

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIVI
DE PATENTE
INVENCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-184705- -00000-0000

Fecha: 2013-08-02 16:41:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

TITULO: COMPOSICIONES INMUNÓGENAS DE *BORDETELLA*
BRONCHISEPTICA

SOLICITANTE: *ZOETIS LLC.*

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

APODERADO: *CARLOS R. OLARTE*

BOGOTÁ: *02 de agosto de 2013*

P2013/000140

OLARTEM

OLARTE MOURE & ASOCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-184705-00000-0000

Fecha: 2013-08-02 16:41:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000140

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: ZOETIS LLC

Dirección: 100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07832
United States of América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución Estados Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2012/050512

Fecha

Febrero 03, 2012

Publicación Internacional No. WO 2012/104821 A1

Fecha

Agosto 09, 2012

6

Título (54) COMPOSICIONES INMUNÓGENAS DE BORDETELLA BRONCHISEPTICA

Clasificación Internacional (51) A61K 39/295; C07K 14/235; A61K 39/10

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Febrero 04, 2011

(31) Número de Solicitud

61/439,597

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha

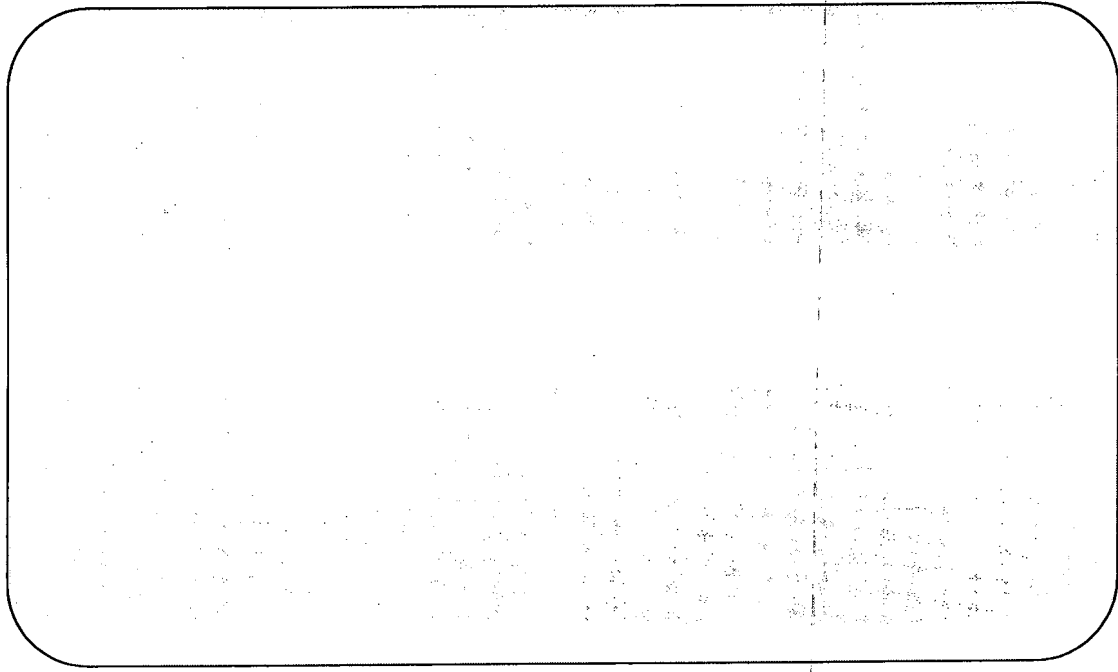
10

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

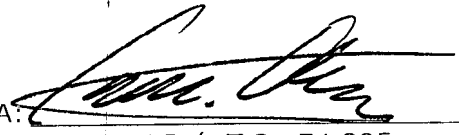
FIGURA CARACTERÍSTICA:



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 - 0075341
		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. 13-184705- -00000-0000
Fecha: 2013-08-02 16:41:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

4

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2012/050512

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

Jeffrey E. GALVIN

5500 Aaron Circle
Lincoln, NE. 68516
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.

Poder General

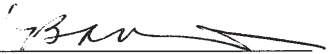
El suscrito,
ZOETIS P LLC

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.



(43) International Publication Date
9 August 2012 (09.08.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/104821 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/295 (2006.01) *A61K 39/10* (2006.01)
C07K 14/235 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2012/050512

(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

(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). **GALVIN, Jeffrey, E.** [US/US]; Pfizer Global Research & Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001 (US).

(74) Agent: **KLEIMAN, Gabriel, L.**; 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))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: IMMUNOGENIC BORDETELLA BRONCHISEPTICA COMPOSITIONS

(57) Abstract: Provided herein are compositions, combinations, and methods comprising *Bordetella bronchiseptica* and isolated pertactin, which are effective in treating or preventing respiratory infections, such as kennel cough, in animals.



WO 2012/104821 A1

IMMUNOGENIC BORDETELLA BRONCHISEPTICA COMPOSITIONS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of immunology, and in particular to the field of immunogenic and vaccine compositions. More specifically, the present disclosure relates to compositions comprising a *Bordetella bronchiseptica* preparation in combination with pertactin for treatment or prevention of respiratory disease(s) in a dog.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Bordetella bronchiseptica is a gram-negative bacteria that colonizes in the respiratory tract of dogs and causes tracheobronchitis or "kennel cough". Hawkins, E.C., Veterinary Internal Medicine (1995), pp. 767-811. *Bordetella bronchiseptica* predisposes dogs to the influence of other respiratory agents, and frequently exists concurrently with them. 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). Intranasal vaccines are unpopular with veterinary practitioners due to their personal risk with fractious animals during vaccine administration. 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, reactivity and/or formulation stability.

Bordetella bronchiseptica is a significant factor in canine infectious respiratory disease complex (CIRDC), which is a highly contagious disease common in dogs housed in crowded conditions, such as re-homing centers and boarding or training kennels. The pathogenesis of CIRDC is considered to be multifactorial, involving several viruses and bacteria. Infectious agents known to be causative agents of CIRDC

include, in addition to the bacterium *Bordetella bronchiseptica* (Bernis et al., Lab. Anim. Sci., 29:48-52, 1977), 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), *Mycoplasma cynos* (Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004) and canine adenovirus serotype 2 (CAV-2) (Ditchfield et al., Can. Vet. J., 3:238-247, 1962). To date, no comprehensive combination vaccine against all, or the majority, of the aforementioned pathogens has emerged.

Accordingly, there remains a need for an immunogenic composition capable of being safely administered parenterally to a dog, which provides long-acting immunoprotection against *Bordetella bronchiseptica* without deleterious side-effects or interference with other antigens in a combination vaccine or causing risk to the veterinary practitioner. The present disclosure fulfills these and other related needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

In one embodiment the present invention provides an immunogenic composition comprising, *inter alia*, *Bordetella bronchiseptica* and an isolated pertactin antigen. In another embodiment, said pertactin antigen is a recombinant protein. In another embodiment, said pertactin antigen is from *Bordetella bronchiseptica*. In another embodiment, said pertactin antigen is p68. In another embodiment, said composition further comprises an isolated Bsp22 antigen.

In another embodiment, the *Bordetella bronchiseptica* component is a bacterin or a bacterial extract. In another embodiment, said composition is non-adjuvanted. In another embodiment, said composition further comprises an adjuvant.

In another embodiment, said 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 about 5 µg, 10 µg, 15 µg or 20 µg. Preferably, 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.

Another embodiment provides an immunogenic composition comprising a plurality of recombinant p68 pertactin antigens, wherein said composition is substantially free of p68 aggregates. More particularly, said plurality of recombinant p68 pertactin antigens are prepared by solubilizing pertactin inclusion bodies in urea and optionally purifying by column chromatography. The invention also provides methods of making p68 pertactin antigens by solubilizing pertactin inclusion bodies in urea and optionally purifying by column chromatography.

In another embodiment, said composition is formulated for parenteral administration such that it further comprises a diluent or excipient for parenteral administration to a dog.

In another embodiment, said composition further comprises an antigen from a canine respiratory pathogen selected from the group consisting of: canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus-2 (CAV-2), canine respiratory coronavirus (CRCoV) and canine influenza virus (CIV). In a more particular embodiment, said composition comprises at least two, three or four of the antigens from the canine respiratory pathogens.

