina se prepara solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y opcionalmente purificando por cromatografía en columna. Dichos antígenos de pertactina son solubles y preferentemente sustancialmente sin agregados. En otra realización, la *Bordetella bronchiseptica* es una bacterina o un extracto bacteriano.

En una realización, la composición inmunogénica comprende un CIV, un CRCoV, una *Bordetella bronchiseptica* y uno o ambos antígenos seleccionados de virus paragripal canino (CPIV) y adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2). En otra realización, dicha composición inmunogénica comprende además un antígeno de pertactina p68. En otra realización, la *Bordetella bronchiseptica* es una bacterina o un extracto bacteriano.

Otra realización proporciona una composición inmunogénica que comprende un CIV, CRCoV, un componente de *Bordetella bronchiseptica* que comprende *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado, y uno o ambos antígenos seleccionados de virus paragripal canino (CPIV) y adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2). En una realización adicional, la composición inmunogénica comprende tanto CPIV como CAV-2.

En otra realización, la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende además un antígeno Bsp22 aislado.

En otra realización, la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores no tiene adyuvante. En otra realización, la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores

comprende un adyuvante.

En otra realización, la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores no contiene un antígeno no respiratorio.

En otra realización más, la composición inmunogénica de una cualquiera
5 de las realizaciones anteriores induce una respuesta inmunitaria a un patógeno respiratorio canino en un cánido. En otra realización, dicho patógeno respiratorio canino es al menos uno de CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* y *Mycoplasma cynos*.

Otra realización de la presente invención proporciona un uso de la
10 composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores para el tratamiento o prevención de infección de un patógeno respiratorio canino en un cánido. En otra realización, dicho patógeno respiratorio canino es al menos uno de CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* y *M. cynos*. En otra realización, dicha composición evita dicha infección durante un
15 período de aproximadamente 6 meses o más. En otra realización, dicha composición previene dicha infección durante un período de aproximadamente un año. En otra realización, la presente invención proporciona un uso de la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de
20 infección de un patógeno respiratorio canino en un cánido.

Otra realización de la presente invención proporciona la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores en la que dicha composición trata o previene complejo de enfermedad respiratoria infecciosa canina (CERI) en un cánido. Otra realización de la presente invención
25 proporciona un procedimiento para tratar o prevenir CERI en un cánido que

comprende administrar a dicho cánido la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores. En otra realización, dicha composición previene CERI durante un período de aproximadamente 6 meses o más. En otra realización, dicha composición previene CERI durante un

5 período de aproximadamente un año. Otra realización posibilita un uso de la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de CERI en un cánido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 **Figura 1. Respuesta de anticuerpo neutralizador de suero contra CRCoV.** Medición de respuesta de anticuerpo neutralizador de suero contra coronavirus respiratorio canino (CRCoV) cuando los perros se vacunaron con solución salina, composiciones con adyuvante de hidróxido de aluminio (AlOH) o con adyuvante de Emulsigen®.

15 **Figura 2. Difusión viral nasal post-exposición.** La medición de difusión de CRCoV de las vías nasales cuando los perros se vacunaron con solución salina, composiciones con adyuvante de AlOH o adyuvante de Emulsigen®, seguido de exposición posterior con CRCoV.

20 **Figura 3. Porcentaje de animales positivos para virus tisular CRCoV el día 4 después de la exposición.** Evaluación del número de perros positivos para CRCoV en tejido respiratorio cuando se vacunan con solución salina, composiciones con adyuvante de AlOH o adyuvante de Emulsigen®, seguido de exposición posterior con CRCoV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Las definiciones a continuación se aplican a la presente divulgación.

Prevalecen sobre cualquier definición contradictoria contenida en cada referencia individual incorporada en el presente documento por referencia. Las palabras no definidas tienen el significado habitualmente usado por un experto en la materia. Además, a no ser que se requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán plurales y los términos plurales incluirán el singular.

“En torno a” o “aproximadamente”, cuando se use en relación con una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95 % para la media), o dentro del 10 por ciento del valor indicado, el que sea mayor. Si se usa “aproximadamente” en referencia a intervalos temporales en semanas, “aproximadamente 3 semanas” es de 17 a 25 días y “de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 semanas” es de 10 a 40 días.

“Adyuvante”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que actúe como un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria. Véase posteriormente una descripción adicional de adyuvantes.

El término “animal”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que sea susceptible de complejo de enfermedad respiratoria canina, incluyendo mamíferos, tanto domesticados como silvestres.

“Anticuerpo”, como se usa en el presente documento, es cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno independientemente de la fuente, procedimiento de producción u otras características. Se refiere a una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma que se une

específicamente a un antígeno como resultado de una respuesta inmunitaria para ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas del suero compuestas de cadenas polipeptídicas “ligeras” y “pesadas” que tienen regiones “constantes” y “variable” y se dividen en clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) basándose en la composición de las regiones constantes. Un anticuerpo que es “específico” para un antígeno dado indica que las regiones variables del anticuerpo reconocen y se unen a un antígeno específico exclusivamente. El término incluye, pero sin limitación: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoespecífico, anticuerpo poliespecífico, anticuerpo humanizado, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio sencillo, un anticuerpo de dominio suprimido, una proteína de fusión, una proteína de fusión ScFc, un anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo quimérico, anticuerpo sintético, anticuerpo recombinante, anticuerpo híbrido, anticuerpo mutado y anticuerpos con injertos de CDR. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, o pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Un “anticuerpo” puede convertirse a una proteína de unión a antígeno, que incluye pero sin limitación fragmentos de anticuerpo que incluyen pero sin limitación: Fab, F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento Fd, un fragmento dAb, diacuerpos, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un nanocuerpo, un nanocuerpo bivalente, un compuesto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP) y un minicuerpo y cualquiera de los fragmentos anteriormente mencionados y sus homólogos

manipulados química o genéticamente, así como otros fragmentos de anticuerpos que conservan la función de unión a antígeno. Normalmente, dichos fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno. Como se reconocerá por los expertos en la materia, puede modificarse por ingeniería genética cualquiera de dichas moléculas (por ejemplo hacerse “de línea germinal”) para reducir su inmunogenicidad, aumentar su afinidad, alterar su especificidad o para otros fines.

“Antígeno” o “inmunógeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que contiene uno o más epítomos (lineales, conformacionales o ambos) que tras la exposición a un sujeto inducirán una respuesta inmunitaria que es específica para ese antígeno. Un epítopo es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocitos T o anticuerpo específico, y normalmente comprende de aproximadamente 3 restos de aminoácidos a aproximadamente 20 restos de aminoácidos. El término antígeno se refiere a antígenos subunitarios, antígenos separados y discretos de un organismo completo con el que se asocia el antígeno en la naturaleza, así como bacterias muertas, atenuadas o inactivadas, virus, hongos, parásitos u otros microbios. El término antígeno también se refiere a anticuerpos, tales como anticuerpos anti-idiotípicos o fragmentos de los mismos, y a mimótopos peptídicos sintéticos que pueden asemejarse a un antígeno o determinante antigénico (epítopo). El término antígeno también se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de inmunización de ADN.

“Antigenicidad”, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido para unirse de forma inmuno-específica

a un anticuerpo inducido contra la proteína o polipéptido.

La expresión "*Bordetella bronchiseptica*" o "*B. bronchiseptica*" se refiere a: una bacteria atenuada viva de *Bordetella bronchiseptica*, un extracto de células completas muertas (bacterina) de *Bordetella bronchiseptica* o un
5 extracto bacteriano celular de *Bordetella bronchiseptica*.

"Tampón" significa un sistema químico que evita el cambio de la concentración de otra sustancia química. Los sistemas donadores y aceptores de protones actúan como tampones, evitando cambios notables en la concentración de ión hidrógeno (pH). Un ejemplo adicional de un tampón es
10 una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada), o una base débil y su sal (ácido conjugado).

"Cánido", como se usa en el presente documento, incluye lo que se llama habitualmente perro, pero incluye otros miembros de la familia *Canidae*.

La expresión "línea celular" o "célula huésped", como se usa en el
15 presente documento, significa una célula procariota o eucariota en la que un virus puede replicarse o mantenerse.

El término "cultivo", como se usa en el presente documento, significa una población de células o microorganismos que crecen en ausencia de otras especies o tipos.

20 "Dosis" se refiere a una vacuna o composición inmunogénica proporcionada a un sujeto. Una "primera dosis" o "dosis de sensibilización" se refiere a la dosis de dicha composición proporcionada el día 0. Una "segunda dosis" o una "tercera dosis" o una "dosis anual" se refiere a una cantidad de dicha composición proporcionada después de la primera dosis, que puede ser,
25 pero no se requiere que sea, la misma vacuna o composición inmunogénica

que la primera dosis.

Un “epítipo” es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocitos T o anticuerpo específico, y normalmente comprende de aproximadamente 3 restos de aminoácidos a aproximadamente 20 restos de aminoácidos.

“Excipiente”, como se usa en el presente documento, se refiere a un componente vehículo no reactivo de una vacuna o composición inmunogénica que no es un antígeno.

“Fragmento” se refiere a una parte truncada de una proteína o gen.

10 “Fragmento funcional” y “fragmento biológicamente activo” se refieren a un fragmento que conserva las propiedades biológicas de la proteína o gen de longitud completa.

“Homología” o “porcentaje de homología” se refiere al porcentaje de restos de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos o similares a los restos en la secuencia o las secuencias comparadoras después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de homología de secuencia, y también considerando cualquier sustitución conservativa como parte de la homología de secuencia.

20 “Homólogos” u “homólogos de especie” incluyen genes hallados en dos o más especies diferentes que poseen homología de secuencia de polinucleótido sustancial, y poseen las mismas, o similares, funciones y/o propiedades biológicas. Preferentemente las secuencias polinucleotídicas que representan homólogos de especie hibridarán en condiciones moderadamente

25 rigurosas, como se describe por ejemplo en el presente documento, y poseen

la misma o similares actividades y/o propiedades biológicas. En otro aspecto, los polinucleótidos que representan homólogos de especie compartirán más de aproximadamente el 60 % de homología de secuencia, más de aproximadamente el 70 % de homología de secuencia, más de
5 aproximadamente el 80 % de homología de secuencia, más de aproximadamente el 90 % de homología de secuencia, más de aproximadamente el 95 % de homología de secuencia, más de aproximadamente el 96 % de homología de secuencia, más de aproximadamente el 97 % de homología de secuencia, más de
10 aproximadamente el 98 % de homología de secuencia o más de aproximadamente el 99 % de homología de secuencia.

“Identidad” o “porcentaje de identidad” se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos en la secuencia comparadora después de alinear ambas secuencias e
15 introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia.

“Respuesta inmunitaria”, como se usa en el presente documento, en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral, una
20 respuesta inmunitaria celular o una respuesta inmunitaria humoral y una celular a un antígeno. Una “respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una que está al menos en parte mediada por anticuerpos. Una “respuesta inmunitaria celular” es una mediada por linfocitos T u otros glóbulos blancos o ambos, e incluye la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas similares producidas por
25 linfocitos T activados, glóbulos blancos, o ambos. Pueden determinarse

respuestas inmunitarias usando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización, que se conocen en la técnica.

“Inmunogenicidad”, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido para inducir una respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra un antígeno.

Una “composición inmunogénica” es una preparación que contiene un inmunógeno, incluyendo, por ejemplo, una proteína, un péptido, una célula completa, virus inactivado, subunitario o atenuado, o un polisacárido, o combinación de los mismos, administrados para estimular los sistemas inmunitarios humoral y celular del receptor para uno o más de los antígenos presentes en la composición inmunogénica. “Inmunización” es el procedimiento de administrar una composición inmunogénica y estimular una respuesta inmunitaria o inmunogénica a un antígeno en un huésped. Son huéspedes preferidos mamíferos, tales como perros. Preferentemente, la composición inmunogénica es una vacuna.

“Cantidad inmunológicamente protectora”, como se usa en el presente documento, es una cantidad de un antígeno eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor que es adecuada para evitar o aliviar signos o síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la salud o complicaciones de los mismos. Puede inducirse inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal a una composición puede evaluarse, por ejemplo, indirectamente mediante la medición de títulos de anticuerpo, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente mediante supervisión de señales y síntomas después de la exposición a cepa natural. La inmunidad protectora conferida por una

composición o vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción de difusión de organismos de exposición, reducción en las señales clínicas tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y condición física global, salud y rendimiento del sujeto. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin
5 limitación, inducción de inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una composición o vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del organismo particular usado, o la afección del animal que se trata o se vacuna, y puede determinarse por un veterinario.

La administración “intranasal”, como se usa en el presente documento,
10 se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de la nariz, e implica transporte de la sustancia principalmente a través de la mucosa nasal.

“Aislado”, como se usa en el presente documento, significa retirado de su ambiente de origen natural, solo o en una célula huésped heteróloga, o
15 cromosoma o vector (por ejemplo, plásmido, fago, etc). “Bacteria aislada”, “bacteria anaerobia aislada”, “cepa bacteriana aislada”, “virus aislado”, “cepa viral aislada” y similares se refieren a una composición en la que la bacteria o virus están sustanciales sin otros microorganismos, por ejemplo, en un cultivo, tal como cuando se separa de su ambiente de origen natural. “Aislado”, cuando
20 se usa para describir cualquier sustancia definida de forma particular, tal como un polinucleótido o un polipéptido, se refiere a la sustancia que está separada del ambiente celular original en el que la sustancia, tal como un polipéptido o ácido nucleico, se encuentra normalmente. Como se usa en el presente documento por lo tanto, solamente como ejemplo, una línea celular
25 recombinante construida con un polinucleótido de la invención hace uso del

- ácido nucleico “aislado”. Como alternativa, si se reivindica una proteína particular o un fragmento inmunogénico específico o se usa como una vacuna u otra composición, se consideraría que está aislado porque se ha identificado, separado y en cierto grado purificado en comparación con cómo puede existir en la naturaleza. Si la proteína o un fragmento inmunogénico específico de la misma se produce en una bacteria recombinante o vector de expresión eucariota que produce el antígeno, se considera que existe como una proteína o ácido nucleico aislado. Por ejemplo, una línea celular recombinante construida con un polinucleótido hace uso de un ácido nucleico “aislado”.
- 5
- 10 “Agente medicinal” se refiere a cualquier agente que sea útil en la prevención, cura o mejora de una afección médica, o la prevención de alguna afección o suceso fisiológico.
- “Anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos producidos por una única línea de células de hibridoma, todos dirigidos hacia un epítipo en un antígeno particular. El antígeno usado para preparar el anticuerpo monoclonal puede proporcionarse como una proteína aislada del patógeno o el patógeno completo. Un “hibridoma” es una línea celular clonal que consiste en células híbridas formadas por la fusión de una célula de mieloma y una célula productora de anticuerpos específica. En general, los anticuerpos monoclonales son de origen murino. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal también se refiere a una población clonal de un anticuerpo preparado contra un epítipo particular de un antígeno producido por tecnología de presentación de fagos, o procedimiento que es equivalente a presentación de fagos, o células híbridas de origen no murino.
- 15
- 20
- 25 Administración “oral” o “peroral”, como se usa en el presente documento,

se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de la boca e implica tragar o transportar a través de la mucosa oral (por ejemplo, absorción sublingual o bucal) o ambos. La intratraqueal también es un medio de administración oral o peroral.