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*.

In another embodiment, said antigen is from canine respiratory coronavirus (CRCoV). In another embodiment, said antigen is from canine influenza virus (CIV). In another embodiment, said antigen is from canine parainfluenza virus (CPIV). In another embodiment, said antigen is from canine adenovirus-2 (CAV-2). In another embodiment, said antigen is from canine parainfluenza virus (CPIV) and canine adenovirus-2 (CAV-2).

In another embodiment, said composition comprises antigens from canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus-2 (CAV-2), canine respiratory coronavirus (CRCoV) and canine influenza virus (CIV).

In another embodiment, the composition induces an immune response to *Bordetella bronchiseptica* and at least one of canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus-2 (CAV-2), canine respiratory coronavirus (CRCoV) and canine influenza virus (CIV).

5 Another embodiment of the invention provides an immunogenic composition comprising canine respiratory corona virus (CRCoV), a *Bordetella bronchiseptica* preparation and canine influenza virus (CIV). More particularly, said composition comprises an isolated pertactin antigen.

10 Another embodiment of the present invention provides a method or use of the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments for treatment or prevention of infection from a canine respiratory pathogen in a dog. In another embodiment, said composition prevents infection from said canine respiratory pathogen in said dog for a period of 6-months or more. In another embodiment, said composition prevents infection from said canine respiratory pathogen in said dog for a period of
15 about 1-year.

In another embodiment, the canine respiratory pathogen is *Bordetella bronchiseptica*. In another embodiment, the canine respiratory pathogen further comprises at least one, two, three or four of: canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus-2 (CAV-2), canine respiratory coronavirus (CRCoV) and canine influenza
20 virus (CIV).

Another embodiment of the present invention provides a method or use of the immunogenic composition of any one of the foregoing embodiments for treatment or prevention of canine infectious respiratory disease complex (CIRDC), wherein the composition treats or prevents infection from a plurality of canine respiratory pathogens.
25 Another embodiment provides for the use or method of parenterally administering an immunogenic composition as described herein.

Another embodiment provides for the manufacture of a medicament comprising the immunogenic composition for treatment or prevention of infection from a canine respiratory pathogen in a dog.

30 These and other embodiments, features, and advantages of the invention will become apparent from the detailed description and the appended claims set forth

herein below. It is understood that each of the foregoing and following embodiments can be combined into a single embodiment.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 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.

10 "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
15 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.

20 The term "animal", as used herein, includes any animal that is susceptible to infection from *Bordetella bronchiseptica* and/or canine respiratory disease complex, including mammals, both domesticated and wild. Preferably, animal as used herein refers to a dog or a human.

25 "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
30 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
5 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
10 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
15 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
20 "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
25 amino acid residues.

"Excipient", as used herein, refers to a non-reactive carrier component of a vaccine or immunogenic composition that is not an antigen. Preferred excipients are those known in the art for parenteral injection.

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

"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
5 considering any conservative substitutions as part of the sequence homology.

"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
10 conditions, as described herein by example, and possess the same or similar biological activities and/or properties. In another aspect, 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
15 than about 96% sequence homology, greater than about 97% sequence homology, greater than about 98% 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
20 sequence after aligning both sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any 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
25 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 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
30 and neutralization assays, which are known in the art.

"Immunogenicity", as used herein, refers to the capability of a protein or polypeptide to elicit an immune response directed specifically against a bacteria or virus that causes the identified disease.

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 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 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 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. 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.

The term "isolated" refers to a substance that is either in substantially pure form, for example, greater than about 95% purity; or purified or enriched in some way from its

natural environment. Reference to "isolated pertactin" indicates a pertactin protein that is removed from its natural environment, such as from a host animal/dog, in a growth media, or purified from a whole cell *Bordetella bronchiseptica* preparation and may subsequently be added back to a composition comprising *Bordetella bronchiseptica* extract (i.e. spiked with pertactin isolates). The term "isolated" encompasses immunogens that are in solution with other agents/diluents/excipients/adjuvants/proteins.

"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.

5 The term "pathogen" or "pathogenic microorganism", as used herein, means a microorganism - for example CPIV, CAV-2, CRCoV, *Mycoplasma cynos*, CIV, or *Bordetella bronchiseptica* - which is capable of inducing or causing a disease, illness, or abnormal state in its host animal, preferably a respiratory disease, such as CIRDC.

"Pertactin", as used herein, refers to an outer membrane protein of *Bordetella*.

10 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 contents of which is hereby incorporated by reference. The pertactin antigen used herein includes lipidated forms of
15 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.

20 "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
25 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.

30 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 cause 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. 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 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 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 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 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, which includes mammals, such as dogs.

5 "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 an antigens- but not all antigens- which are derived
10 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
15 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. Preferably, the subunit component of the present
20 invention is recombinantly produced and most preferably it is pertactin (p68).

"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
25 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.

30 "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 is based upon the unexpected discovery that inclusion of isolated pertactin antigens in conjunction with a *Bordetella bronchiseptica* preparation results in substantially improved efficacy and safety. That is, when administered parenterally to a dog prior to bacterial challenge, the composition prevents onset of tracheobronchitis and does not result in adverse side-effects.

The present invention also 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) encompassed by this invention 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.

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 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 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 a canine influenza virus (CIV) 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 (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. A representative strain of the CIV antigen is the CIV virus strain in the commercial vaccine, Vanguard® CIV (Pfizer). This invention also encompasses vaccines comprising a strain identified as Equine Influenza Strain A/Equine/2/Miami/1/63. This strain is deposited at the ATCC, with accession number VR 317. 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, 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
5 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
10 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).

15 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
20 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*.

25 In one embodiment the *Bordetella bronchiseptica* is prepared as a whole cell 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
30 of *Bordetella bronchiseptica* is the live attenuated *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 of the subunit is an isolated pertactin antigen, preferably, a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen, particularly the recombinant *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen which is
5 recognized by the p68-specific monoclonal antibody Bord 2-7 (described in US 7,736,658, incorporated herein by reference) and in one preferred embodiment, has an amino acid sequence as set forth in US 7,736,658 or having 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,
10 one aspect of the invention provides a recombinant p68 pertactin that is substantially free (less than about 80%, 90%, 95% or even 99%) of aggregates. In another embodiment the recombinant p68 pertactin 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
15 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, incorporated by reference. The methods disclosed therein can
20 be used to prepare posttranslationally modified pertactin proteins that contain an attached lipid moiety.

Furthermore, in another embodiment, an immunogenic composition comprising *Bordetella bronchiseptica* and an isolated Bsp22 antigen. In another embodiment, the immunogenic composition comprises *Bordetella bronchiseptica*, an isolated pertactin
25 antigen and further comprises 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
30 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.

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 "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 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 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 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 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, 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
5 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),
10 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),
15 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),
20 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
25 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
30 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.

5 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
10 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
15 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
20 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 will be from about 1 µg/ml and about 4.0 mg/ml, or from about 10 µg/ml and about 3.0 mg/ml,
25 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, 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
30 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 *Leptospira bratislava*,
5 *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 *Microsporium canis*. Antigens can also be derived from pathogenic fungi such as
10 *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
15 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
20 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 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
25 described herein.

Immunogenic compositions and vaccines encompassed by the present invention can be made in various forms depending upon the route of administration. 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
30 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. 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.

5 Purified viruses and/or bacteria can be used directly in an 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 particles. The precise amount of a
10 microorganism in an immunogenic composition or vaccine effective to provide a protective effect can be determined by a skilled artisan.

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
15 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
20 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.

25 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.

30 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 vaso-constrictive 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 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.

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 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 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 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 dosage intervals, or for titrating the separate compositions against one another. To
5 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 for analyzing a sample for the presence of whole microorganisms, polypeptides, epitopes
10 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 the detection of antibodies against particular epitopes. Such reagents are useful for
15 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 label indicating that the kit is useful for the detection of infected animals.

20 Antibodies

Antibodies can either be monoclonal, polyclonal, or recombinant. The antibodies can be prepared against the immunogen or a portion thereof. For 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
25 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
30 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, ^{14}C , and iodination.

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

EXAMPLES

Example 1: Immunogenicity of a *Bordetella bronchiseptica* bacterial extract, subunit vaccine.

Thirty-two approximately 8-week-old beagles with low *Bordetella bronchiseptica* (Micro-agglutinating antibody (MAT) titers of ≤ 16) were enrolled in the study. The puppies were divided randomly into two treatment groups (T1 and T2) of 16 each. One puppy from T2 was removed prior to first vaccination due to an inguinal hernia.

Table 1. Study Design

Group	Vaccine	N	Vaccination			Challenge		
			Volume mL	Study Days	Route	Study Day	Dose/Dog	Route
T1	Saline	16	1.0	0 and 21	SC	42	6.4x10 ⁸ CFU (colony forming unit)	Intranasal aerosolization in the chamber
T2	<i>B. bronchiseptica</i> Extract-Subunit Vaccine	15	1.0					

Dogs were vaccinated subcutaneously (SC) with the appropriate vaccine on Days 0 and 21, 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.

On Day 42, dogs from all treatment groups were challenged intranasally with *B. bronchiseptica* using aerosolization in a Plexiglas chamber for 30 minutes. Four dogs, 2

from T1 and 2 from T2, were challenged at a time, with the exception of one group, which had only 3 animals, two from T1 and one from T2, because one animal was removed earlier from the study.

The primary efficacy variable was cough. All other variables (nasal discharge, ocular discharge, sneezing, depression, retching, respiration) were considered supporting secondary variables. Clinical observations for signs of respiratory disease, including cough, were performed twice daily ("observation periods"; a.m. and p.m.), for approximately 30 minutes in each room per each session, from Day 42 and until Day 70 (conclusion of the study). Whether or not an animal coughed for two consecutive observation periods post-challenge was calculated for each animal. A frequency distribution of coughing/not coughing for two consecutive observation periods was calculated for each treatment. Coughing/not coughing for two consecutive observation periods was analyzed with a Cochran-Armitage test, adjusting for room since it was not possible to analyze the data with a generalized linear mixed model. Frequency distributions of nasal bacterial isolation (+/-) were calculated for each treatment and time point. It was also determined for each animal whether or not it ever had bacteria isolated post-challenge.

A frequency distribution of whether an animal ever had *B. bronchiseptica* isolated post challenge was calculated for each treatment, and was analyzed with a generalized linear mixed model, if possible. Duration of nasal shedding post-challenge was calculated for each animal, and was analyzed with a general linear mixed model. Antibody titers were logarithmically transformed, and analyzed using a general linear mixed model for repeated measures.

Results: There was no pain or fever ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$) reported in any of the dogs following vaccination. Some dogs in both treatment groups were reported to have scratching at the time of vaccination. Small size injection swellings (2x2x1 cm) were reported in only two dogs in T2 during the 3-6 hours post first vaccination observation. The data indicate that the vaccine was safe and well-tolerated by the dogs.

All saline controls developed cough, indicating adequate challenge. The least square (LS) means for the duration of cough in the control group was 20.3. By contrast,

the vaccine significantly reduced the duration of cough to LS means of 5.2 in the vaccinates with p-value <.0001. Additionally, other respiratory clinical signs, such as retching and respiration, were reduced in the vaccinates when compared to the controls.

5 Post-challenge bacterial isolation data showed that the test vaccine significantly reduced the duration of nasal shedding of the challenge organism in the vaccinate group (LS mean of 20.5) when compared to the saline controls (LS mean of 25.3) with a p-value 0.0061. The data indicate that the vaccine is effective in reducing the level of infection, as confirmed by the reduced duration of shedding in the vaccinates.

10 The antibody responses generated post vaccination (Days 21 and 42) in the T2 group were similar to T1, likely due to the nature of the agglutinating antibody assay, and not lack of antigenicity. A robust anamnestic response was induced in the majority of vaccinates post-challenge at day 70 was observed (LS mean 426) compared to saline control (LS mean 13), indicating effective immunization.

15 Taken together, the data from this study clearly indicate that the *Bordetella bronchiseptica* bacterial extract, subunit vaccine demonstrated efficacy, by the reduced duration of cough and nasal shedding.

Example 2: Evaluation of the efficacy and safety of an injectable *Bordetella bronchiseptica* vaccine.

20 Fifty beagle dogs, at approximately 8 weeks of age, were enrolled in the study. The dogs were divided into 5 groups of 10 each. All animals were in good general health, and did not receive any *Bordetella* vaccinations. Prescreen serum samples were negative for *B. bronchiseptica*, with titers <16 by the Micro Agglutination Test (MAT) prior to first vaccination. All animals were determined free of *B. bronchiseptica*
25 by a bacterial nasal swab isolation test prior to first vaccination (Day 0).

Table 2. Study Design

Group	Investigational Veterinary Product (IVP)	N	Vaccination			Challenge		
			Volume mL	Study Days	Route	Study Day	Dose/Dose	Route
T01	Saline	10	1.0	0 and 21	SC	42	5.4x10 ⁸ CFU (colony forming unit)	Intranasal aerosolization in the chamber
T02	<i>B. bronchiseptica</i> bacterial extract / Pertactin (10µg) / QCDC	10	1.0	0 and 21	SC			
T03	Modified Commercial adjuvanted <i>B. bronchiseptica</i> extract vaccine	10	1.0	0 and 21	SC			
T04	Pertactin (10µg) / QCDC	10	1.0	0 and 21	SC			
T05	Commercial intranasal vaccine	10	0.5	0	IN			

Animals were vaccinated with the appropriate vaccine on Days 0 and 21, according to the study design shown in Table 2. The vaccines for groups T01, T02, T03, and T04 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. Group T05 received a single intranasal vaccination of a commercially-available intranasal vaccine on Day 0. This group was vaccinated last to prevent spread of live vaccine in the premises, and dogs in this group were housed separately in a different room to prevent exposure to other groups.

On Day 42, dogs from all treatment groups were challenged intranasally with *Bordetella bronchiseptica* by aerosolization in a Plexiglas chamber for a total of 30 minutes. Five dogs from the same pen (one from each treatment group) were challenged at a time.

The primary efficacy variable was cough; bacterial isolation was the secondary variable. Clinical observations for signs of respiratory disease, including cough, were performed twice daily ("observation periods"; a.m. and p.m.), for approximately 30

minutes in each room per each session, from Day 42 and until Day 62 and once (a.m.) on Day 63 (conclusion of the study). Prior to cough analysis, the percentage of observation periods coughed were transformed with an arcsine square root transformation. The transformed percentage of observation periods, and number of days with cough, were analyzed with a general linear mixed model. The percentage of observation periods post-challenge in which an animal coughs, and the number of days post-challenge with cough, were calculated for each animal.

Results: Mild to moderate swellings were observed at the injection sites in dogs of treatment group T02 and T04 (data not shown). The severity of the reactions and the number of dogs involved increased after the second vaccination. Mild injection site reactions were observed in a few dogs in treatment group T03. No measurable injections swelling were observed in the saline group T01. There was no clinical fever ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$) observed, except for one dog in Group T02 on Day 4 post-vaccination. There was no pain reported in any of the vaccinated dogs.

The *B. bronchiseptica* challenge inoculation induced cough in all unvaccinated controls (53.3% and 14.7 days coughed), indicating the challenge was adequate to evaluate the test vaccines. The results obtained for Group T05, which received the commercial intranasal vaccine (positive control), displayed 4.6% observed cough up to 2 days post challenge, suggesting that the level of challenge is optimum and not overwhelming.

Three test formulations were evaluated in this study. T02 had 16.1% observed cough up to 6 days post challenge, T03 had 34.7% observed cough up to 10.5 days post challenge and T04 had 34.5% observed cough up to 10.7 days post challenge. Accordingly, all vaccinated groups showed reduced cough scores when compared to the unvaccinated controls. Group T02 vaccinated with a *B. bronchiseptica* bacterial extract, spiked with pertactin and adjuvanted with QCDC, demonstrated a statistically significant reduction in the cough score criteria. Thus, the efficacy of the formulation tested in T02 appeared efficacious.

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 3. 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 3. 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
5 Days 0 to 7 and 21 to 35.