La administración “oronasal”, como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una composición o vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de la nariz y la boca, como sucedería, por ejemplo, poniendo una o más gotas en la nariz. La administración oronasal implica procesos de transporte asociados con la administración oral e intranasal.

“Administración parenteral”, como se usa en el presente documento, se refiere a introducción de una sustancia, tal como una composición o vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de una vía que no incluye el tracto digestivo. La administración parenteral incluye administración subcutánea, intramuscular, intraarterial e intravenosa. Para los fines de la presente divulgación, la administración parenteral excluye vías de administración que implican principalmente transporte de la sustancia a través del tejido mucoso de la boca, nariz, tráquea y pulmones.

El término “patógeno” o “microorganismo patógeno”, como se usa en el presente documento, significa un microorganismo, ejemplo, CPIV, CAV-2, CRCoV, CIV o *Bordetella bronchiseptica*, que es capaz de inducir o provocar una enfermedad, dolencia o estado anómalo en su animal huésped.

“Pertactina”, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de membrana externa de *Bordetella*. Preferentemente la pertactina es

de *B. bronchiseptica* y más preferentemente, “p68”, y está codificada por el gen, *prnA*. La pertactina puede aislarse en su forma nativa de *Bordetella bronchiseptica*, o puede producirse de forma recombinante. Se proporcionan secuencias y ejemplos de pertactina en la patente de Estados Unidos N°
5 7.736.658, contenido de la cual se incorpora por la presente por referencia. El antígeno de pertactina usado en el presente documento incluye formas lipidadas de la proteína.

“Farmacéuticamente aceptable” se refiere a sustancias que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuadas para su uso en contacto
10 con los tejidos de sujetos sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, adecuado con una relación de beneficio y riesgo razonable, y eficaz para su uso pretendido.

“Anticuerpo policlonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a una población mixta de anticuerpos preparados contra un patógeno o
15 antígeno particular. En general, la población contiene una variedad de grupos de anticuerpo, dirigido cada grupo a un epítipo particular del patógeno o antígeno. Para preparar anticuerpos policlonales, se introduce el patógeno completo, o un antígeno aislado, por inoculación o infección en un huésped, que induce que el huésped realice anticuerpos contra el patógeno o antígeno.

20 El término “polinucleótido”, como se usa en el presente documento, significa una molécula polimérica orgánica compuesta de monómeros de nucleótidos unidos covalentemente en una cadena. El ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) son ejemplos de polinucleótidos con función biológica distinta.

25 El término “polipéptido”, como se usa en el presente documento,

significa una molécula polimérica orgánica compuesta de dos o más aminoácidos unidos en una cadena.

“Evitar la infección”, como se usa en el presente documento, significa prevenir o inhibir la replicación de la bacteria o virus que provoca la enfermedad identificada, para inhibir la transmisión de la bacteria o virus, para evitar que la bacteria o virus se establezca en su huésped, o para aliviar los síntomas de la enfermedad provocada por la infección. El tratamiento se considera terapéutico si hay una reducción de la carga bacteriana o viral.

“Protección”, “proteger”, “inmunidad protectora” y similares, como se usa en el presente documento, con respecto a una vacuna u otra composición, significa que la vacuna o composición previene o reduce los síntomas de la enfermedad provocada por el organismo del que deriva el antígeno o los antígenos usados en la vacuna o composición. Los términos “protección”, “proteger” y similares, también significan que la vacuna o composición puede usarse para “tratar” la enfermedad, o uno o más síntomas de la enfermedad que ya existe en un sujeto.

La administración “respiratoria”, como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de inhalación de una sustancia nebulizada (atomizada). En la administración respiratoria, el mecanismo de transporte principal implica absorción de la sustancia atomizada a través de la mucosa en la tráquea, bronquios, y pulmones y es por lo tanto diferente de la administración intranasal o peroral.

Las expresiones “unión específica”, “se une específicamente”, y similares, como se definen son dos o más moléculas que forman un complejo

que puede medirse en condiciones de ensayo o fisiológicas y es selectivo. Se dice que un anticuerpo u otro inhibidor se “une específicamente” a una proteína si, en condiciones seleccionadas de forma apropiada, dicha unión no se inhibe substancialmente, mientras se inhibe al mismo tiempo la unión no específica.

- 5 La unión específica se caracteriza por alta afinidad y es selectiva para el compuesto o proteína. La unión no específica habitualmente tiene baja afinidad. La unión en anticuerpos IgG, por ejemplo, generalmente se caracteriza por una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o mayor, tal como al menos aproximadamente 10^{-8} M o mayor, o al menos
- 10 aproximadamente 10^{-9} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-10} o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-11} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor. El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que no se transporta por numerosos antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que transporta
- 15 el dominio de unión a antígeno generalmente no se unirá a otros antígenos.

“Fragmento inmunogénico específico”, como se usa en el presente documento, se refiere a una parte de una secuencia que es reconocible por un anticuerpo o linfocito T específico para esa secuencia.

- “Sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier
- 20 animal que tenga un sistema inmunitario, que incluye mamíferos, tales como perros.

- “Sustancialmente idéntico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al
- 25 menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos

aproximadamente 99 %.

“Vacuna subunitaria” y “composición subunitaria”, como se usan en el presente documento, se refiere a un tipo de vacuna o composición que incluye uno o más antígenos, pero no necesariamente todos los antígenos en la
5 vacuna o composición, que derivan de o son homólogos de, antígenos de un patógeno de interés, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Dicha composición o vacuna está sustancialmente sin células patógenas intactas o partículas patógenas, o el lisado de dichas células o partículas. Por lo tanto, puede prepararse una vacuna subunitaria o composición subunitaria a partir de
10 polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados, o sustancialmente purificados, del patógeno o sus análogos. Los procedimientos para obtener un antígeno o antígenos en la vacuna subunitaria o composición subunitaria incluyen técnicas de purificación convencionales, producción recombinante o síntesis química. Una “vacuna subunitaria” o “composición
15 subunitaria” se refiere por lo tanto a una vacuna o composición que consiste en un componente o componentes antigénicos definidos de un virus, bacteria u otro inmunógeno.

“DICT₅₀” se refiere a “dosis infecciosa de cultivo tisular” y se define como la dilución de un virus requerida para infectar el 50 % de un lote dado de
20 cultivos celulares inoculados. Pueden usarse diversos procedimientos para calcular DICT₅₀, incluyendo el procedimiento de Spearman-Kärber, que se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva. Para una descripción del procedimiento de Spearman-Kärber, véase BW Mahy y H.O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

25 “Agente terapéutico”, como se usa en el presente documento, se refiere

a cualquier molécula, compuesto, virus o tratamiento, preferentemente un virus atenuado o muerto, o subunidad o compuesto, que ayuda en el tratamiento de una infección viral, bacteriana, parasitaria o fúngica, enfermedad o afección provocada por los mismos.

- 5 “Cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna o composición que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, perro) que recibe el antígeno o vacuna o composición que es adecuado para prevenir o aliviar señales o síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la
- 10 salud o complicaciones de los mismos, provocados por infección con un patógeno, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Puede inducirse inmunidad humoral o inmunidad mediada por células, o tanto inmunidad humoral como mediada por células. La respuesta inmunogénica de un animal a un antígeno, vacuna o composición puede evaluarse indirectamente mediante
- 15 la medición de títulos de anticuerpo, ensayos de proliferación de linfocitos o directamente a través de supervisión de señales y síntomas después de exposición a la cepa natural. La inmunidad protectora conferida por una vacuna o composición puede evaluarse midiendo la reducción de difusión de organismo de exposición y/o reducción de señales clínicas, tales como
- 20 mortalidad, morbilidad, temperatura y condición física global, salud y rendimiento del sujeto. La cantidad de una vacuna o composición que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del inmunógeno particular usado, o la afección del sujeto, y puede determinarse por un experto en la materia.
- 25 “Tratar” o “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se

refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir un trastorno, afección o enfermedad al que se aplica dicho término, o prevenir uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

5 “Tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere al acto de “tratar”, como se ha definido inmediatamente antes.

“Vacuna” o “composición de vacuna”, como se usa en el presente documento, se refiere a una composición inmunogénica seleccionada de un virus o bacteria, vivo modificado, atenuado o muerto o una vacuna subunitaria, o cualquier combinación de los anteriores. La administración de la vacuna a un
10 sujeto da como resultado una respuesta inmunitaria. La vacuna puede introducirse directamente en el sujeto por cualquier vía conocida de administración, incluyendo vía parenteral, vía peroral, y similares. Los términos significan una composición que previene o reduce una infección, o que previene o reduce una o más señales o síntomas de infección. Los efectos
15 protectores de una composición de vacuna contra un patógeno normalmente se consiguen induciendo en el sujeto una respuesta inmunitaria. Hablando en general, las incidencias suprimidas o reducidas de infección, alivio de las señales o síntomas, o eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicativos de los efectos protectores de una composición de
20 vacuna. Las composiciones de vacuna de la presente invención proporcionan efectos protectores contra infecciones provocadas por patógenos de enfermedad respiratoria canina.

“Veterinariamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias que están dentro del alcance del criterio médico
25 razonable, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos

veterinarios sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, adecuadas con una relación de beneficio y riesgo razonable, y eficaces para su uso pretendido.

“Vehículo veterinariamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a un medio de vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio activo, y no es tóxico para el sujeto veterinario al que se administra.

Antígenos, composiciones inmunogénicas y vacunas

La presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden uno o más virus y bacterias. La presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden uno o más virus y bacterias o subunidades que son adecuadas para administración a un cánido para tratamiento contra CERL.

El coronavirus respiratorio canino (CRCoV) descrito en el presente documento puede caracterizarse como un coronavirus presente en los tractos respiratorios de perros con enfermedad respiratoria infecciosa. CRCoV está filogenéticamente más estrechamente relacionado con coronavirus bovino (BCoV), coronavirus humano (HCoV), cepa OC43 y virus de encefalomiелitis hemaglutinante (HEV); coronavirus canino entérico (CCoV) está relacionado de forma solamente distante con CRCoV. Un ejemplo representativo de un CRCoV adecuado para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada como cepa de CRCoV 4182 (Erles y col., Virus Res., 124:78-87, 2007).

Los antígenos del virus de la gripe abarcados por la presente invención puede ser cualquier cepa de virus de la gripe identificada, de cualquier ave o

mamífero, incluyendo pero sin limitación, virus de la gripe que tiene la hemaglutinina subtipo H3 y neuraminidasa subtipo N8 o el subtipo H3N8, más habitualmente denominado virus H3N8. La gripe puede ser de origen mamífero o aviar, incluyendo, pero sin limitación de origen porcino, equino o canino. En una realización se usa un antígeno de la gripe canina. En una realización se usa un antígeno de la gripe equina. En una realización, se usa una cepa que tiene las glicoproteínas de subtipo denominadas H3 o N8. En una realización, se usa una cepa que tiene glicoproteínas tanto subtipo H3 como N8.

Los antígenos de la gripe abarcados por la presente invención pueden aislarse de perros, caballos, cerdos y aves, tanto domésticas como salvajes. Los animales seleccionados para recogida de muestras deberían presentar síndromes clínicos agudos y/o sub-agudos, que pueden incluir síntomas respiratorios de leves a graves y fiebre. Los animales también pueden mostrar señales de anorexia y letargo. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos de aislamiento de virus incluyendo: inoculación de cultivos celulares mamíferos o aviares, inoculación de huevos embrionados con muestras mucosas nasales o faríngeas de muestras de ensayo clínicas, recogida por embadurnado de la vía nasal o garganta, o recogiendo tejidos tales como bazo, pulmón, amígdala e hígado y lavado pulmonar. El efecto citopático del virus puede observarse en cultivo celular. Pueden ensayarse líquido alantoideo o lisados celulares con respecto a su capacidad para aglutinar glóbulos rojos humanos, de pollo, de pavo o de cobaya, presuntas pruebas de la presencia de un virus de la gripe.

Un ejemplo representativo de una cepa de gripe adecuada para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada como

A/canina/lowa/9A1/B5/08/D12, que se depositó como PTA-7694 el 29 de junio de 2006 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2.209, de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de

5 Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patente. Una cepa representativa del antígeno de CIV es la cepa de virus CIV en la vacuna comercial, Vanguard® CIV (Pfizer, Inc). Esta invención también abarca vacunas que comprenden una cepa identificada como cepa de gripe equina A/Equina/2/Miami/1/63. Esta cepa se depositó en la ATCC, con el número de

10 referencia VR 317, de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patente.

Son ejemplos adicionales de virus de la gripe para su uso en la presente invención A/canino/lowa/13628/2005, A/Equino/Kentucky/1998,

15 A/Equino/Kentucky/15/2002, A/Equino/Ohio/1/2003, A/Equino/Kentucky/1/1994, A/Equino/Massachusetts/213/2003, A/Equino/Wisconsin/2003, A/Equino/Nueva York/1999 y A/Equino/Newmarket/A2/1993. Otras cepas preferidas y/o aislados de CIV incluyen los desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 7.959.929 (particularmente cepas y secuencias de HA identificados en la

20 misma como Jacksonville/2005, Miami/2005, FL/242/03 y Florida/43/04), 7.384.642, 7.572.620 y 7.468.187, los contenidos de las cuales, incluyendo todas las secuencias, particularmente secuencias de HA, y cepas, se incorporan por la presente por referencia como si se expusieran completamente en el presente documento. Adicionalmente, una cepa de CIV

25 adecuada para su uso en el presente documento incluye el aislado de CIV de

Colorado descrito en Barrell y col., J. Vet. Intern. Med., 24 (6), 1524-1527 (2010), que tiene el número de referencia ADW41784.