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
10 (a.m. and p.m.), approximately 30 minutes each session on Days 54 and 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
15 challenged intranasally with *B. bronchiseptica* by aerosolization in a Plexiglas 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
20 30 minutes in each room per each session, from Day 56 and until Day 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.

25 Blood samples (approximately 6 mL) for serology were collected on Day 77. 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
30 Days 0, 28, 55, and 77 were titrated for CRCoV antibodies by serum neutralization 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 days intervals. The *Bordetella* fraction was also shown to be efficacious when give 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 4. 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 4. Study Design

Treatment Group	Investigational Veterinary Product (IVP)	Adjuvant	N	Vaccination ¹	
				Study Days	Route
T01	CAV2/CPIV/CPV/L4	5% Rehydrgel	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 (tympanic) 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.

Results:

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.

5 Example 5. Duration of immunity study

A. Monovalent:

The purpose of this study is to demonstrate the duration of immunity of a *Bordetella bronchiseptica* extract-subunit vaccine in 8-week-old dogs against a virulent *B. bronchiseptica* challenge.

10 All animals are in good general health, and have not received any *Bordetella* vaccinations. Animals have low (≤ 16) or no antibody titers to *B. bronchiseptica* as determined by the Micro Agglutination Test (MAT) prior to first vaccination. All animals are also free of *B. bronchiseptica*, as determined by bacterial nasal swab isolation test prior to first vaccination.

15 Dogs are divided into 2 treatment groups; one group receives a placebo vaccine, and the other a *B. bronchiseptica* extract supplemented with a recombinant antigen. The antigen is pertactin, Bsp22, or both. Animals are vaccinated twice, approximately 3-4 weeks apart. They are observed for injection site reactions following each vaccination.

20 Approximately 6-12 months following vaccination, dogs from all treatment groups are challenged by aerosolization with *Bordetella bronchiseptica*. The challenge dose and purity of the challenge inoculum are determined before and after challenge. Clinical observations are performed leading up to and following challenge.

25 Nasal swabs for isolation of *B. bronchiseptica* are collected. Blood from each animal is collected for serum. Agglutinating antibodies to *B. bronchiseptica* are determined by the MAT. Serum samples are titrated for pertactin-specific IgG antibody response using ELISA. *B. bronchiseptica* isolation from nasal swabs is performed according to standard procedure.

Cough, *Bordetella* isolation (post-challenge), and post-vaccination serological response are criteria used to judge vaccine efficacy in the study.

B. Multivalent:

5 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.

10 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.

15 Approximately 6-12 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
20 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.

25 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.

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

CLAIMS

1. An immunogenic composition comprising *Bordetella bronchiseptica* and an isolated pertactin antigen.
- 5 2. The immunogenic composition of claim 1, wherein said pertactin antigen is a *Bordetella bronchiseptica* protein.
3. The immunogenic composition of claim 2, wherein said pertactin antigen is a recombinant p68 protein.
- 10 4. The immunogenic composition of any one of claims 1 to 3, wherein the *Bordetella bronchiseptica* is a bacterin or a bacterial extract.
- 15 5. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said composition is non-adjuvanted.
6. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said pertactin antigen is present at between about 1 µg and about 30 µg.
- 20 7. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said pertactin antigen is prepared by solubilizing pertactin inclusion bodies in urea and wherein the composition is substantially free of aggregates of pertactin antigens.
- 25 8. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein the pertactin antigen is lipidated.
9. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said composition further comprises a diluent or excipient for parenteral administration to a dog.
- 30

10. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said composition further comprises an isolated Bsp22 antigen, optionally lipidated.

11. The immunogenic composition of any one of the previous claims, wherein said composition further comprises an antigen from a canine respiratory pathogen selected from the group consisting of: canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus-2 (CAV-2), canine respiratory coronavirus (CRCoV), *Mycoplasma cynos* (*M. Cynos*) and canine influenza virus (CIV).

12. The immunogenic composition of claim 11, wherein said composition comprises at least two, three or four of the antigens from the canine respiratory pathogen.

13. The immunogenic composition of claim 11, wherein said composition comprises antigens from canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus-2 (CAV-2), canine respiratory coronavirus (CRCoV) and canine influenza virus (CIV).

14. An immunogenic composition comprising a plurality of recombinant p68 pertactin antigens, wherein said composition is substantially free of p68 aggregates.

15. The immunogenic composition of claim 14, wherein said plurality of recombinant p68 pertactin antigens are prepared by solubilizing pertactin inclusion bodies in urea and optionally purifying by column chromatography.

16. Use of the immunogenic composition of any one of the previous claims for treatment or prevention of infection from a canine respiratory pathogen in a dog.

17. The use of claim 16, wherein said composition prevents infection from said canine respiratory pathogen in said dog for a period of 6-months or more.

18. The use of claim 16 or 17, wherein the canine respiratory pathogen is *Bordetella bronchiseptica*.

19. The use of claim 18, wherein the canine respiratory pathogen further comprises at least one, two, three or four of: canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus-2 (CAV-2), canine respiratory coronavirus (CRCoV) and canine influenza virus (CIV).

- 5 20. The use of any one of claims 16-19, for treatment or prevention of canine infectious respiratory disease complex (CIRDC), wherein the composition treats or prevents infection from a plurality of said pathogens.

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/295 C07K14/235 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 C07K

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, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/082012 A1 (SHIELDS SHELLY L [US] ET AL) 12 April 2007 (2007-04-12) paragraph [0002] paragraph [0066] paragraph [0108] paragraph [0113]	11-13, 19,20
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	1-20
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 ----- -/--	1-20



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/IB2012/050512

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	1-20
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]	1-20
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	1-20
X	----- WO 01/90143 A2 (PASTEUR INSTITUT [FR]; GUIISO MACLOUF NICOLE [FR]; BOURSAUX EUDE CAROLI) 29 November 2001 (2001-11-29)	1-7,9, 14-18
Y	page 3, paragraph 3 page 16, paragraph 5 page 17, lines 12-14 claims 52,49	8,10-13, 19,20
A	----- US 2004/185062 A1 (DOMINOWSKI PAUL J [US] ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23) paragraph [0062] - paragraph [0065] paragraph [0067]	1-20
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	1-20
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	1-20
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050512

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 -----	10
Y	ERDILE LORNE F ET AL: "Role of attached lipid in immunogenicity of Borrelia burgdorferi OspA", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 61, no. 1, 1993, pages 81-90, XP009158475, ISSN: 0019-9567 abstract -----	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/050512

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/IB2012/050512

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 inmunógenas de *Bordetella bronchiseptica*

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la inmunología y, en particular, al
5 campo de las composiciones inmunógenas y de vacuna. Más específicamente,
la presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden una
preparación de *Bordetella bronchiseptica* en combinación con pertactina para el
tratamiento o la prevención de enfermedades respiratorias en perros.

10 Antecedentes de la invención

Bordetella bronchiseptica es una bacteria gramnegativa que coloniza las vías
respiratorias de los perros y provoca la traqueobronquitis o “tos de las
perreras”. Hawkins, E.C., Veterinary Internal Medicine (1995), págs. 767-811.
Bordetella bronchiseptica predispone a los perros a la influencia de otros
15 agentes respiratorios y, con frecuencia, existe de forma concurrente con ellos.
Hasta el momento se dispone de una serie de vacunas para el tratamiento de
la traqueobronquitis provocada por *Bordetella bronchiseptica*, incluidas
Nobivac®, Bronchi-Shield®, Bronchicine® CAe, Vanguard® B, Univac 2,
Recombitek® KC2, Naramune™-2 y Kennel-Jec™ 2.

20

Sin embargo, la mayoría de las vacunas comerciales existentes requieren
administraciones intranasales engorrosas, así como la adición de adyuvantes,
lo que puede dar lugar a efectos secundarios perjudiciales, tales como
quemazón e irritación. Viera Scheibner et al., *Nexus* Dic. 2000 (vol. 8, n.º 1).
25 Las vacunas intranasales gozan de escasa popularidad entre los veterinarios

debido a su riesgo personal con animales agitados durante la administración de la vacuna. Se han examinado vacunas de subunidades, tales como las que implican el uso de la proteína p68 de *Bordetella bronchiseptica* (pertactina), pero hasta el momento no se han incluido en ninguna vacuna canina comercial, 5 posiblemente debido a su insuficiente inmunogenicidad, reactividad y/o estabilidad de la formulación.