El virus paragripal canino (CPIV) abarcado por la presente invención puede caracterizarse como uno de los virus que se sabe que son un agente
5 causante asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa del antígeno de CPIV es la cepa de virus CPI atenuada en la vacuna comercial, Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Otra cepa representativa del antígeno de CPIV es la cepa del virus CPI atenuada que tiene la designación “NL-CPI-5” (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

10 El adenovirus canino, tipo 2 (CAV-2) abarcado por la presente invención puede caracterizarse como uno de los virus que también se sabe que es un agente causante asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa del antígeno de CAV-2 es la cepa de virus CAV-2 atenuada en la vacuna comercial, Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Una cepa representativa del antígeno de
15 CAV-2 es la cepa CAV-2 atenuada designada como la cepa “Manhattan” (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

El *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) abarcado por la presente invención se describe en Chalker y col., Microbiology, 150:3491-3497, 2004 y es la única especie de micoplasma habitualmente asociada con enfermedad respiratoria.
20 Se describen composiciones inmunogénicas contra *M. cynos* en el documento US 2007/0098739, incorporado en el presente documento por referencia.

El componente de *Bordetella bronchiseptica* abarcado por la presente invención puede caracterizarse como el agente causante bacteriano asociado con la tos de las perreras. Las composiciones inmunogénicas y vacunas
25 abarcadas por la presente invención pueden ser una o más de: una *Bordetella*

bronchiseptica atenuada viva, una bacterina de *Bordetella bronchiseptica* o un extracto bacteriano. Adicionalmente, la composición preferentemente incluye también un antígeno subunitario aislado de *Bordetella bronchiseptica*.

En una realización, la *Bordetella bronchiseptica* se prepara como un
5 sonicado de células completas purificado a través de cromatografía en columna como se proporciona en la Solicitud de Patente N° FR2571618, presentada el 12 de octubre de 1984. Otro ejemplo representativo de una *Bordetella bronchiseptica* es el extracto bacteriano Bronchicine™ CAe (Pfizer), que se prepara a partir de material antigénico extraído de células de *Bordetella*
10 *bronchiseptica*. Otro ejemplo de *Bordetella bronchiseptica* es la cepa de *Bordetella bronchiseptica* atenuada viva B-C2 presente en Nobivac® y/o la cepa de *bronchiseptica* viva de Intra-Trac®, Bronchi-Shield®, Naramune™, Recombitek®, Univac y/o Kennel-Jec™.

Adicionalmente, también está presente (es decir, complementada)
15 preferentemente una subunidad, en combinación con el componente de *Bordetella bronchiseptica*. Un ejemplo representativo de la subunidad es un antígeno de pertactina aislado, preferentemente, un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*, particularmente el antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* recombinante que se reconoce por el anticuerpo monoclonal específico de p68
20 Bord 2-7 (descrito en el documento US 7.736.658, que se incorpora en el presente documento por referencia) y en una realización preferida, tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en el documento US 7.736.658 o que tiene homología con la misma.

El antígeno de pertactina p68 recombinante se prepara preferentemente
25 en una forma soluble, de modo que se conserve la estructura de tipo nativa o

- se restaure durante el procesamiento. En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un p68 recombinante que está sustancialmente sin (menos de aproximadamente 80 %, 90 %, 95 % o incluso 99 %) agregados. En otra realización, el p68 recombinante se solubiliza con urea, preferentemente una solución de urea aproximadamente 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 2 M, 3 M o 6 M. A continuación, el antígeno p68 puede purificarse, tal como mediante cromatografía en columna. Uno de dichos procesos de solubilización se describe en *Surinder y col.*, J. Bioscience and Bioengineering, v 99 (4), páginas 303-310 (2005).
- 10 Los antígenos de pertactina usados en el presente documento también incluyen formas lipidadas. Se proporcionan ejemplos de producción de proteínas lipidadas en *Erdile y col.*, Infection and Immunity, (1993) v.61 (1), páginas 81-90, incorporado por referencia. Los procedimientos desvelados en el mismo pueden usarse para preparar proteínas de pertactina modificadas post-traduccionalmente que contienen un resto lipídico unido.
- 15 Además, en otra realización, una composición inmunogénica comprende *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de Bsp22 aislado. En otra realización, la composición inmunogénica comprende *Bordetella bronchiseptica*, un antígeno de pertactina aislado y un antígeno de Bsp22 aislado. El antígeno de Bsp22 puede prepararse como se proporciona en *Medhekar y col.*, Molecular Microbiology (2009) 71 (2), 492-504. Preferentemente, el antígeno de Bsp22 aislado está presente junto con (es decir, además de) un extracto de *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado, específicamente p68 recombinante.
- 20 “Bsp22” también incluye formas lipidadas del antígeno. Se proporcionan
- 25

ejemplos de producción de proteínas lipidadas en Erdile y col., Infection and Immunity, (1993) v. 61(1), páginas 81-90, incorporado por referencia. Los procedimientos desvelados en la misma pueden usarse para preparar proteínas Bsp22 modificadas post-traduccionalmente que contienen un resto
5 lipídico unido.

Los virus abarcados por la presente invención pueden propagarse en células, líneas celulares y células huésped. Dichas células, líneas celulares o células huésped pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, células de mamífero y células no de mamífero, incluyendo células de insecto y vegetales.
10 Las células, líneas celulares y células huésped en las que pueden propagarse virus abarcados por la presente invención se conocen fácilmente y son accesibles para los expertos habituales en la materia.

En otra realización, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento no comprenden antígenos no respiratorios. Por lo tanto,
15 una realización de la invención proporciona una composición como se describe en el presente documento a condición de que no incluya un antígeno no respiratorio. Los antígenos no respiratorios no provocan enfermedad respiratoria en un sujeto. Los ejemplos no limitantes de dichos antígenos no respiratorios incluyen virus de la rabia, parvovirus canino, coronavirus canino
20 entérico, especies de *Leptospira* y *Borrelia burgdorferi*.

Las bacterias abarcadas por la presente invención pueden cultivarse y propagarse usando diversos medios de cultivo conocidos por los expertos habituales en la materia, incluyendo medios de cultivo tanto de caldo de cultivo (líquido) como de agar (sólido, semisólido). Algunas bacterias también pueden
25 cultivarse y propagarse en células de un mamífero o células no de mamífero.

Los virus y bacterias abarcados por la presente invención pueden atenuarse o inactivarse antes de su uso en una composición inmunogénica o vacuna. Los procedimientos de atenuación e inactivación se conocen bien por los expertos en la materia. Los procedimientos para atenuación incluyen, pero
5 sin limitación, pase en serie en cultivo celular en una línea celular adecuada (virus y algunas bacterias), pase en serie en cultivo de caldo de cultivo (bacterias), y radiación ultravioleta (virus y bacterias) y mutagénesis química (virus y bacterias). Los procedimientos para inactivación viral y bacteriana incluyen, pero sin limitación, tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL)
10 o etilenimina binaria (BEI) u otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

La inactivación por formalina puede realizarse mezclando la suspensión que contiene el microorganismo con formaldehído al 37 % hasta una concentración de formaldehído final del 0,5 %. La mezcla de microorganismo-
15 formaldehído se mezcla por agitación constante durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de microorganismo inactivado se ensaya después con respecto a organismos vivos residuales ensayando con respecto a crecimiento en una línea celular o medio de caldo de cultivo adecuado.

20 Para algunos antígenos, la inactivación por BEI puede realizarse mezclando la suspensión que contiene el microorganismo de la presente invención con BEI 0,1 M (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) a una concentración de BEI final de 1 mM. Para otros antígenos, la concentración de BEI final es de 2 mM. Un experto habitual en la materia conocería la
25 concentración apropiada para usar. La mezcla de virus-BEI se mezcla por

agitación constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de tiosulfato sódico 1,0 M a una concentración final de 0,1 mM. Se continúa mezclando durante dos horas adicionales. La mezcla que contiene el microorganismo inactivado se ensaya con respecto a virus vivo residual ensayando con respecto a crecimiento en una línea celular o medio de caldo de cultivo adecuado.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir uno o más vehículos veterinariamente aceptables. Como se usa en el presente documento, un “vehículo veterinariamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros conocidos por los expertos en la materia. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros conocidos por los expertos en la materia. Los conservantes incluyen mertiolato, entre otros conocidos por los expertos en la materia.

El adyuvante puede ser metabolizable, refiriéndose a adyuvantes que consisten en componentes que son capaces de metabolizarse por la especie diana tales como adyuvantes basados en aceite vegetal. Un adyuvante metabolizable puede ser un aceite metabolizable. Los aceites metabolizables son grasas y aceites que normalmente aparecen en plantas y animales, y habitualmente consisten principalmente en mezclas de triacilglicerol, también conocidos como triglicéridos o grasas neutras. Estas sustancias insolubles en

agua, no polares, son triésteres de ácido graso de glicerol. Los triacilglicerolos difieren de acuerdo con la entidad y colocación de sus tres restos de ácido graso o cadenas laterales.

El adyuvante también puede ser no metabolizable, refiriéndose a
5 adyuvantes que consisten en componentes que no puede metabolizar el cuerpo del sujeto animal al que se administra la emulsión. Los aceites no metabolizables adecuados para su uso en composiciones de la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus ácidos y alcoholes correspondientes, los éteres y ésteres de los mismos, y mezclas de los
10 mismos. Preferentemente, los compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburo ligeros, es decir, dichos componentes tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite puede prepararse sintéticamente o purificarse a partir de productos de petróleo. Los aceites no metabolizables preferidos para uso en composiciones descritas en el presente documento
15 incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas, por ejemplo. La expresión “aceite mineral” se refiere a un aceite adyuvante no metabolizable que es una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos de vaselina mediante una técnica de destilación. La expresión es sinónima de “parafina licuada”, “vaselina líquida” y “aceite mineral blanco”. También se pretende que la
20 expresión incluya “aceite mineral ligero”, es decir aceite que se obtiene de forma similar por destilación de vaselina, pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que el aceite mineral blanco. Puede obtenerse aceite mineral de diversas fuentes comerciales, por ejemplo, J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite mineral ligero
25 está disponible en el Mercado con el nombre DRAKEOL®.

Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, el sistema de adyuvante Emulsigen® (MVP Laboratories; Ralston, NE), el sistema de adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, 5 adyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero en bloque (CytRx; Atlanta, GA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc.; Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, adyuvante de amina lipídica Avridina, 10 enterotoxina lábil por calor de *E. coli* (recombinante o de otro modo), toxina del cólera, dipéptido de muramilo, copolímero en bloque de escualeno/pluronic/tensioactivo (aceite SP), sulfolipobeta-ciclodextrina (SL-CD), liposomas que contienen un inumodulador (por ejemplo, CpG o poli I:C), dipéptido de muramilo (MDP), iscomatrix (Quil A/fosfatidil colina), CpG/DEAE- 15 dextrano/aceite mineral (TXO), CpG, triterpenoides (por ejemplo, Quil A u otra preparación de saponina purificada o parcialmente purificada), esteroides (por ejemplo, colesterol), agentes inmunomoduladores (por ejemplo, dimetil dioctadecil amonio bromuro - DDA), polímeros (por ejemplo, ácido poliacrílico tal como CARBOPOL®) y estimulantes Th2 (por ejemplo, glicolípidos tales 20 como Bay R1005®), y combinaciones de los mismos, entre muchos otros adyuvantes conocidos por los expertos en la materia.

Los ejemplos no limitantes de diversas combinaciones que pueden usarse incluyen un triterpenoide más un esteroide (por ejemplo Quil A/colesterol, también conocido como QAC), un triterpenoide más un esteroide, un agente 25 inmunomodulador y un polímero (por ejemplo, Quil

A/colesterol/DDA/CARBOPOL®, también conocido como QCDC), y un triterpenoide más un esteroide, un agente inmunomodulador, un polímero y un estimulante de Th2 (por ejemplo, Quil A/colesterol/DDA/CARBOPOL®, y Bay R1005®, también conocido como QCDCR).

5 Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto en la materia. En una realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y/o vacunas que comprenden de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 2.000 µg de adyuvante. En otra
10 realización, se incluye adyuvante en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1.500 µg, o de aproximadamente 250 µg a aproximadamente 1.000 µg, o de aproximadamente 250 µg a aproximadamente 750 µg. En otra realización, se incluye adyuvante en una cantidad de aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición
15 inmunogénica o vacuna.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas también pueden incluir antibióticos. Dichos antibióticos incluyen, pero sin limitación, los de las clases de aminoglicósidos, carbapenemos, cefalosporinas, glicopéptidos, macrólidos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. En una
20 realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico. En otra realización, las composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 55 µg/ml de antibiótico, de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50
25 µg/ml de antibiótico, de aproximadamente 15 µg/ml a aproximadamente 45

μg/ml de antibiótico, o aproximadamente 20 μg/ml a aproximadamente 40 μg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 25 μg/ml a aproximadamente 35 μg/ml de antibiótico. En otra realización más, las composiciones inmunogénicas y vacunas comprenden menos de aproximadamente 30 μg/ml de antibiótico.

5 Las composiciones inmunogénicas y vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir una o más moléculas polinucleotídicas que codifican un virus o bacteria, o proteína viral o bacteriana. Pueden usarse moléculas de ADN o ARN en composiciones inmunogénicas o vacunas. La molécula de ADN o ARN puede administrarse sin otros agentes, o puede administrarse junto con
10 un agente que facilite la captación celular (por ejemplo, liposomas o lípidos catiónicos). El polinucleótido total en la composición inmunogénica o vacuna generalmente será entre aproximadamente 0,1 μg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml. En otra realización, el polinucleótido total en la composición inmunogénica o vacuna puede ser de aproximadamente 1 μg/ml y
15 aproximadamente 4,0 mg/ml, de aproximadamente 10 μg/ml y aproximadamente 3,0 mg/ml, o de aproximadamente 100 μg/ml y aproximadamente 2,0 mg/ml. Las vacunas y procedimientos de vacunación que usan ácidos nucleicos (ADN o ARNm) se han descrito bien en la técnica, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.703.055, Patente de Estados Unidos
20 N° 5.580.859 y Patente de Estados Unidos N° 5.589.466, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Además de los virus o bacterias descritos anteriormente, las composiciones inmunogénicas y vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir otros antígenos adicionales. Los antígenos pueden estar en
25 forma de una preparación completa o parcial inactivada del microorganismo, o

en forma de moléculas antigénicas obtenidas por técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Otros antígenos apropiados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, los derivados de virus patógenos tales como virus del moquillo canino, herpesvirus canino, virus de la gripe canina, virus de la rabia, bacteria patógenas tales como *Bordetella bronchiseptica*, *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Porphyromonas* spp., *Bacteriodes* spp., *Borrelia* spp., *Streptococcus* spp., incluyendo la subespecie de *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., incluyendo *Mycoplasma cynos*, y *Microsporum canis*. También pueden derivarse antígenos de hongos patógenos tales como *Candida*, protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Babesia* spp., *Giardia* spp., *Leishmania* spp., o helmintos tales como *Taenia*, *Cuterebra*, *Echinococcus* y *Paragonimus* spp.

Formas, dosificaciones, vías de administración

Las composiciones inmunogénicas y vacunas abarcadas por la presente invención pueden administrarse a animales para inducir una respuesta inmunitaria eficaz contra CERI. En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria eficaz administrando a un animal una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica o vacuna descrita en el presente documento.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas en el presente documento pueden administrarse a un animal para vacunar al sujeto animal contra CERI. Las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden

administrarse al animal para prevenir o tratar CERI en el animal. En consecuencia, se describen en el presente documento procedimientos para vacunar a un animal contra CERI, y prevenir o tratar CERI, que comprenden administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición
5 inmunogénica o vacuna descrita en el presente documento.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas abarcadas por la presente invención pueden realizarse en diversas formas dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden realizarse en forma de soluciones o dispersiones estériles acuosas
10 adecuadas para uso inyectable, o realizarse en formas liofilizadas usando técnicas de liofilización. Las composiciones inmunogénicas liofilizadas y vacunas se mantienen normalmente a aproximadamente 4 °C, y pueden reconstituirse en una solución estabilizadora, por ejemplo, solución salina o HEPES, con o sin adyuvante. Las composiciones inmunogénicas y vacunas
15 también pueden realizarse en forma de suspensiones o emulsiones.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los microorganismos anteriormente descritos. Los virus y/o bacterias purificados pueden usarse directamente en una composición inmunogénica o vacuna o
20 pueden atenuarse adicionalmente, o inactivarse. Normalmente, una composición inmunogénica o vacuna contiene entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^{12} partículas virales o bacterianas, o entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^{11} partículas, o entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^{10} partículas, o entre
25 aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 partículas, o entre

aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 partículas. La cantidad precisa de un microorganismo en una composición inmunogénica o vacuna eficaz para proporcionar un efecto protector puede determinarse por un experto en la materia.

- 5 El antígeno de pertactina está presente entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 30 μg . Más particularmente, dicha pertactina está presente entre aproximadamente 5 μg y aproximadamente 20 μg , más particularmente aún, entre aproximadamente 7 μg y aproximadamente 15 μg , y aún más particularmente, a aproximadamente 5 μg , 10 μg , 15 μg o 20 μg .
- 10 Las composiciones inmunogénicas y vacunas generalmente comprenden un vehículo veterinariamente aceptable, en un volumen de entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 5 ml. En otra realización el volumen del vehículo está entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 4 ml o entre aproximadamente 2 ml y aproximadamente 3 ml. En otra realización,
- 15 el volumen del vehículo es de aproximadamente 1 ml, o es de aproximadamente 2 ml o es de aproximadamente 5 ml. Los vehículos veterinariamente aceptables adecuados para su uso en composiciones inmunogénicas y vacunas pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente en el presente documento.
- 20 Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente si un virus o bacteria necesita atenuarse o inactivarse antes de su administración. En otra realización de la presente invención, un virus o bacteria puede administrarse directamente a un animal sin atenuación adicional. La cantidad de un microorganismo que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del
- 25 microorganismo particular usado, la afección del animal y/o el grado de

infección, y puede determinarse por un experto en la materia.

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, puede administrarse una única dosis a animales, o, como alternativa, pueden tener lugar dos o más inoculaciones con intervalos de aproximadamente 2 a 5 aproximadamente 10 semanas. Pueden requerirse regímenes de refuerzo, y el régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar inmunización óptima. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente el régimen de administración óptimo.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden administrarse 10 directamente al torrente sanguíneo, al músculo, a un órgano interno, o bajo la piel. Los medios adecuados para administración parenteral incluyen administración intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microaguja) e inyectores sin aguja.

15 Las formulaciones parenterales son normalmente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos, proteínas y agentes tamponantes (preferentemente a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 6 a 20 aproximadamente 7,5, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse de forma más adecuada como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usar junto con un vehículo adecuado tal como agua sin pirógenos, estéril o solución salina.

La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, 25 por ejemplo, por liofilización, puede conseguirse fácilmente usando técnicas

farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

La solubilidad de materiales usados en la preparación de soluciones parenterales puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación adecuadas conocidas por los expertos en la materia, tales como la
5 incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad, incluyendo tampones, sales, tensioactivos, liposomas, ciclodextrinas y similares.

Las composiciones para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, prolongada, por pulsos, controlada,
10 dirigida y programada. Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden formularse como un sólido, semi-sólido o líquido tixotrópico para administración como un depósito implantado, que proporciona liberación modificada de las composiciones inmunogénicas y vacunas.

Otros medios de administración de composición inmunogénica o vacuna
15 incluyen suministro por inyección con microaguja o sin aguja (por ejemplo, Powderject™, Bioject™, etc.).

En casos en los que se use inyección subcutánea o intramuscular, se prefiere una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En casos
20 particulares, se usan soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Las formulaciones pueden abarcar adicionalmente estabilizadores tales como gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente vasoconstrictor a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención generalmente se
25 proporcionan estériles y sin pirógenos. Sin embargo, se conoce bien por los

expertos en la materia que las formulaciones para el vehículo farmacéuticamente aceptado y los vehículos farmacéuticos aprobados en las regulaciones promulgadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos o la Agencia Gubernamental equivalente en un país extranjero tal como

5 Canadá o Méjico, o una cualquiera de las naciones europeas, para cualquier vacuna canina, composiciones inmunogénicas subunitarias polipeptídicas (antígeno) y vacunas, vacunas de vector viral recombinante, y vacunas de ADN. Por lo tanto, el vehículo farmacéuticamente aceptado para producción comercial de las composiciones inmunogénicas o vacunas es un vehículo que

10 ya está aprobado o se aprobará por la agencia gubernamental apropiada en los Estados Unidos de América o un país extranjero. Las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden mezclarse adicionalmente con un adyuvante que sea farmacéuticamente aceptable. En ciertas formulaciones de las composiciones inmunogénicas y vacunas, la composición inmunogénica o

15 vacuna se combina con otras composiciones inmunogénicas caninas o vacunas para producir un producto polivalente que pueda proteger al cánido contra una amplia diversidad de enfermedades provocadas por otros patógenos caninos.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento

20 pueden prevenir la infección de un patógeno respiratorio canino o pueden prevenir CERI en un cánido durante un periodo de aproximadamente tres meses o más. Las composiciones pueden prevenir la infección de dicho patógeno respiratorio canino o pueden prevenir CERI en dicho cánido durante un periodo de aproximadamente seis meses o más. Las composiciones pueden

25 prevenir la infección de dicho patógeno respiratorio canino o pueden prevenir

CERI en dicho cánido durante un periodo de aproximadamente un año.

Procedimientos de detección y diagnóstico

El alcance y la naturaleza de las respuestas inmunitarias inducidas en el animal pueden evaluarse usando diversas técnicas. Por ejemplo, puede
5 recogerse sueros de los animales inoculados, y ensayarse con respecto a la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para los inmunógenos. Puede conseguirse detección de linfocitos T citotóxicos sensibles (CTL) en tejidos linfoides, indicativa de la inducción de una respuesta inmunitaria celular, mediante ensayos tales como proliferación de linfocitos T. Las técnicas
10 relevantes se describen bien en la materia.

Kits

En la medida en que puede ser deseable administrar una composición inmunogénica o vacuna en combinación con composiciones o compuestos adicionales, por ejemplo, para el fin de tratar una enfermedad o afección
15 particular, está dentro del alcance de la presente invención que pueda incluirse una composición inmunogénica o vacuna convenientemente en, o combinarse en, la forma de un kit adecuado para administración o coadministración de las composiciones.

Por lo tanto, los kits abarcados por la presente invención pueden
20 comprender una o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales es una composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la presente invención, y un medio para conservar por separado dichas composiciones, tales como un recipiente, frasco dividido, o paquete de aluminio dividido. Un ejemplo de dicho kit es una jeringa y aguja, y similares. Un kit de la
25 presente invención es particularmente adecuado para administrar diferentes

formas de dosificación, por ejemplo, orales o parenterales, para administrar las composiciones separadas en diferentes intervalos de dosificación, o para valorar las composiciones separadas entre sí. Para ayudar a administrar una composición abarcada por la presente invención, el kit normalmente
5 comprende instrucciones para la administración.

Otro kit abarcado por la presente invención puede comprender uno o más reactivos útiles para la detección de un animal infectado. El kit puede incluir reactivos para analizar una muestra con respecto a la presencia de microorganismos completos, polipéptidos, epítomos o secuencias
10 polinucleotídicas. La presencia de virus, bacterias, polipéptidos o secuencias polinucleotídicas puede determinarse usando anticuerpos, PCR, hibridación y otros procedimientos de detección conocidos por los expertos en la materia.

Otro kit abarcado por la presente invención puede proporcionar reactivos para la detección de anticuerpos contra epítomos particulares. Dichos reactivos
15 son útiles para analizar una muestra con respecto a la presencia de anticuerpos, y se conocen fácilmente y están disponibles para un experto habitual en la materia. La presencia de anticuerpos puede determinarse usando procedimientos de detección convencionales conocidos por los expertos en la materia.

20 En ciertas realizaciones, los kits pueden incluir un conjunto de instrucciones impresas, o una etiqueta que indica que el kit es útil para la detección de animales infectados.

Anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o
25 recombinantes. Los anticuerpos pueden prepararse contra el inmunógeno o

una parte del mismo. Por ejemplo, un péptido sintético basado en la secuencia de aminoácidos del inmunógeno, o preparado de forma recombinante por técnicas de clonación, o el producto génico natural y/o partes del mismo pueden aislarse y usarse como el inmunógeno. Los inmunógenos pueden
5 usarse para producir anticuerpos por tecnología de producción de anticuerpos convencional bien conocida por los expertos en la materia. También pueden prepararse fragmentos de anticuerpo a partir de los anticuerpos por procedimientos conocidos por los expertos en la materia, e incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv.

10 En la producción de anticuerpos, la exploración para el anticuerpo deseado puede conseguirse por procedimientos convencionales en inmunología conocida en la técnica. En general, ELISA y transferencia de Western son los tipos preferidos de inmunoensayos. Ambos ensayos se conocen bien por los expertos en la materia. Pueden usarse anticuerpos tanto
15 policlonales como monoclonales en los ensayos. El anticuerpo puede unirse a un sustrato de soporte sólido, conjugado con un resto detectable, o puede tanto unirse como conjugarse como se conoce bien en la técnica. La unión de anticuerpos con un sustrato de soporte sólido también se conoce bien en la técnica. Los restos detectables contemplados para su uso en la presente
20 invención pueden incluir, pero sin limitación, marcadores fluorescentes, metálicos, enzimáticos y radiactivos, tales como biotina, oro, ferritina, fosfatasa alcalina, b-galactosidasa, peroxidasa, ureasa, fluoresceína, rodamina, tritio, ¹⁴C y yodación.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero sin limitación en
25 absoluto, por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Evaluación de vacunas que contienen CRCoV

Se usaron sesenta perros de raza Beagle de 8 a 9 semanas de edad con
5 buena salud general en el estudio. A todos los animales se les realizó un
examen físico tras su llegada y de nuevo el día -2 o -1 del estudio. Los
animales se observaron una vez al día con respecto a estado de salud general
desde el día del estudio de llegada -8 al día del estudio 39. Se recogieron las
temperaturas timpánicas comenzando el día del estudio -1 antes de la
10 vacunación. Se recogieron muestras sanguíneas (de aproximadamente 5 ml)
para serología en tubos SST los días del estudio 0 y 21 antes de cada
vacunación.

La cepa de vacuna de CRCoV se derivó de la cepa CRCoV.669,
depositada en la ATCC como PTA-11444 de acuerdo con el Tratado de
15 Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de
Microorganismos para los fines del Procedimiento de Patentes. La cepa de
vacuna de CIV derivó de la depositada en la ATCC como PTA-7694. Los
aislados de CPIV y CAV-2 derivaron de bases víricas usadas para formular
vacunas en la línea de vacuna Vanguard® (Pfizer). Los antígenos se
20 prepararon a los pases mayores de virus (virus de base maestra +5). Las
composiciones de vacuna contenían un adyuvante que consistía en Quil A (20
µg), colesterol (20 µg), dimetil dioctadecil amonio bromuro (DDA; 10 µg), y
Carbopol® (un ácido poliacrílico; 0,05 % v/v). El antígeno CRCoV se formuló
para dirigirse a 1,3 unidades de antígeno relativas (UAR) por dosis. Las
25 vacunas experimentales se ensayaron con respecto a esterilidad.

Se usó un aislado de CRCoV heterólogo (cepa “Max”; fase 1) como material de exposición. El material de reserva de virus se propagó y se tituló en células HRT18G, y se determinó que tenía un título de $10^{7.1}$ DICT₅₀/ml. Este material de exposición se ensayó y se confirmó que era satisfactorio para esterilidad, y sin micoplasma o agentes ajenos caninos/felinos.

Se vacunó un animal el día 21, todos los animales restantes se vacunaron el día del estudio 22. Los animales se vacunaron por vía subcutánea con la vacuna apropiada o placebo de acuerdo con el diseño de estudio mostrado en la Tabla 1. La primera vacunación se administró en la región del hombro derecho (día de estudio 0) y la segunda vacunación se administró en la región del hombro izquierdo (día de estudio 22).

Tabla 1. Diseño de estudio

Grupo	IVP	N	Vacunación ¹		Exposición ²		Necropsia
			Días de estudio	Vía	Día del estudio	Dosis	Día del estudio
T01	Placebo con adyuvante QuilA/colesterol/DDA/Carbopol (QC/DC)	10	0 y 22	SC	42	10^6 DICT ₅₀	46
T02	Placebo con adyuvante (QC/DC)	10					56
T03	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 (QC/DC)	10					46
T04	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 (QC/DC)	10					56
T05	RTU monovalente de CRCoV (QC/DC; emulsionado)	10					46
T06	RTU monovalente de CRCoV (QC/DC; emulsionado)	10					56

¹ Se administró producto veterinario de investigación (IVP) por vía subcutánea (SC).

² Dosis de exposición con aislado Max de CRCoV en el pase 1 por vía intranasal.

RTU: Vacuna líquida lista para usar

Después de la primera vacunación, los animales se observaron diariamente (desde el día del estudio 1 al 8) con respecto a hinchazón de inyección post-vacunación. Después de la segunda vacunación, los animales se observaron diariamente con respecto a hinchazón de inyección post-

vacunación hasta el día 29. Las observaciones se continuaron dos veces por semana con respecto a animales que tenían hinchazón en el sitio de inyección/dolor más allá de los días enumerados anteriormente, hasta que se resolvió la hinchazón/dolor. Se registraron diariamente las temperaturas timpánicas durante una semana después de cada vacunación.

Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 8 ml) para serología en tubos SST el día del estudio 42 antes de la exposición. Las temperaturas timpánicas se recogieron los días del estudio 40, 41 y 42 antes de la exposición. Se recogieron dos tipos de hisopos orofaríngeos (VTM [Medio de Transporte de Virus] para aislamiento de virus, y Amies para aislamiento bacteriano) de cada perro antes de la exposición el día del estudio 42. Los animales se observaron una vez al día antes de la exposición los días de estudio 40, 41 y 42, con respecto a señales clínicas de enfermedad respiratoria para establecer valores de línea basal.

El día el estudio 42, todos los animales se expusieron por vía intranasal (IN) al virus de exposición CRCoV a una dosis de exposición diana de 10^6 /ml/perro. Todos los animales se sedaron antes de la administración de exposición por inyección intravenosa de Domitor®. Después de la sedación, cada animal recibió 1,0 ml de virus de exposición, proporcionándose aproximadamente 0,5 ml por orificio nasal lentamente usando una jeringa sin una aguja. Después de administración de exposición, se invirtió la sedación mediante una inyección intramuscular de Antisedan®.

Las temperaturas timpánicas, observaciones clínicas e hisopos orofaríngeos se recogieron diariamente después de la exposición del día del estudio 42 al 56. Se recogieron muestras sanguíneas (aproximadamente 5 ml)

para serología el día de estudio 46 y día del estudio 56 (antes de la necropsia).

En la necropsia, se retiró de forma aséptica el pulmón completo y la tráquea y se colocaron en una tela estéril, y los lóbulos pulmonares se evaluaron en general con respecto a lesiones pulmonares (consolidación).

- 5 Cada lóbulo pulmonar se puntuó con respecto al porcentaje de consolidación pulmonar. Un conjunto de pulmones tenía sangrado insuficiente y no se evaluó. La tráquea se cortó transversalmente, se evaluó el lumen con respecto a patología general y se registró cualquier hallazgo.

- Después de que se hubieran puntuado los pulmones, se lavó el lóbulo
10 de pulmón caudal derecho aclarando con aproximadamente 30,0 ml de medio para análisis bacteriológico y aislamiento de virus. Se recogió un par de muestras tisulares de la tráquea y la cavidad nasal, una para aislamiento de virus y la segunda para histopatología. Los lóbulos pulmonares craneales derechos se dividieron en tres muestras, incluyendo una para toma de
15 muestras de bacteriología. Se recogió sangre para serología en días de estudio predeterminados.

- Resultados. Se confirmó mediante ensayos de IFA que todos los animales eran negativos para anticuerpos (título de IFA < 40) frente a CRCoV antes del día del estudio 0. Los hisopos orofaríngeos evaluados con respecto a
20 aislamiento de virus CRCoV confirmaron que todos los animales estaban sin CRCoV el día del estudio 0 antes de la vacunación. Los controles vacunados con placebo permanecieron seronegativos para CRCoV hasta el día del estudio 42. Se confirmó que el grupo estaba sin CRCoV por aislamiento de virus el día del estudio 42, lo que indicó falta de CRCoV ajeno en la instalación. Se
25 confirmó que todos los perros estaban sin *Bordetella bronchiseptica* el día del

estudio 42.

Se usó un ensayo de ELISA para medir la concentración de antígeno de CRCoV en la vacuna como unidad de antígenos relativa (UAR) frente a un lote específico de antígeno de referencia designado CRCoV. Se determinó que el
5 antígeno CRCoV era de 0,5 UAR/dosis.

Después de la vacunación, la mayoría de los perros vacunados, incluyendo el grupo vacunado con placebo, desarrollaron una hinchazón de inyección en el sitio de inyección. Para el grupo vacunado monovalente, los tamaños de hinchazón fueron generalmente pequeños (2 cm o menos en la
10 dimensión más larga) en la mayoría de los vacunados. Estas hinchazones se resolvieron en un período de dos semanas para la mayoría de los perros. No hubo dolor ni reacciones sistémicas relacionadas con la vacuna en ninguno de los perros vacunados. No se observó fiebre clínica ($\geq 39,5$ °C), excepto en un perro, aunque la temperatura elevada en ese perro no estaba relacionada con
15 la vacunación (la temperatura se recogió antes de la segunda vacunación). Estos hallazgos indican que la vacuna monovalente provoca solamente hinchazones de inyección dentro de lo que se espera para una vacuna con adyuvante.

Los títulos de neutralización de suero se tabularon y se compararon
20 entre grupos. Todos los perros vacunados monovalentes (100 %) desarrollaron títulos de SN (GMT 371) tres semanas después de la segunda vacunación, lo que indica inmunización activa. Se midió una fuerte respuesta de neutralización de suero después de la exposición (anamnésica) el día 56 en los perros vacunados con combinación (GMT 6.915) en comparación con los perros
25 vacunados con placebo (GMT 471). Estos resultados fueron estadísticamente

significativamente diferentes, e indican que el antígeno de vacuna CRCoV estimuló y sensibilizó eficazmente las respuestas inmunitarias de perros contra infección por CRCoV.

Después de la exposición, todos los animales vacunados con placebo (100 %) difunden virus en sus secreciones orofaríngeas al menos durante un día entre el día 1 y día 6 después de la exposición, lo que indica inducción de infección por CRCoV. La vacuna monovalente redujo significativamente ($p = 0,0237$) el número medio de días con difusión orofaríngea (2,1 días) en comparación con placebo (3,3 días), lo que indica la eficacia de la vacuna en la reducción de la infección por CRCoV.

Todos los perros vacunados con placebo (100 %) dieron resultado positivo para aislamiento de virus el día 4 después de la exposición en su tráquea, cavidad nasal y pulmones, lo que indica infección por CRCoV de los órganos respiratorios. No hubo virus aislado de ningún órgano el día 14 después de la exposición, lo que sugiere una infección viral respiratoria típica similar a la gripe canina. Por el contrario, la vacuna monovalente evitó la infección en el 90 % y 50 % de los pulmones de perros vacunados (p valor $< 0,0001$) y tráquea (p valor $< 0,0237$), respectivamente. Esto indica que la vacuna monovalente indujo suficiente inmunidad que previno la infección viral en estos órganos críticos. No hubo diferencias significativas en la tasa de infección de cavidad nasal entre vacunados y controles.

La exposición a CRCoV provocó solamente señales clínicas leves en condiciones experimentales. Se presentaron descargas oculares y nasales y conjuntivitis en perros entre los grupos de tratamiento. Hubo 5 animales que presentaron fiebre clínica ($\geq 39,5$ °C) durante el periodo posterior a la

exposición, dos en los grupos de placebo, uno en un grupo de vacuna monovalente y dos en los grupos de vacunación con combinación.

La evaluación general de los pulmones, tráquea y turbinados nasales se realizó el día 4 y 14 después de la exposición. No se indicó lesión general notable, excepto que dos perros, uno en T05, uno en T01, tuvieron niveles bajos de consolidación pulmonar; dos perros, uno en T01, uno en T03, tuvieron áreas focales de necrosis en los turbinados nasales.

Para histopatología, se examinaron tejidos de pulmón, tráquea y cavidad nasal y se puntuaron. Dependiendo del alcance de los cambios observados, se asignó una puntuación (de 0 a 4). Los cambios atribuibles a la exposición fueron más notables en los turbinados nasales, después la tráquea y finalmente los pulmones. Esto es coherente con un virus de exposición respiratoria que tiene su efecto principal en el tracto respiratorio superior (turbinados nasales y tráquea), con un efecto posterior y menor en el tracto respiratorio inferior (pulmón). Esto demuestra que la infección por CRCoV provocó patología tisular en los órganos respiratorios.

Estudios previos han mostrado que el daño ciliar en la tráquea el día 4 después de la exposición es una secuela patológica característica de infección por CRCoV. Los datos mostraron que la vacuna monovalente evitó el daño ciliar traqueal en el 60 % de los animales en comparación con los vacunados con placebo (30 % de animales normales), pero la reducción no fue significativa ($P = 0,1538$). La bacteriología de diagnóstico realizada en pulmones y lavados pulmonares confirmó que todos los animales eran negativos para *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella* spp., *Staphylococcus intermedius* y *Streptococcus canis*. El pulmón, lavado pulmonar o ambos fueron positivos para *Mycoplasma*

spp., en solamente 4 animales. Este hallazgo sugiere que las lesiones eran específicas para, y resultaban de, la infección viral.

En resumen, todos los perros vacunados con CRCoV (100 %) en T03-T06 desarrollaron títulos neutralizadores de suero tres semanas después de la
5 segunda vacunación, lo que indica inmunización activa. La vacuna monovalente indujo respuestas inmunitarias en los vacunados que redujeron la difusión viral en secreciones orofaríngeas y en órganos respiratorios. También redujo el daño ciliar traqueal en vacunados en comparación con controles vacunados con placebo. El examen histopatológico mostró que la vacuna
10 monovalente prevenía el daño ciliar traqueal en el 60 % de los animales en comparación con animales vacunados con placebo (30 %).

Ejemplo 2. Ensayo de eficacia de una vacuna bivalente de CRCoV/CIV en perros

Se usaron sesenta perros de razas Beagle de 7 a 8 semanas de edad
15 con salud general buena en el estudio. A todos los animales se les realizó un examen físico tras su llegada al estudio el día -9. Todos los animales, con la excepción de un perro que se retiró el día del estudio -7, recibieron un segundo examen físico el día del estudio -2, y se consideraron adecuados para el estudio.

20 Los animales se observaron una vez al día con respecto a estado de salud general desde el día de llegada al estudio -7 al día del estudio 39. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 6 ml) para serología en tubos de separación en suero (SST) los días del estudio 0 y 21 antes de cada vacunación. Se recogieron dos conjuntos de hisopos nasales, uno para CRCoV
25 y uno para aislamiento de virus CIV, de cada perro antes de la vacunación el

día 0 para confirmar la ausencia de CRCoV y CIV. Se recogió la temperatura timpánica y se documentó los días -1 y 0 antes de la vacunación para establecer una línea basal antes de la vacunación. Se registraron las temperaturas timpánicas antes de la segunda vacunación el día 21. Los
5 animales se palparon en la región del hombro los días de estudio 0 y 21 antes de la vacunación, para asegurar que no estaba presente en lesiones pre-existentes en el área del sitio de inyección.

Se retiró un perro en T04 del estudio debido a dificultad respiratoria el día del estudio -7. Se retiró un perro en T05 del estudio debido a la dificultad
10 respiratoria el día del estudio 0 antes de la vacunación. Adicionalmente, se retiraron dos animales del estudio después de la inclusión debido a condiciones no relacionadas con la realización del estudio. Se retiró un perro en T06 del estudio el día de estudio 21 antes de recibir la segunda vacunación debido a dificultad respiratoria. Se retiró un perro en T02 del estudio el día 21 antes de
15 recibir la segunda vacunación, debido a queratoconjuntivitis no resuelta y membrana nictitante prolapsada.

Se prepararon dos vacunas bivalentes, una vacuna de CRCoV inactivado/CIV inactivado con adyuvante de Emulsigen® al 5 % v/v, y una vacuna de CRCoV inactivado/CIV inactivado con adyuvante de Rehydragel™ al
20 5 % v/v (Tabla 2). La cepa de vacuna de CRCoV derivó de la depositada en la ATCC como PTA-11444. La cepa de vacuna de CIV derivó de la que se depositó en la ATCC como PTA-7694. Se produjeron volúmenes de ambos antígenos usados para realizar las vacunas a pase máximo de virus y células, para cumplir los requisitos de inmunogenicidad. El antígeno de CRCoV se
25 formuló para dirigirse a 1,55 UAR/dosis. El antígeno de CIV se formuló para

dirigirse a 640 unidades de HA/dosis.

Tabla 3. Diseño del estudio

Grupo	IVP	N	Vacunación ¹		Exposición ²		Necropsia
			Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis	Día del estudio
T01	Solución salina	10	0 y 21	SC	42	10 ⁶ DICT ₅₀	46
T02	Solución salina	9					56
T03	CRCoV-CIV 5 % AIOH	10					46
T04	CRCoV-CIV 5 % AIOH	9					56
T05	CRCoV-CIV 5 % Emulsigen®	9					46
T06	CRCoV-CIV 5 % Emulsigen®	9					56

¹ Se administró producto veterinario de investigación (IVP) por vía subcutánea (SC).

² Dosis de exposición diana de aislado Max de CRCoV (pase 1), administrado por vía intranasal.

AIOH: Gel de hidróxido de aluminio

Se usó un aislado de CRCoV heterólogo (cepa “Max”; pase 1) como el material de exposición. El material de reserva de virus se propagó y se tituló en células HRT18G y se determinó que tenía un título de 10^{7,1} DICT₅₀/ml. Este material de exposición se ensayó y se confirmó que era satisfactorio para ensayos de esterilidad, estando sin micoplasma y agentes ajenos caninos/felinos.

Los animales se vacunaron con la vacuna apropiada o placebo los días 0 y 21 (Tabla 2.). La primera vacunación se administró en la región del hombro derecho el día 0, y la segunda vacunación se administró en la región del hombro izquierdo el día 21.

Los animales se observaron diariamente con respecto a hinchazón de inyección/dolor después de la primera vacunación de los días de estudio 0 a 8, y a continuación los días del estudio 12, 15, 19, 21, 22 y 26. El día del estudio 8, no se registraron de forma involuntaria observaciones de hinchazón para 18

animales. El día del estudio 21, se registraron observaciones extra para observaciones del hombro derecho (vacunación de primera dosis) para algunos animales.

Después de la vacunación el día del estudio 21, los animales se
5 observaron diariamente con respecto a hinchazón de inyección/dolor después de la vacunación los días del estudio 21 a 29, y a continuación los días del estudio 33, 36 y 40. Todas las hinchazones resultantes de la segunda vacunación estaban resueltas para el día del estudio 40. Se recogieron las temperaturas timpánicas los días de vacunación 0 a 7 y 21 a 28,
10 aproximadamente 3 horas después de cada vacunación.

Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 6 ml) para serología en tubos de SST el día del estudio 42 antes de la exposición. También antes de la exposición, se recogieron las temperaturas timpánicas los días del estudio 40, 41 y 42, para establecer valores de línea basal. Se
15 recogieron dos tipos de hisopos nasales (VTM para aislamiento de virus CRCoV; Amies para aislamiento bacteriano) de cada perro antes de la exposición el día del estudio 42. Los animales se observaron una vez al día antes de la exposición los días del estudio 40, 41 y 42 con respecto a señales clínicas de enfermedad respiratoria, para establecer valores de línea basal.