Bordetella bronchiseptica es un factor significativo en el complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CERI), que es una 10 enfermedad muy contagiosa común en perros alojados en condiciones de hacinamiento, tales como centros de acogida y residencias caninas o perreras de adiestramiento. La patogenia del CERI se considera multifactorial, al participar varios virus y bacterias. Los agentes infecciosos que se sabe que son agentes causantes del CERI incluyen, además de la bacteria *Bordetella* 15 *bronchiseptica* (Bemis et al., Lab. Anim. Sci., 29:48-52, 1977), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) (Erles et al., Virology, 310(2):216-223, 2003), el virus de la gripe canina (CIV) (Crawford et al., Science, 310(5747):482-485, 2005), el virus paragripal canino (CPIV) (Binn et al., Exp. Biol. Med., 126:140-145, 1967), *Mycoplasma cynos* (Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 20 2004) y el adenovirus canino de serotipo 2 (CAV-2) (Ditchfield et al., Can. Vet. J., 3:238-247, 1962). Hasta el momento no ha aparecido ninguna vacuna combinada integral contra la totalidad, o la mayoría, de los patógenos mencionados anteriormente.

25 En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de una composición

inmunógena que se pueda administrar por vía parenteral de forma segura a un perro, que proporcione una inmunoprotección de larga duración frente a *Bordetella bronchiseptica* sin efectos secundarios perjudiciales o interferencias con otros antígenos de una vacuna combinada o que ponga en riesgo al veterinario. La presente divulgación satisface estas y otras necesidades relacionadas.

Sumario de la invención

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende, entre otros, *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado. En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina es una proteína recombinante. En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina es de *Bordetella bronchiseptica*. En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina es p68. En otro modo de realización, dicha composición comprende además un antígeno Bsp22 aislado.

En otro modo de realización, el componente de *Bordetella bronchiseptica* es una vacuna bacteriana o un extracto bacteriano. En otro modo de realización, dicha composición no tiene adyuvantes. En otro modo de realización, dicha composición comprende además un adyuvante.

En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina está presente en entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 30 µg. Más en particular, dicha pertactina está presente en entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 20 µg, aún más en particular, en entre aproximadamente 7

μg y aproximadamente 15 μg , y todavía más en particular, en aproximadamente 5 μg , 10 μg , 15 μg o 20 μg . Preferentemente, dicho antígeno de pertactina se prepara solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna. Dichos
5 antígenos de pertactina son solubles y, preferentemente, están sustancialmente libres de agregados.

Otro modo de realización proporciona una composición inmunógena que comprende una pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes, en el
10 que dicha composición está sustancialmente libre de agregados de p68. Más en particular, dicha pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes se preparan solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna. La invención también proporciona procedimientos de preparación de antígenos de pertactina
15 p68 solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna.

En otro modo de realización, se formula dicha composición para su administración parenteral, de modo que comprende además un diluyente o
20 excipiente para su administración parenteral a un perro.

En otro modo de realización, dicha composición comprende además un antígeno de un patógeno respiratorio canino seleccionado del grupo que consiste en: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2),
25 el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

En un modo de realización más en particular, dicha composición comprende al menos dos, tres o cuatro de los antígenos de los patógenos respiratorios caninos.

- 5 En otro modo de realización, las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento no comprenden antígenos no respiratorios. Por tanto, un modo de realización de la invención proporciona una composición como se describe en el presente documento con la condición de que no incluya un antígeno no respiratorio. Los antígenos no respiratorios no provocan
- 10 enfermedades respiratorias en un sujeto. Ejemplos no limitantes de estos antígenos no respiratorios incluyen el virus de la rabia, el parvovirus canino, el coronavirus entérico canino, especies del género *Leptospira* y *Borrelia burgdorferi*.
- 15 En otro modo de realización, dicho antígeno es del coronavirus respiratorio canino (CRCoV). En otro modo de realización, dicho antígeno es del virus de la gripe canina (CIV). En otro modo de realización, dicho antígeno es del virus paragripal canino (CIV). En otro modo de realización, dicho antígeno es del adenovirus canino 2 (CAV-2). En otro modo de realización, dicho antígeno es
- 20 del virus paragripal canino (CPIV) y del adenovirus canino 2 (CAV-2).

En otro modo de realización, dicha composición comprende antígenos del virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

En otro modo de realización, la composición induce una respuesta inmunitaria frente a *Bordetella bronchiseptica* y al menos uno del virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

5

Otro modo de realización de la invención proporciona una composición inmunógena que comprende el coronavirus respiratorio canino (CRCoV), una preparación de *Bordetella bronchiseptica* y el virus de la gripe canina (CIV). Más en particular, dicha composición comprende un antígeno de pertactina

10 aislado.

Otro modo de realización de la presente invención proporciona un procedimiento o uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los modos de realización anteriores para el tratamiento o la prevención de la
15 infección por un patógeno respiratorio canino en un perro. En otro modo de realización, dicha composición evita la infección por dicho patógeno respiratorio canino en dicho perro durante un periodo de 6 meses o más. En otro modo de realización, dicha composición evita la infección por dicho patógeno respiratorio canino en dicho perro durante un periodo de aproximadamente 1 año.

20

En otro modo de realización, el patógeno respiratorio canino es *Bordetella bronchiseptica*. En otro modo de realización, el patógeno respiratorio canino comprende además al menos uno, dos, tres o cuatro de: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio
25 canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

Otro modo de realización de la presente invención proporciona un procedimiento o uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los modos de realización anteriores para el tratamiento o la prevención del complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CERI), en el que la composición trata o evita la infección por una pluralidad de patógenos respiratorios caninos. Otro modo de realización proporciona el uso o procedimiento de administración por vía parenteral de una composición inmunógena como se describe en el presente documento.

10

Otro modo de realización proporciona la fabricación de un medicamento que comprende la composición inmunógena para el tratamiento o la prevención de la infección por un patógeno respiratorio canino en un perro.

15 Estos y otros modos de realización, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas descritas más adelante en el presente documento. Se entiende que todos los modos de realización anteriores y siguientes se pueden combinar en un único modo de realización.

20

Descripción detallada de la invención

Las definiciones que figuran a continuación se aplican a la presente divulgación. Reemplazan cualquier definición contradictoria contenida en las referencias individuales incorporadas en el presente documento por referencia.

25 Las palabras no definidas tienen el significado usado comúnmente por un

experto en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular.

- 5 “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 se encuentren dentro del error experimental del valor indicado (p. ej., 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”
10 con referencia a intervalos de tiempo 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.

Tal como se usa en el presente documento, “adyuvante” se refiere a cualquier
15 sustancia que sirva como estimulador inespecífico de la respuesta inmunitaria. Para una descripción más detallada de los adyuvantes, véase más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, el término “animal” incluye cualquier animal sensible a infecciones por *Bordetella bronchiseptica* y/o al
20 complejo de enfermedades respiratorias caninas, incluidos mamíferos tanto domesticados como salvajes. Preferentemente, tal como se usa en el presente documento, animal se refiere a un perro o un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, “anticuerpo” es cualquier
25 polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno, independientemente

del origen, el 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 consecuencia de una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas séricas

5 compuestas de cadenas polipeptídicas “ligeras” y “pesadas” que tienen regiones “constantes” y “variables” y que se dividen en clases (p. ej., 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 unen un antígeno específico de forma

10 exclusiva. El término incluye, pero sin limitación: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio

15 único, un anticuerpo de dominio suprimido, una proteína de fusión, una proteína de fusión ScFc, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo sintético, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo híbrido, un anticuerpo mutado y anticuerpos con injertos de CDR. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas obtenidas de fuentes

20 naturales o de fuentes recombinantes, o pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Se puede convertir un “anticuerpo” en 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 monocatenario (ScFv), un fragmento Fd, un

25 fragmento dAb, diacuerpos, un péptido de CDR3, un péptido de FR3-CDR3-

FR4 restringido, un nanocuerpo, un nanocuerpo bivalente, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP) y un minicuerpo y cualquiera de los fragmentos mencionados anteriormente y sus equivalentes modificados química o genéticamente, así como otros fragmentos de anticuerpos que
5 mantengan la función de unión a antígeno. Normalmente, estos fragmentos comprenderán un dominio de unión a antígeno. Como conocerán los expertos en la técnica, se puede manipular (por ejemplo, con líneas germinales) cualquiera de estas moléculas para reducir su inmunogenicidad, aumentar su afinidad, modificar su especificidad o con otros fines.