20 A cada grupo de seis perros de todos los grupos de tratamiento se le administró el virus de exposición por aerosolización de 19 ml de material de exposición en la cámara de plexiglás durante aproximadamente 30 minutos. El volumen de virus de exposición nebulizado en la cámara se ajustó proporcionalmente cuando se expusieron menos de seis perros a la vez. La
25 titulación de virus realizada en muestras de exposición a CRCoV recogidas

después de la administración de exposición confirmó que la cantidad de virus de exposición vivo aerosolizado en la cámara contenía $10^{5,1}$ DICT₅₀/ml. Después de la exposición, se recogieron las temperaturas timpánicas, observaciones clínicas e hisopos nasales (hisopos estériles Dacron, Puritan 25-806-1PD) para aislamiento de virus (tubos VTM) diariamente de perros del día del estudio 42 a 56. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 6 ml) para serología el día del estudio 46 y día de estudio 56 días antes de la necropsia.

En la necropsia, se retiraron de forma aséptica el pulmón y la tráquea completos y se colocaron en una tela estéril. Los lóbulos de pulmón se evaluaron en general con respecto a lesiones pulmonares (consolidación). Cada lóbulo pulmonar se puntuó con respecto al porcentaje de consolidación de pulmón. Los conjuntos de pulmones de dos animales tuvieron sangrado insuficiente y no pudieron evaluarse ni puntuarse. La tráquea se cortó transversalmente, el lumen se evaluó con respecto a patología general y se registró cualquier hallazgo. Después de que se hubieron puntuado los pulmones, cada lóbulo pulmonar caudal derecho se lavó aclarando con aproximadamente 30,0 ml de VTM (sin antibiótico) para análisis bacteriológico de diagnóstico y para aislamiento de virus.

Después de que se hubieron puntuado los pulmones, se recogieron muestras titulares de la tráquea y la cavidad nasal, y se recogió el lóbulo pulmonar medio izquierdo completo para histopatología. Se recogieron muestras tisulares de la tráquea, la cavidad nasal y lóbulo pulmonar craneal derecho para aislamiento de virus y para bacteriología.

Se recogió sangre para serología en días de estudio pre-determinados.

Se recogieron hisopos nasales (medio de transporte Amies sin carbón) de cada perro solamente el día del estudio 42 (antes de la exposición) para bacteriología de diagnóstico. Estos hisopos se ensayaron con respecto a la presencia de *Bordetella* spp., *Pasteurella* spp., *Staphylococcus* spp.,
 5 *Mycoplasma* spp. y *Streptococcus canis*.

Resultados. Se confirmó por ensayos de IFA que cincuenta y nueve cachorros de raza Beagle eran negativos para anticuerpos (título de IFA < 40) frente a CRCoV el día del estudio 0 antes de la vacunación. También se ensayaron muestras de suero por neutralización de suero y se confirmó que
 10 eran negativas (título de SN < 20) para anticuerpos para CRCoV. Los hisopos nasales evaluados para aislamiento de virus CRCoV confirmaron que todos los animales estaban sin virus CRCoV el día del estudio 0 antes de la vacunación. Los ensayos de virus CIV y anticuerpo el día del estudio 0 confirmaron que los animales no tenían virus CIV ni anticuerpos HAI de CIV (título de HAI < 8).
 15 Basándose en estos dos criterios, se confirmó que los animales eran susceptibles, y por lo tanto adecuados para evaluación de la eficacia y seguridad de vacunas de CRCoV y CIV. Los controles vacunados con solución salina siguieron siendo seronegativos para CRCoV hasta el día del estudio 42. Se confirmó que todos los animales estaban sin CRCoV por estudio de
 20 aislamiento de virus el día 42, lo que indica falta de exposición a CRCoV ajeno en la instalación. Se confirmó que todos los perros estaban sin *Bordetella bronchiseptica* el día del estudio 42 (antes de la exposición).

Los perros se vacunaron con dos formulaciones que contenían antígenos de CRCoV inactivado y CIV inactivado, con adyuvante de
 25 Emulsigen® o Rehydragel™. Se midió la potencia de antígeno de CRCoV en la

vacuna mediante un ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo, empleando un anticuerpo monoclonal neutralizador de suero específico de CRCoV 41.1.1. Medida contra un antígeno de referencia diseñado, se determinó que la potencia era de 1,14 UAR/dosis. El título de HAI de cobaya de CIV fue de 955.

5 (El criterio de aprobado fue un título de HAI ≥ 161 .)

Diez de los 19 animales que recibieron la formulación de Emulsigen® (T05 y T06) desarrollaron hinchazón de inyección medible después de la primera vacunación. Se informó de rascadura en la mayoría de los perros inmediatamente después de la vacunación. Se informó de dolor al tacto en
10 solamente 2 perros. Excepto por un perro, las hinchazones en este grupo se resolvieron todas al día siguiente. Hubo un aumento numérico ligero de hinchazón de inyección en tamaño y frecuencia después de la segunda vacunación, pero estuvieron todos dentro de lo que se esperaba como una reacción típica a una vacuna con adyuvante. No se informó de ninguna
15 reacción sistémica en ninguno de los perros vacunados, como se confirmó por la falta de fiebre clínica ($\leq 39,5$ °C). Estos hallazgos indican que esta formulación de vacuna es segura para administrar a perros en este grupo de edad, y el perfil de seguridad está dentro de lo que se espera para una vacuna con adyuvante.

20 La mayoría de los perros (T03 y T04), que recibieron la formulación de Rehydrigel™ desarrollaron hinchazón de inyección después de cada vacunación. Las hinchazones aparecieron tres días después de la primera vacunación, estando resueltas la mayoría de las hinchazones para el día de estudio 19. Se vio una reacción similar después de la segunda vacunación,
25 cuando la mayoría de las hinchazones se resolvieron para el día 36 del estudio.

Las hinchazones de inyección generalmente fueron de tamaño pequeño y típicas de reacciones de adyuvante de alumbré. No se informó de dolor ni de fiebre, lo que confirma la falta de reacción sistémica a la vacunación. Estos hallazgos indican que esta formulación de vacuna es segura para administrar a
5 perros en este grupo de edad, y el perfil de seguridad está dentro de lo que se espera para una vacuna con adyuvante.

Se tabularon títulos de neutralización en suero, y se compararon entre grupos (Figura 1). Ambas formulaciones de vacuna indujeron respuestas de anticuerpo neutralizador de suero (SN) en todos los perros vacunados después
10 de la primera dosis, lo que indica inmunización activa (Figura 1). La media geométrica de la respuesta SN (GMT para Rehydragel™ = 552; GMT para Emulsigen® = 2.030) aumentó después de la segunda vacunación, lo que indica un efecto de refuerzo de la segunda vacunación. Ambas formulaciones de vacuna dieron como resultado una respuesta SN anamnésica robusta
15 después de la exposición (GMT para Rehydragel™= 10725 y Emulsigen® = 11584 el día del estudio 56 para el resto de los perros en el estudio), lo que indica una respuesta de memoria inmunitaria eficaz. Es importante observar que la respuesta de anticuerpo a CRCoV se consiguió en presencia de un antígeno de CIV, lo que indica falta de interferencia entre los antígenos en la
20 vacuna bivalente.

Se expusieron cincuenta y seis perros restantes en el estudio el día del estudio 42 por aerosolización. El aislamiento de virus nasal después de la exposición demostró que todos los perros vacunados con solución salina (100 %)
25 6 después de la exposición, lo que indica la infección de perros por CRCoV,

con un número medio de días de difusión de 4,5 (Figura 2). Las dos formulaciones de vacuna redujeron significativamente la difusión viral a 2,6 días ($p < 0,0001$) y 3,4 días ($p = 0,0042$) para Rehydragel™ y Emulsigen®, respectivamente. Estos hallazgos indican que las vacunas indujeron eficacia
5 que dio como resultado la reducción de la infección viral.

Los datos de aislamiento de virus de tejido mostraron que el 90-100 % de los perros en el grupo vacunado con solución salina fueron positivos para virus en su cavidad nasal, tráquea y tejidos pulmonares el día del estudio 4 después de la exposición, lo que indica infecciones de los órganos respiratorios
10 (Figura 3). Por el contrario, ambas vacunas redujeron significativamente el porcentaje de animales positivos para aislamiento de virus en los pulmones ($p < 0,0001$) y en la cavidad nasal ($p < 0,002$). Aunque ambas vacunas redujeron el aislamiento de virus en la tráquea (virus aislado del 70 % para grupo de Rehydragel™ y del 44 % para grupo de Emulsigen®), solamente la formulación
15 de Emulsigen® dio como resultado reducción significativa del aislamiento de virus en comparación con los controles de solución salina ($p = 0,0089$). No se aisló virus de ningún animal el día 14 después de la exposición, lo que indica que la infección por CRCoV es rápida al entrar y dejar los tejidos respiratorios, un escenario similar a la gripe canina. Los datos de aislamiento de virus indican
20 que ambas formulaciones de vacuna redujeron significativamente la infección viral en perros.

La exposición a CRCoV provocó solamente señales clínicas respiratorias leves en condiciones experimentales. Se presentaron descargas oculares y nasales en perros entre los grupos de tratamiento.

25 Excepto para un animal en el día de estudio 41 (un día antes de la

exposición) en el grupo de control de solución salina, todos los animales tuvieron temperaturas normales antes de la exposición. Se indicó que dos animales en el grupo de control de solución salina tenían fiebre clínica después de la exposición. Ambos perros tuvieron temperaturas de 39,6 °C el día 2 después de la exposición (día de estudio 44). Uno de esos perros mostraron fiebre otra vez (40 °C) el día 4 después de la exposición. Ese perro recibió tratamiento para gastroenteritis simultánea. Esto puede explicar la respuesta de fiebre después de exposición a CRCoV en este perro, puesto que este virus no ha mostrado previamente que provoque fiebre en condiciones experimentales.

10 No se presentó fiebre clínica en ninguno de los perros vacunados.

La evaluación de necropsia general de los pulmones, tráquea y turbinados nasales se realizó el día 4 y 14 después de la exposición. No se informó de lesión general notable, excepto para consolidación de pulmón en dos perros de T05, dos perros de T01 y un perro de T02. La causa de estas lesiones no estaba clara, pero es poco probable que se debieran a CRCoV, puesto que las lesiones no eran uniformes, y no se ha mostrado que CRCoV cause consolidación pulmonar. La examinación de la bacteriología diagnóstica de los tejidos no sugirió la implicación de ningún otro patógeno.

15

Se examinaron y puntuaron secciones tisulares de pulmón, tráquea y cavidad nasal. Dependiendo del alcance de los cambios observados, se asignó una puntuación (de 0 a 4). Estudios anteriores realizados han mostrado que el daño ciliar en los epitelios traqueales el día 4 después de la exposición es un efecto patológico característico asociado con infección por CRCoV. (Priestnall y col. 2009). Los datos de histopatología revelaron que el 70 % de perros vacunados con solución salina experimentaron algún grado de daño epitelial

20

25

ciliado traqueal el día 4 después de la exposición. Por el contrario, ambas vacunas redujeron el número de perros afectados al 40 % para el Rehydragel™ ($p = 0,1184$) y 0 % para el Emulsigen® ($p = 0,0003$). Esto indica que las vacunas indujeron eficacia que protegió contra o redujo el daño mucociliar

5 traqueal, un mecanismo de defensa innata importante, en perros infectados.

Para evaluar la implicación potencial de otros patógenos respiratorios en el estudio, los animales se ensayaron con respecto a bacteriología diagnóstica antes de la exposición (hisopos nasales) y después de la exposición (tejido/lavado pulmonar). Los resultados obtenidos demostraron que los

10 animales estaban principalmente sin otros patógenos respiratorios, lo que indica que el resultado clínico medido después de la exposición se debió específicamente a infección por CRCoV.

En resumen, todos los perros vacunados con CRCoV-CIV (100 %) desarrollaron títulos de anticuerpo neutralizador de suero de CRCoV tres

15 semanas después de la segunda vacunación, lo que indica inmunización activa seguida de respuesta anamnésica posterior a la exposición fuerte, lo que indica buena sensibilización del sistema inmunitario. Las dos formulaciones de vacuna redujeron significativamente la difusión viral. Ambas formulaciones de vacuna redujeron significativamente el porcentaje de animales positivos para

20 aislamiento de virus en los pulmones ($p < 0,0001$) y en la cavidad nasal ($p < 0,002$). Ambas vacunas redujeron el aislamiento de virus en la tráquea, aunque solamente la formulación de Emulsigen® dio como resultado reducción significativa de aislamiento de virus en comparación con los controles de solución salina ($p 0,0089$). Ambas vacunas redujeron también el número de

25 perros afectados en el epitelio ciliado traqueal. La eficacia del antígeno de

CRCoV en estas vacunas se consiguió en presencia de antígeno de CIV, lo que indica falta de interferencia en el CRCoV por fracción de CIV.

Ejemplo 3. Seguridad y eficacia de vacunas que contienen *Bordetella bronchiseptica* en perros

5 Se seleccionaron cincuenta (50) perros, divididos en 5 grupos de tratamiento, para el estudio. Se determinó que los animales eran apropiados para el estudio basándose en un examen físico el día -4.

10 Se recogieron muestras de sangre (de aproximadamente 8 ml) para serología en tubos de SST de todos los animales los días de estudio -2, 21 y 28 antes de cada vacunación. Las muestras de suero recogidas el día -2 se usaron para confirmar que los animales no tenían *B. bronchiseptica*. Se recogieron hisopos nasales antes de vacunación el día 0, y se ensayaron con respecto a la presencia de *B. bronchiseptica*. Se recogieron las temperaturas timpánicas el día -4, para establecer una línea basal antes de la vacunación.

15 Los animales se vacunaron con la vacuna apropiada los días 0, 21 y 28 de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la Tabla 4. Las vacunas se administraron por vía subcutánea a cada perro en la región del hombro derecho para la primera vacunación, y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

20

Tabla 4. Diseño del estudio

Grupo	IVP	N	Vacunación ¹			Exposición ²		
			Vol (ml)	Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis diana/perro	Vía
T01	<i>B. bronchiseptica</i> (inactivada) + Pertactina (10 µg) Sin adyuvante	10	1,0	0 y 28	SC	56	10 ⁹	Intranasal (aerosol; cámara)
T02	Solución salina	10	1,0	0 y 28				
T03	<i>B. bronchiseptica</i> (inactivada) + Pertactina (10 µg) Sin adyuvante	10	1,0	0 y 21				
T04	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 Rehidratado con <i>B. bronchiseptica</i> (inactivada) + Pertactina (10 µg) Sin adyuvante	10	1,0	0 y 28				
T05	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 Rehidratado con agua (diluyente)	10	1,0	0 y 28				

¹ Se administró producto veterinario de investigación (IVP) por vía subcutánea (SC).

² Dosis de exposición diana de 10⁹ organismos de cepa de *Bordetella bronchiseptica*.

Todos los animales se observaron los días de vacunación 0, 21 y 28 con respecto a reacciones del sitio de inyección después de la vacunación. Se observaron diariamente con respecto a reacciones de inyección después de la vacunación de los días 1 a 7 y 22-35. Se recogieron las temperaturas timpánicas los días 0 a 7 y 21 a 35.

Se recogieron las muestras de sangre (aproximadamente 6 ml) para serología el día 55, un día antes de la exposición. Se recogieron las temperaturas timpánicas los días 54, 55 y 56 antes de la exposición. Se

recogieron hisopos nasales el día 55, un día antes de la exposición, y se ensayaron con respecto a la presencia de *B. bronchiseptica*. Los animales se observaron dos veces al día (a.m. y p.m.), aproximadamente 30 minutos cada sesión los días 54 y 55, y a.m. el día 56, con respecto a señales clínicas de enfermedad respiratoria, para establecer valores de línea basal.

Se usó cepa de exposición de *Bordetella bronchiseptica* para preparar una dosis de exposición diana de 10^9 UFC/4 ml/perro. El día 56, se expuso a perros de todos los grupos de tratamiento por vía intranasal a *B. bronchiseptica* mediante aerosolización en una cámara de plexiglás durante un total de 30 minutos para cada jaula expuesta. Se expusieron cinco perros de la misma jaula (uno de cada grupo de tratamiento) a la vez.

Se registraron las temperaturas timpánicas una vez al día después de exposición de los días 56 a 77. Se realizaron observaciones clínicas dos veces al día (a.m. y p.m.), durante aproximadamente 30 minutos en cada sala por cada sesión, del día 56 y hasta el día 76 y una vez (a.m.) el día 77. Brevemente, se observaron tos, descarga nasal, estornudo, descarga ocular, arcadas y depresión usando el siguiente sistema de puntuación: ausente (0), leve (1), moderado (2) y grave (3). Se recogieron hisopos nasales los días 59, 62, 66, 69, 74, 76 y 77, para determinar la difusión de organismos de exposición.

Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 6 ml) para serología el día 77. Se recogieron hisopos nasales para aislamiento de *B. bronchiseptica* usando hisopos y medios de transporte.

Se determinaron los anticuerpos aglutinantes para *B. bronchiseptica* por el ensayo de microaglutinación (MAT). Se valoraron las muestras de suero de

grupos de tratamiento T04 y T05 de los días 0, 28, 55 y 77 para anticuerpos de CRCoV por neutralización de suero e IFA, y para CIV por HAI. Se realizó aislamiento de *B. bronchiseptica* de hisopos nasales de acuerdo con el procedimiento convencional. Cada muestra se ensayó cualitativamente con respecto a la presencia o ausencia de bacterias.

Resultados. Se confirmó por aislamiento de cultivo de hisopo nasal que cincuenta (50) cachorros de raza Beagle de aproximadamente 8 semanas de edad sanos estaban sin organismos *B. bronchiseptica* el día 0. Las muestras de suero evaluadas con respecto a anticuerpos aglutinantes de *B. bronchiseptica* por el MAT confirmaron que todos los cachorros eran susceptibles con títulos de MAT de ≤ 8 el día -2.

Todas las vacunas experimentales evaluadas en este estudio produjeron hinchazones de inyección de leves a nulas después de la primera vacunación. Las hinchazones de inyección se limitaron al día del estudio 0 para la mayoría de los vacunados. También se presentaron hinchazones de inyección de leves a nulas después de la segunda vacunación. Las hinchazones de sitio de inyección cuando sucedieron, se resolvieron entre uno y tres días después de la segunda vacunación. Se presentó rascadura predominantemente en el grupo de combinación de 5 vías (T04). No se indicó fiebre clínica después de las vacunaciones. No se presentaron hinchazones de inyección en el grupo de solución salina. Los datos confirmaron la seguridad de las vacunas.

El recuento de colonias realizado antes y después de la inoculación de exposición confirmó que se aerosolizó en la cámara una media de $1,45 \times 10^8$ UFC de *Bordetella* por perro. La inoculación de exposición indujo tos en todos los perros de control de solución salina (T02) con un porcentaje de observación

medio de tos del 43,5 % y 12,2 días de tos. El grupo de tratamiento T05, vacunado con solamente viral de 4 vías (CRCoV/CIV/CPIV/CAV2) sin antígeno de *Bordetella* desarrolló tos similar al control de solución salina con un porcentaje de observación media de tos del 43,4 % y 12,2 días de tos. Estos hallazgos indican que la exposición fue adecuada y coherente para evaluar las vacunas de ensayo.

Los perros en el grupo de tratamiento T01 vacunado con la vacuna de *Bordetella* se protegieron significativamente frente a exposición (3,6 días de tos, $p < 0,0001$) en comparación con el grupo de control (12,2 días de tos). La misma vacuna también protegió significativamente a los perros del T03 cuando se proporcionó a un régimen de intervalo de 3 semanas (tos de 5,8 días, $p = 0,0004$). La reducción de las puntuaciones de tos en estos dos grupos (T01 frente a T03) no fue significativamente diferente (p valor = 0,1883) lo que sugiere que el nivel de protección para la vacuna dada con un intervalo de 3 o 4 semanas, es similar.

Los perros en T04 que recibieron la vacuna de combinación de 5 vías sin adyuvante estaban significativamente protegidos ($p = 0,0016$) contra exposición a *Bordetella* (tos de 6,6 días) en comparación con los controles de solución salina (tos de 12,2 días), y en comparación con T05 que recibió la combinación viral de 4 vías (CRCoV/CIV/CPIV/CAV2) (tos de 12,1 días, $p = 0,0019$), lo que indica la eficacia de la fracción de *Bordetella* en la vacuna de combinación sin adyuvante.

Fue posible evaluación serológica de las fracciones virales en la vacuna de combinación de 5 vías para solamente dos fracciones, la CIV y CRCoV, en las que se confirmó que los perros eran seronegativos el día del estudio -2. La

- respuesta de CIV HAI en el grupo de vacuna de 4 vías (T04) el día del estudio 56 fue numéricamente similar a la del grupo de vacuna de 5 vías (T05) e indica la falta de interferencia por la fracción de *Bordetella* en el antígeno de CIV. Las respuestas SN de CRCoV el día del estudio 56 fueron numéricamente mayores
- 5 en el grupo de vacuna de 4 vías (T04) que en el grupo de vacuna de 5 vías (T05), lo que indica posible interferencia por la *Bordetella* en la fracción de CRCoV. Sin embargo, estos hallazgos no son conclusivos puesto que estas vacunas no tuvieron adyuvante y la formulación no se optimizó y no se realizó exposición a CRCoV para ensayar la eficacia.
- 10 Se confirmó que la vacuna de *Bordetella* monovalente era segura y eficaz. La eficacia de la vacuna monovalente se demostró cuando la vacuna se proporcionó a intervalos de 21 o 28 días. También se mostró que la fracción de *Bordetella* era eficaz cuando se proporcionó en una vacuna de combinación sin adyuvante de 5 vías.
- 15 **Ejemplo 4. Estudio de serología multivalente**
- Se exploraron previamente cuarenta perros, de aproximadamente 8 semanas de edad y con buena salud general con respecto a *Bordetella bronchiseptica* mediante ensayo de microaglutinación (MAT), y con respecto a coronavirus respiratorio canino (CRCoV) mediante ensayo de anticuerpo
- 20 fluorescente indirecto (IFA). También se usó neutralización de suero (SN) para evaluar los niveles de anticuerpo. El día 0, todos los perros fueron negativos para los anticuerpos para *Bordetella bronchiseptica* como se determinó por MAT (≤ 16), y negativos para anticuerpos para CRCoV como se determinó por IFA (< 40). Todos los perros también estaban sin *Bordetella bronchiseptica* y
- 25 CRCoV, como se determinó mediante ensayo de aislamiento de hisopo nasal

antes de la primera vacunación (día 0).

Los perros se dividieron en 5 grupos de tratamiento de 8 perros cada uno y se vacunaron de acuerdo con el diseño de estudio mostrado en la Tabla 1. Las vacunas se administraron a cada perro en la región del hombro derecho para la primera vacunación, y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

Tabla 2. Diseño de estudio

Grupo de tratamiento	Producto veterinario de investigación (IVP)	Adyuvante	N	Vacunación ¹	
				Días de estudio	Vía
T01	CAV2/CPIV/CPV/L4	5 % Rehydragel	8	0 y 21	Vía subcutánea (SC)
T02	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	QCDC	8		
T03	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	1 % EMA ¹ / 3 % Neocryl/ 5 % Emulsigen SA	8		
T04	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	QCDC	8		
T05	CAV-2, CPI, CRCoV+ <i>Bordetella</i> , CIV	QCDC	8		

¹ EMA= anhídrido etileno maleico

Después de la segunda vacunación, debido a complicaciones, los grupos T04 y T05 se retiraron del estudio. Los perros en los grupos restantes (T01, T02 y T03) se observaron diariamente con respecto a reacciones post-vacunación, y se supervisaron con respecto a temperatura corporal (timpánica) durante 7 días después de cada vacunación. Se recogieron muestras de sangre de los perros los días 0, 21, 42 y 56 para medir respuestas de anticuerpo.

Las muestras de suero del día 0, 21, 42 y 56 se ensayaron con respecto a anticuerpos aglutinantes para *Bordetella bronchiseptica* por el ensayo de

MAT. Las muestras de suero de los mismos días también se valoraron con respecto a anticuerpos de CRCoV por neutralización de suero, para CIV por HAI, y para anticuerpos de CAV-2 y CPI por neutralización de suero. Se obtuvieron las medias geométricas de los títulos de anticuerpos para cada grupo de tratamiento.

Las vacunas de ensayo en los grupos T02 y T03 indujeron respuestas de anticuerpo en todos (100 %) los perros vacunados después de la segunda dosis, lo que indica inmunización activa contra los antígenos virales. La respuesta de anticuerpos aumentó después de la segunda vacunación en la mayoría de los perros vacunados, lo que indica un efecto de refuerzo de la segunda vacunación. Es importante observar que las respuestas de anticuerpo entre las fracciones virales se consiguieron en presencia de múltiples antígenos virales y bacterianos (*B. bronchiseptica*), lo que indica falta de interferencia inmunológica. La serología de MAT no se correlaciona con protección frente a *Bordetella*, sino que es más bien una herramienta de exploración valiosa para inscribir animales de estudio adecuados. En conclusión, basándose en la respuesta inmunológica en perros vacunados, se predice eficacia de los antígenos virales en la vacuna multivalente de 5 vías.

Ejemplo 5. Estudio de duración de la inmunidad

El fin de este estudio es demostrar la duración de la inmunidad de una vacuna de combinación respiratoria multivalente en perros. La vacuna contiene los siguientes componentes antigénicos: CAV-2 vivo modificado, CPIV vivo modificado, CIV inactivado, CRCoV inactivado y un extracto de *Bordetella bronchiseptica* complementado con un antígeno recombinante, bien pertactina, Bsp22, o ambos.

Todos los animales tienen buena salud general, y no han recibido ninguna vacunación para ninguno de los patógenos para los que se diseña que proteja la vacuna. Los perros se dividen en múltiples conjuntos de grupos de tratamiento. Cada conjunto consiste en dos grupos de tratamiento, un grupo de control que recibe una vacuna de placebo, y un grupo vacunado que recibe la
5 vacuna de ensayo. Los animales se vacunan dos veces, aproximadamente con 2-4 semanas de intervalo. Se observan con respecto a reacciones del sitio de inyección después de cada vacunación.

Aproximadamente 3-12 meses después de la vacunación, cada conjunto
10 de dos grupos de tratamiento (vacunados y controles) se exponen a uno de los patógenos para los que se ha diseñado que proteja la vacuna. Se realizan observaciones clínicas hasta y después de la exposición. Se recogen hisopos nasales para aislamiento del patógeno de exposición durante el período después de la exposición. Se recoge sangre de cada animal para obtener
15 suero, que se usa para análisis analítico posterior. Las señales clínicas de enfermedad respiratoria, difusión de patógenos después de la exposición y respuestas serológicas se usan como criterios para valorar la eficacia de las vacunas.

Todas las referencias anteriores se incorporan por la presente por
20 referencia como si se expusieran completamente en el presente documento.

Habiendo descrito de este modo en detalle diversas realizaciones de la presente invención, debe entenderse que la invención definida por las reivindicaciones adjuntas no se limita a detalles particulares expuestos en la descripción anterior ya que son posibles muchas variaciones evidentes de los
25 mismos sin alejarse del espíritu o alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un virus de gripe canina (CIV) y un coronavirus respiratorio canino (CRCoV).
- 5
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende además *Bordetella bronchiseptica*.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, que comprende
- 10 además un antígeno de pertactina p68.
4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que dicha *Bordetella bronchiseptica* es una bacterina o un extracto bacteriano.
- 15 5. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, que comprende además uno o ambos antígenos seleccionados de virus paragripal canino (CPIV) y adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2).
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que el
- 20 antígeno o ambos antígenos son CPIV y CAV-2.
7. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 que comprende además un antígeno de Bsp22 aislado.
- 25 8. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones

anteriores, en la que dicha composición no tiene adyuvante.

9. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un adyuvante.

5

10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición no contiene un antígeno no respiratorio.

10 11. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición induce una respuesta inmunitaria a un patógeno respiratorio canino en un cánido.

12. La composición inmunogénica de la reivindicación 11, en la que dicho
15 patógeno respiratorio canino es al menos uno de CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* y *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*).

13. Un uso de la composición inmunogénica de una cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 10 para el tratamiento o la prevención de infección por un patógeno respiratorio canino en un cánido.

14. El uso de la reivindicación 13, en el que dicho patógeno respiratorio canino es al menos uno de CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* y *M. cynos*.