10

Tal como se usa en el presente documento, “antígeno” o “inmunógeno” 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 “epítomo” es el
15 sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocitos T o anticuerpo específico y, normalmente, comprende de aproximadamente 3 residuos de aminoácido a aproximadamente 20 residuos de aminoácido. El término antígeno se refiere a antígenos de subunidad (antígenos discretos e independientes de un organismo completo con el que al antígeno está asociado
20 en la naturaleza), así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. El término antígeno también se refiere a anticuerpos, tales como anticuerpos antiidiotípicos o fragmentos de los mismos, y a mimótopos peptídicos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico (epítomo). El término “antígeno” se refiere también a un
25 oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante

antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de inmunización de ADN.

Tal como se usa en el presente documento, “antigenicidad” se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido de unirse inmunoespecíficamente a un
5 anticuerpo obtenido frente a la proteína o polipéptido.

El término “*Bordetella bronchiseptica*” o “*B. bronchiseptica*” se refiere a: una bacteria *Bordetella bronchiseptica* viva atenuada, un extracto de célula completa muerta (vacuna bacteriana) de *Bordetella bronchiseptica* o un
10 extracto celular bacteriano de *Bordetella bronchiseptica*.

“Tampón” significa un sistema químico que evita que cambie la concentración de otra sustancia química. Los sistemas donadores y aceptores de protones funcionan como tampones, evitando cambios pronunciados de la
15 concentraciones de iones de hidrógeno (pH). Otro ejemplo de un tampón es una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada) o una base débil y su sal (ácido conjugado).

Tal como se usa en el presente documento, “canino” incluye lo que
20 comúnmente se denomina perro, pero incluye otros miembros de la familia *Canidae*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “línea celular” o “célula huésped” significa una célula procariota o eucariota en la que se puede replicar
25 y/o mantener un virus.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cultivo” significa una población de células o microorganismos que crecen en ausencia de otros tipos o especies.

5

“Dosis” se refiere a una vacuna o composición inmunógena dada a un sujeto. Una “primera dosis” o “dosis de sensibilización” se refiere a la dosis de dicha composición administrada en el día 0. Una “segunda dosis” o una “tercera dosis” o una “dosis anual” se refiere a una cantidad de dicha composición dada
10 después de la primera dosis, que puede ser, aunque no lo es necesariamente, la misma vacuna o composición inmunógena de la primera dosis.

Un “epítopo” es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocitos T o anticuerpo específico y, normalmente, comprende de desde
15 aproximadamente 3 residuos de aminoácido hasta aproximadamente 20 residuos de aminoácido.

Tal como se usa en el presente documento, “excipiente” se refiere a un componente de vehículo de una vacuna o composición inmunógena no reactivo
20 que no es un antígeno. Son excipientes preferentes aquellos conocidos en la técnica para inyección parenteral.

“Fragmento” se refiere a una parte truncada de una proteína o gen. “Fragmento funcional” y “fragmento biológicamente activo” se refieren a un fragmento que
25 mantiene las propiedades biológicas del gen o la proteína de longitud completa.

“Homología” o “porcentaje de homología” se refiere al porcentaje de nucleótidos o residuos de aminoácido de la secuencia candidata que son idénticos o similares a los residuos de la(s) secuencia(s) de comparación
5 después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y considerando también parte de la identidad de secuencia cualquier sustitución conservadora.

“Homólogos” u “homólogos de especie” incluyen genes que se encuentran en
10 dos o más especies diferentes que poseen una homología de secuencia polinucleotídica 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 rigurosas, como las descritas en el presente documento, por ejemplo, y poseen
15 las mismas 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 aproximadamente el 80 % de homología de secuencia, más de
20 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 aproximadamente el 98 % de homología de secuencia o más de
25 aproximadamente el 99 % de homología de secuencia.

“Identidad” o “porcentaje de identidad” se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos de la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de la secuencia de comparación después de alinear ambas secuencias e introducir
5 huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar parte de la identidad de secuencia cualquier sustitución conservadora.

Tal como se usa en el presente documento, “respuesta inmunitaria” en un
10 sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o una respuesta inmunitaria humoral y celular frente a un antígeno. Una “respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una que está mediada, al menos en parte, por anticuerpos. Una “respuesta inmunitaria celular” es una mediada por linfocitos T u otros leucocitos o ambos, e incluye la
15 producción de citocinas, quimiocinas y moléculas similares producidas por linfocitos T activados, leucocitos, o ambos. Las respuestas inmunitarias se pueden determinar usando inmunoensayos ordinarios y ensayos de neutralización conocidos en la técnica.

20 Tal como se usa en el presente documento, “inmunogenicidad” se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido de desencadenar una respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra una bacteria o virus que provoca la enfermedad identificada.

25 Una “composición inmunógena” es una preparación que contiene un

inmuógeno, incluidos, p. ej., una proteína, un péptido, una célula completa, virus inactivados, subunidades o atenuados, o un polisacárido, o una combinación de los mismos, administrada para estimular los sistemas inmunitarios humoral y celular del receptor frente a uno o más de los antígenos
5 presentes de la composición inmunógena. La “inmunización” es el procedimiento de administrar una composición inmunógena y estimular una respuesta inmunitaria o inmunogénica frente a un antígeno en un huésped. Son huéspedes preferentes los mamíferos, tales como los perros. Preferentemente, la composición inmunógena es una vacuna.

10

Tal como se usa en el presente documento, “cantidad inmunológicamente protectora” es una cantidad de un antígeno eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor que sea adecuada para evitar o mejorar los signos o síntomas de la enfermedad, incluidos efectos adversos para la salud o
15 complicaciones de los mismos. Se puede inducir inmunidad humoral o mediada por células o ambas. Se puede evaluar la respuesta inmunogénica de un animal frente a una composición, p. ej., indirectamente a través de la medida de valores de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del seguimiento de signos y síntomas después de la
20 exposición a la cepa natural. Se puede evaluar la inmunidad protectora conferida por una composición o vacuna midiendo, p. ej., la reducción de la presencia de microorganismos inmunógenos y/o la reducción de los signos clínicos, tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, salud y comportamiento del sujeto. La respuesta inmunitaria puede
25 comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La

cantidad de una composición o vacuna terapéuticamente eficaz puede variar en función del microorganismo en particular usado o de la afección del animal que se trata o vacuna, y la puede determinar un veterinario.

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

10

- El término “aislado” se refiere a una sustancia que está en forma sustancialmente pura, por ejemplo, más de aproximadamente el 95 % de pureza; o purificada o enriquecida de algún modo a partir de su entorno natural. La referencia a la “pertactina aislada” indica una proteína pertactina retirada de su entorno natural, tal como de un animal/perro huésped, en un medio de cultivo, o purificada a partir de una preparación de células completas de *Bordetella bronchiseptica* y que posteriormente se puede añadir de nuevo a la composición que comprende extracto de *Bordetella bronchiseptica* (es decir, a la que se han añadido aislados de pertactina). El término “aislado” engloba
- 15 su entorno natural, tal como de un animal/perro huésped, en un medio de cultivo, o purificada a partir de una preparación de células completas de *Bordetella bronchiseptica* y que posteriormente se puede añadir de nuevo a la composición que comprende extracto de *Bordetella bronchiseptica* (es decir, a la que se han añadido aislados de pertactina). El término “aislado” engloba
- 20 inmunógenos que están en solución con otros agentes/diluyentes/excipientes/adyuvantes/proteínas.

- “Medicamento” se refiere a cualquier agente útil en la prevención, la cura o la mejora de una afección médica, o la prevención de algunas manifestaciones o
- 25 afecciones fisiológicas.

Tal como se usa en el presente documento, “anticuerpo monoclonal” se refiere a anticuerpos producidos por una única línea de células de hibridoma, todos dirigidos contra un epítipo sobre un antígeno en particular. Se puede proporcionar el antígeno usado para preparar el anticuerpo monoclonal como

5 una proteína aislada del patógeno o como el patógeno completo. Un “hibridoma” es una línea celular clonal que consiste en células híbridas formadas por la fusión de una línea de mieloma y una célula productora de anticuerpos específica. En general, los anticuerpos monoclonales son de origen murino. No obstante, anticuerpo monoclonal también se refiere a una población

10 clonal de un anticuerpo preparada contra un epítipo en particular de un antígeno producido por tecnología de presentación en fagos, o un procedimiento que sea equivalente a la presentación en fagos, o células híbridas de origen no murino.

15 Tal como se usa en el presente documento, administración “oral” o “peroral” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través de o por medio de la boca, e implica la deglución o el transporte de la sustancia a través de la mucosa oral (p. ej., absorción sublingual o bucal) o ambos. La vía intratraqueal también es

20 un medio de administración oral o peroral.

Tal como se usa en el presente documento, administración “oronasal” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una composición o vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través de o por medio de la nariz y la boca, como se

25 produciría, por ejemplo, al colocar una o más gotitas en la nariz. La

administración oronasal implica procesos de transporte asociados con la administración oral e intranasal.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “patógeno” o “microorganismo patógeno” significa un microorganismo (por ejemplo, CPIV, CAV-2, CRCoV, *Mycoplasma cynos*, CIV o *Bordetella bronchiseptica*) que es capaz de inducir o provocar una enfermedad, síndrome o estado anómalo en el animal que lo alberga, preferentemente una enfermedad respiratoria, tal como el CERL.

Tal como se usa en el presente documento, “pertactina” se refiere a una proteína de la membrana externa de las bordetelas. Preferentemente, la pertactina es de *B. bronchiseptica* y lo más preferentemente, es “p68” y está codificada por el gen *prnA*. La pertactina se puede aislar en su forma nativa a partir de *Bordetella bronchiseptica*, o se puede producir de forma recombinante. En la patente de EE. UU. N.º 7.736.658, cuyo contenido se incorpora en el

presente documento por referencia, se proporcionan secuencias y ejemplos de pertactina. El antígeno de pertactina usado en el presente documento incluye formas lipidadas de la proteína.

- 5 “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a sustancias que, en el ámbito del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, conmensuradas con una proporción razonable de beneficio y riesgo y eficaces para su uso pretendido.

10

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

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

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” significa

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

Tal como se usa en el presente documento, “evitar la infección” significa evitar
5 o inhibir la replicación de las bacterias o virus que provocan la enfermedad
identificada, inhibir la transmisión de las bacterias o virus, evitar que las
bacterias o virus se establezcan en su huésped o aliviar los síntomas de la
enfermedad provocados por la infección. El tratamiento se considera
terapéutico si hay una reducción de la carga bacteriana o vírica.

10

Tal como se usa en el presente documento, “protección”, “proteger”,
“inmunidad protectora” y similares con respecto a una vacuna u otra
composición, significa que la vacuna o composición evita o reduce los síntomas
de la enfermedad provocada por el microorganismo del que deriva(n) el/los
15 antígeno(s) usado(s) en la vacuna o composición. Los términos “protección”,
“proteger” y similares, también significan que se puede usar la vacuna o
composición para “tratar” la enfermedad, o uno o más síntomas de la
enfermedad, que ya existe en un sujeto.

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

por lo tanto, es diferente de la administración intranasal o la peroral.

Los términos “unión específica”, “se une específicamente” y similares, se definen como dos o más moléculas que forman un complejo que se puede
5 medir bajo condiciones de ensayo o fisiológicas y es selectivo. Se dice que un anticuerpo u otro inhibidor “se une específicamente” a una proteína si, bajo condiciones apropiadamente seleccionadas, tal unión no se inhibe sustancialmente, mientras que al mismo tiempo se inhibe la unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es
10 selectiva para el compuesto o la proteína. La unión no específica normalmente tiene baja afinidad. La unión de anticuerpos IgG, por ejemplo, se caracteriza por lo general por una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o mayor, tal como al menos aproximadamente 10^{-8} M o mayor, o la menos aproximadamente 10^{-9} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-10} o mayor,
15 o al menos aproximadamente 10^{-11} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor. El término también es aplicable, p. ej., cuando un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo en particular que no cuenta con numerosos antígenos portadores, en cuyo caso, por lo general, el anticuerpo portador del dominio de unión a antígeno no se unirá a otros antígenos.

20

Tal como se usa en el presente documento, “fragmento inmunógeno específico” se refiere a una parte de una secuencia reconocible por un anticuerpo o linfocito T específico para esa secuencia.

25 Tal como se usa en el presente documento, “sujeto” se refiere a cualquier

animal que tenga un sistema inmunitario, lo que incluye mamíferos, tales como perros.

Tal como se usa en el presente documento, “sustancialmente idénticas” se
5 refiere a un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 %.

10 Tal como se usa en el presente documento, “vacuna de subunidades” y “composición de subunidades” se refiere a un tipo de vacuna o composición que incluye antígenos (pero no todos los antígenos) derivados de u homólogos a, antígenos de un patógeno de interés, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Una composición o vacuna de este tipo está sustancialmente libre de
15 células de patógeno o partículas patógenas intactas o del lisado de dichas células o partículas. Por tanto, se puede preparar una vacuna de subunidades o composición de subunidades a partir de polipéptidos inmunógenos al menos parcialmente purificados o sustancialmente purificados a partir del patógeno o sus análogos. Los procedimientos de obtención de un antígeno o antígenos de
20 la vacuna de subunidades o composición de subunidades incluyen técnicas ordinarias de purificación, producción recombinante o síntesis química. Por tanto, una “vacuna de subunidades” o “composición de subunidades” se refiere a una vacuna o composición que consiste en un componente o componentes antigénicos definidos de un virus, bacteria u otro inmunógeno.
25 Preferentemente, el componente de subunidad de la presente invención se

produce de forma recombinante y lo más preferentemente es pertactina (p68).

“TCID₅₀” se refiere a la “dosis infectiva en cultivo tisular” y se define como la dilución de un virus necesaria para infectar el 50 % de un lote dado de cultivos
5 celulares inoculados. Se pueden usar diversos procedimientos para calcular la TCID₅₀, incluido el procedimiento de Spearman-Karber, que se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva. Para una descripción del procedimiento de Spearman-Karber, véase B. W. Mahy y H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

10

Tal como se usa en el presente documento, “agente terapéutico” 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, enfermedad o afección vírica, bacteriana, parasitaria o fúngica
15 originada de este modo.

Tal como se usa en el presente documento, “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna o composición que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto (p. ej., perro) que recibe el antígeno o
20 vacuna o composición, que es adecuada para evitar o mejorar signos o síntomas de enfermedad, incluidos efectos adversos para la salud o complicaciones de los mismos, provocados por una infección con un patógeno, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Se puede inducir inmunidad humoral o inmunidad mediada por células, o tanto inmunidad humoral como
25 inducida por células. Se puede evaluar la respuesta inmunogénica de un

animal frente a un antígeno, vacuna o composición indirectamente a través de la medida de valores de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del seguimiento de signos y síntomas después de la exposición a la cepa natural. Se puede evaluar la inmunidad protectora

5 conferida por una vacuna o composición midiendo la reducción de la presencia de microorganismos inmunógenos y/o la reducción de los signos clínicos, tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, salud y comportamiento del sujeto. La cantidad de una vacuna o composición que es terapéuticamente eficaz puede variar en función del inmunógeno en particular

10 usado o de la afección del sujeto, y la puede determinar un experto en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, “tratar” o “que trata” se refiere a invertir, aliviar, inhibir la progresión de, o evitar un trastorno, afección o

15 enfermedad al que se aplica tal término, o evitar uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere al acto de “tratar”, como se define justo anteriormente.