25

15. El uso de la reivindicación 13 o 14, en el que dicha composición previene dicha infección durante un período de aproximadamente seis meses o más.
16. El uso de la reivindicación 13 o 14, en el que dicha composición previene
5 dicha infección durante un período de aproximadamente un año.
17. Un uso de la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infección por un patógeno respiratorio canino en
10 un cánido.
18. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha composición trata o previene el complejo de enfermedad respiratoria infecciosa canina (CERI) en un cánido.
15
19. Un procedimiento para tratar o prevenir CERI en un cánido, que comprende administrar a dicho cánido la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha composición previene CERI durante un período de aproximadamente seis meses o más.
20
21. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha composición previene CERI durante un período de aproximadamente un año.
25

22. Un uso de la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de CERl en un cánido.

Figura 1 Respuesta de anticuerpo neutralizador de suero frente a CRCoV

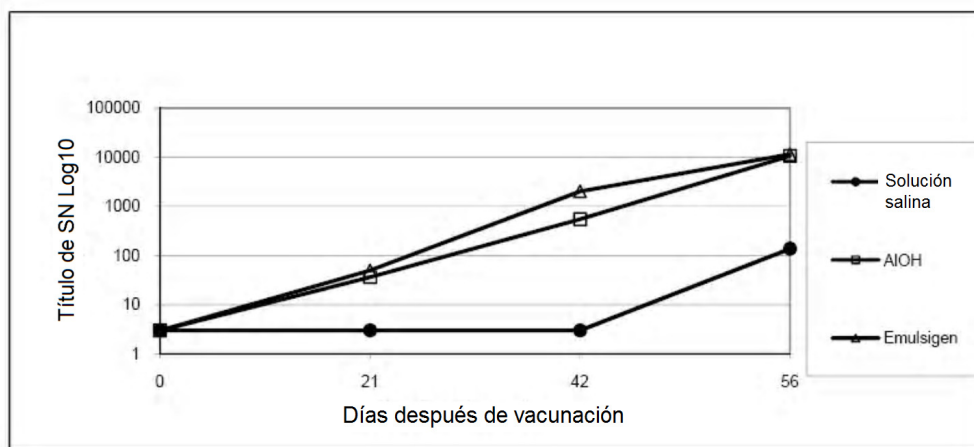


Figura 2. Difusión de virus nasal después de la exposición

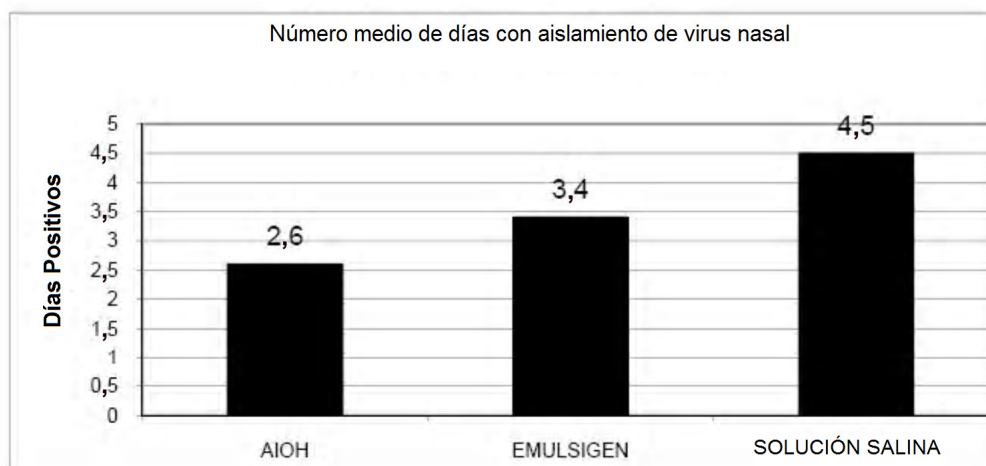
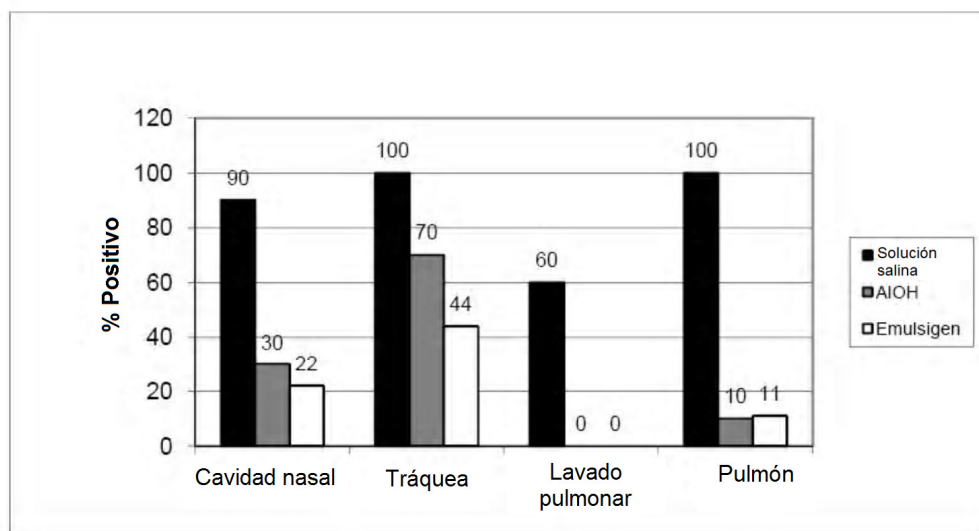


Figura 3. Porcentaje de animales positivos para virus tisular CRCoV el día 4 después de la exposición



RESUMEN

Se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden un virus de la gripe canina y un coronavirus respiratorio canino.

- 5 Pueden comprender además, *Bordetella bronchiseptica*, pertactina, virus paragripal canino y adenovirus canino de serotipo 2. Las composiciones son eficaces para tratar o prevenir enfermedades respiratorias caninas, incluyendo el complejo de enfermedad respiratoria infecciosa canina.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

KLEIMAN, Gabriel
Pfizer Inc.
235 East 42nd Street
New York, NY 10017
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2012 (02.11.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC71794A	
International application No. PCT/IB2012/050510	International filing date (day/month/year) 03 February 2012 (03.02.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address PFIZER INC. 235 East 42nd Street New York, NY 10017 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address AH USA 42 LLC 235 East 42nd Street New York, NY 10017 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Blanc Veronique
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 9666

IN RE APPLICATION OF: ZOETIS LLC

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/IB2012/050510

INTERNATIONAL FILING DATE: 03 February 2012

FOR: Compositions for Canine Respiratory Disease Complex

OUR REF.: PC71794A

**International Bureau of WIPO
PCT Receiving Office Section
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland (CH)**

**REQUEST FOR THE RECORDING OF CHANGE PURSUANT TO RULE 92bis
Owner is Merely Changing its Name**

Dear Sir:

ZOETIS LLC, herewith submits a **Request for the Recording of Change Pursuant to Rule 92bis** for International Application No. PCT/IB2012/050510. The Owner/ Applicant entity remains the same, but is changing its name.

Applicant ZOETIS LLC hereby requests the following change of Applicant and Applicant Address be recorded in International Patent Application No. PCT/IB2012/050510:

FROM: AH USA 42 LLC
235 East 42nd Street
New York, New York 10017-5755

TO: ZOETIS LLC
100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07940

Respectfully Submitted,



Barbara L. Renda
Reg. No. 27,626
Applicant for Zoetis LLC

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC71794A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2012/050510	International filing date (<i>day/month/year</i>) 03/02/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 04/02/2011
Applicant PFIZER INC.		

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 6 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
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☐ 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 No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. 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:

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, 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 regard 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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/145 A61K39/215 A61K39/10
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/082012 A1 (SHIELDS SHELLY L [US] ET AL) 12 April 2007 (2007-04-12)	1-6,8-22
Y	paragraph [0002] paragraph [0066] paragraph [0108] paragraph [0113]	7
A	----- WO 2007/118206 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]; DUBOVI EDWARD J [US]) 18 October 2007 (2007-10-18) paragraph [0070]; claims 6,12	1-22
A	----- WO 2004/011651 A1 (ROYAL VETERINARY COLLEGE [GB]; BROWNLIE JOHN [GB]; CHALKER VICTORIA JA) 5 February 2004 (2004-02-05) page 54, line 11 - page 59, line 18 ----- -/-	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2012

Date of mailing of the international search report

07/05/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/047728 A2 (WYETH CORP [US]; GUGISBERG KIM [US]; GILL MICHAEL [US]; CHU HSIEN-JUE) 26 April 2007 (2007-04-26) abstract claims 1-27 -----	1-22
A	WO 2007/048086 A2 (UNIV IOWA STATE RES FOUND INC [US]; YOON KYOUNG-JIN [US]; COOPER VICKI) 26 April 2007 (2007-04-26) paragraph [0012] paragraph [0078] -----	1-22
A	WO 2006/106424 A2 (PHARMACIA & UPJOHN CO LLC [US]; DOMINOWSKI PAUL JOSEPH [US]; FRANTZ JO) 12 October 2006 (2006-10-12) page 4, paragraph 6 page 13, paragraph 2 page 37, paragraph 3 - page 41, paragraph 2; example 5 -----	1-22
A	WO 01/90143 A2 (PASTEUR INSTITUT [FR]; GUIO MACLOUF NICOLE [FR]; BOURSAUX EUDE CAROLI) 29 November 2001 (2001-11-29) page 3, paragraph 3 page 16, paragraph 5 page 17, lines 12-14 claims 52,49 -----	1-22
A	US 2004/185062 A1 (DOMINOWSKI PAUL J [US] ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23) paragraphs [0062] - [0065] paragraph [0067] -----	1-22
A	WO 2006/038115 A1 (PFIZER PROD INC [US]; FRANTZ JOSEPH [US]; NEWBY THOMAS JACK [US]; TUCK) 13 April 2006 (2006-04-13) page 13, lines 21-25 -----	1-22
A	WO 2005/002618 A1 (ROYAL VETERINARY COLLEGE [GB]; BROWNLIE JOHN [GB]; CHALKER VICTORIA JA) 13 January 2005 (2005-01-13) page 3, paragraph 3 page 6, paragraph 3 page 14, paragraph 4 - page 15, paragraph 2 page 23, paragraph 2 - page 28, paragraph 4 page 29, paragraph 2 - page 30, paragraph 1 ----- -/--	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/050510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEDHEKAR BOB ET AL: "Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo", MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 71, no. 2, January 2009 (2009-01), pages 492-504, XP002673904, ISSN: 0950-382X the whole document -----	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/050510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007082012 A1	12-04-2007	US 2007082012 A1	12-04-2007
		US 2008254063 A1	16-10-2008
WO 2007118206 A2	18-10-2007	US 2007253981 A1	01-11-2007
		WO 2007118206 A2	18-10-2007
WO 2004011651 A1	05-02-2004	AT 491793 T	15-01-2011
		AU 2003244822 A1	16-02-2004
		CA 2492333 A1	05-02-2004
		CA 2727782 A1	05-02-2004
		DK 1525313 T3	14-03-2011
		EP 1525313 A1	27-04-2005
		EP 2182066 A2	05-05-2010
		JP 4644486 B2	02-03-2011
		JP 2005533513 A	10-11-2005
		MX PA05001098 A	08-09-2005
		NZ 537778 A	30-04-2008
		NZ 556442 A	31-03-2009
		PT 1525313 E	14-03-2011
		SI 1525313 T1	31-03-2011
		US 2007248616 A1	25-10-2007
		US 2009081780 A1	26-03-2009
		WO 2004011651 A1	05-02-2004
WO 2007047728 A2	26-04-2007	AR 056712 A1	17-10-2007
		EP 1941033 A2	09-07-2008
		WO 2007047728 A2	26-04-2007
WO 2007048086 A2	26-04-2007	AR 056133 A1	19-09-2007
		AT 491468 T	15-01-2011
		AU 2006304895 A1	26-04-2007
		BR PI0617407 A2	26-07-2011
		CA 2626452 A1	26-04-2007
		EP 1933866 A2	25-06-2008
		HK 1112846 A1	01-04-2011
		JP 2009511080 A	19-03-2009
		KR 20080046706 A	27-05-2008
		NZ 567017 A	24-12-2010
		RS 20080174 A	15-07-2009
		US 2007098742 A1	03-05-2007
		US 2009035325 A1	05-02-2009
		WO 2007048086 A2	26-04-2007
WO 2006106424 A2	12-10-2006	AR 053042 A1	18-04-2007
		AU 2006231916 A1	12-10-2006
		CA 2604488 A1	12-10-2006
		EP 1871410 A2	02-01-2008
		US 2006251674 A1	09-11-2006
		WO 2006106424 A2	12-10-2006
WO 0190143 A2	29-11-2001	AT 393166 T	15-05-2008
		AU 6752701 A	03-12-2001
		DE 60133734 T2	14-05-2009
		DK 1284993 T3	28-07-2008
		EP 1284993 A2	26-02-2003
		ES 2303833 T3	01-09-2008
		JP 2003533990 A	18-11-2003
		PT 1284993 E	11-06-2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/050510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 0190143 A2	29-11-2001
US 2004185062 A1	23-09-2004	US 2004185062 A1	23-09-2004
		US 2008175860 A1	24-07-2008
		US 2008226670 A1	18-09-2008
WO 2006038115 A1	13-04-2006	AT 524193 T	15-09-2011
		AU 2005290921 A1	13-04-2006
		BR PI0516253 A	26-08-2008
		CA 2583689 A1	13-04-2006
		CN 101035558 A	12-09-2007
		CN 101791398 A	04-08-2010
		DK 1799253 T3	28-11-2011
		EP 1799253 A1	27-06-2007
		ES 2370750 T3	22-12-2011
		JP 4163245 B2	08-10-2008
		JP 2008239627 A	09-10-2008
		JP 2008515873 A	15-05-2008
		KR 20070050499 A	15-05-2007
		KR 20080096610 A	30-10-2008
		NZ 553867 A	29-10-2010
		NZ 576898 A	31-03-2011
		PT 1799253 E	10-11-2011
		SI 1799253 T1	30-11-2011
		WO 2006038115 A1	13-04-2006
		ZA 200702166 A	26-11-2008
WO 2005002618 A1	13-01-2005	AT 442857 T	15-10-2009
		AU 2004253344 A1	13-01-2005
		BR PI0412194 A	22-08-2006
		CA 2530797 A1	13-01-2005
		CN 1845754 A	11-10-2006
		EP 1638599 A1	29-03-2006
		EP 2050463 A2	22-04-2009
		ES 2356396 T3	07-04-2011
		JP 2007526884 A	20-09-2007
		KR 20060106809 A	12-10-2006
		MX PA06000278 A	07-04-2006
		NZ 544453 A	30-04-2009
		US 2007098739 A1	03-05-2007
		US 2008220018 A1	11-09-2008
		US 2011059128 A1	10-03-2011
		WO 2005002618 A1	13-01-2005
		ZA 200600918 A	25-07-2007