20

Tal como se usa en el presente documento, “vacuna” o “composición de vacuna” se refiere a una composición inmunógena seleccionada de entre virus o bacterias, modificados vivos, atenuados o muertos, o una vacuna de subunidades o cualquier combinación de lo mencionado anteriormente. La

25 administración de la vacuna a un sujeto da lugar a una respuesta inmunitaria.

La vacuna se puede introducir directamente en el sujeto por cualquier vía de administración conocida, incluidas las vías parenteral, peroral y similares. Los términos significan una composición que evita o reduce una infección, o que evita o reduce uno o más signos o síntomas de infección. Normalmente, los efectos protectores de una composición de vacuna contra un patógeno se logran induciendo en el sujeto una respuesta inmunitaria. En general, la supresión o reducción de la incidencia de infección, la mejora de los signos o síntomas, o la eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicativos de los efectos protectores de una composición de vacuna. Las composiciones de vacuna de la presente invención proporcionan efectos protectores contra infecciones provocadas por patógenos de enfermedades respiratorias caninas.

Tal como se usa en el presente documento, “veterinariamente aceptable” se refiere a sustancias que, en el ámbito del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de animales sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, conmensuradas con una proporción razonable de beneficio y riesgo, y eficaces para su uso pretendido.

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

25 Antígenos, composiciones inmunógenas y vacunas

La presente divulgación se basa en el descubrimiento inesperado de que la inclusión de antígenos de pertactina aislados junto con una preparación de *Bordetella bronchiseptica* da lugar a mejora sustancial de la eficacia y la seguridad. Es decir, cuando se administra por vía parenteral a un perro antes
5 de la exposición bacteriana, la composición evita la aparición de la traqueobronquitis y no da lugar a efectos secundarios adversos.

La presente invención también proporciona composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden uno o más virus y bacterias o subunidades que son
10 adecuados para su administración a un cánido para el tratamiento contra el CERL. El coronavirus respiratorio canino (CRCoV) que engloba la presente invención se puede caracterizar como un coronavirus presente en las vías respiratorias de perros con enfermedades respiratorias infecciosas. En el plano filogenético, el CRCoV guarda una estrecha relación con el coronavirus bovino
15 (BCoV), el coronavirus humano (HCoV) cepa OC43 y el virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante (HEV); el coronavirus canino entérico (CCoV) solo guarda una relación lejana con el CRCoV. Un ejemplo representativo de un CRCoV adecuado para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada como CRCoV cepa 4182 (Erles et al., Virus Res., 124:78-87, 2007).

20

Los antígenos de la gripe que engloba la presente invención pueden ser cualquier cepa de virus de la gripe identificada, de cualquier ave o mamífero, incluidos, pero sin limitación, el virus de la gripe con el subtipo H3 de hemaglutinina y el subtipo N8 de neuraminidasa, o el subtipo H3N8,
25 denominado más comúnmente virus H3N8. La gripe puede ser de origen

mamífero o aviar, incluidos, pero sin limitación, los orígenes porcino, equino o canino. En un modo de realización se usa un antígeno de gripe canina. En un modo de realización se usa un antígeno de gripe equina. En un modo de realización, se usa una cepa con los subtipos de glucoproteínas denominados

5 H3 o N8. En un modo de realización, se usa una cepa que tiene tanto el subtipo de glucoproteína H3 como el N8.

Los antígenos de gripe que engloba la presente invención se pueden aislar a partir de perros, caballos, cerdos y aves, tanto domésticos como salvajes. Los

10 animales escogidos para la toma de muestras deberán presentar síndromes clínicos agudos y/o subagudos, que pueden incluir síntomas respiratorios de leves a graves y fiebre. Los animales también pueden mostrar signos de anorexia y letargo. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos de aislamiento de virus, que incluyen: inocular cultivos celulares de mamíferos

15 o aves, inocular huevos embrionados con muestras de moco nasal o faríngeo de especímenes clínicos, recogida pasando un bastoncillo de algodón por las fosas nasales o la garganta, o recogida de tejidos tales como el bazo, el pulmón, las amígdalas y lavado hepático y pulmonar. Se puede observar el efecto citopático del virus en el cultivo celular. Se puede probar la capacidad

20 del líquido alantoideo o los lisados celulares para aglutinar eritrocitos humanos, de pollo, pavo o cobaya, presuntas pruebas de la presencia de un virus de la gripe.

Un ejemplo representativo de una cepa del virus de la gripe canina (CIV)

25 adecuada para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada

como A/canine/Iowa/9A1/B5/08/D12, que se depositó como PTA-7694 el 29 de junio de 2006 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Una cepa representativa de antígeno del CIV es la cepa del virus CIV de la vacuna comercial Vanguard® CIV (Pfizer). La presente invención también engloba vacunas que comprenden una cepa identificada como cepa de gripe equina A/Equine/2/Miami/1/63. Esta cepa está depositada en la ATCC con el número de acceso VR 317. Son ejemplos adicionales de virus de la gripe para su uso en la presente invención A/canine/Iowa/13628/2005, A/Equine/Kentucky/1998, A/Equine/Kentucky/15/2002, A/Equine/Ohio/1/2003, A/Equine/Kentucky/1/1994, A/Equine/Massachusetts/213/2003, A/Equine/Wisconsin/2003, A/Equine/NewYork/1999 y A/Equine/Newmarket/A2/1993. Otras cepas y/o aislados preferentes del CIV incluyen los divulgados en las patentes de EE. UU. n.º 7.959.929 (en particular las cepas y secuencias de HA identificadas en ella como Jacksonville/2005, Miami/2005, FL/242/03 y Florida/43/04), 7.384.642, 7.572.620 y 7.468.187, cuyos contenidos, incluidas todas las secuencias, en particular las secuencias de HA, y cepas, se incorporan en el presente documento por referencia como si se describieran en su totalidad en el presente documento. Adicionalmente, una cepa del CIV adecuada para su uso en el presente documento incluye el aislado del CIV Colorado descrito en Barrell et al., J. Vet. Intern. Med., 24 (6), 1524-1527 (2010), con número de acceso ADW41784.

El virus paragripal canino (CPIV) que engloba la presente invención se puede caracterizar como uno de los virus que se sabe que son un agente causante

asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa de antígeno del CPIV es la cepa del virus CPI atenuado de la vacuna comercial Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Otra cepa representativa de antígeno del CPIV es la cepa del CPI atenuado que tiene la denominación "NL-CPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

El adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2) englobado por la presente invención se puede caracterizar como uno de los virus de los que también se sabe que son un agente causante asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa de antígeno del CAV-2 es la cepa del virus CAV-2 atenuado de la vacuna comercial Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Una cepa representativa de antígeno del CAV-2 es la cepa del CAV-2 atenuado denominada la cepa "Manhattan" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

El *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) que engloba la presente invención se describe en Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004 y es la única especie de micoplasma asociada comúnmente con enfermedades respiratorias. Se describen composiciones inmunógenas contra *M. cynos* en el documento US 2007/0098739, incorporado en el presente documento por referencia.

20

El componente de *Bordetella bronchiseptica* que engloba la presente invención se puede caracterizar como el agente causante bacteriano asociado con la tos de las perreras. Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden ser una o más de: una *Bordetella bronchiseptica* viva atenuada, una vacuna bacteriana de *Bordetella bronchiseptica* o un

25

extracto bacteriano. Adicionalmente, la composición también incluye, preferentemente, un antígeno de subunidad aislado de *Bordetella bronchiseptica*.

- 5 En un modo de realización se prepara la *Bordetella bronchiseptica* como un sonificado de células completas purificado por cromatografía en columna como se establece en la solicitud de patente n.º 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
- 10 de material antigénico extraído de células de *Bordetella bronchiseptica*. Otro ejemplo de *Bordetella bronchiseptica* es la cepa de *bronchiseptica* B-C2 viva atenuada presente en Nobivac® y/o la cepa de *bronchiseptica* viva de Intra-Trac®, Bronchi-Shield®, Naramune™, Recombitek®, Univac y/o Kennel-Jec™.
- 15 Adicionalmente, también está presente, preferentemente, una subunidad (es decir, complementada), en combinación con el componente de *Bordetella bronchiseptica*. Un ejemplo representativo de la subunidad es un antígeno de pertactina aislado, preferentemente, un antígeno de *Bordetella bronchiseptica* p68, en particular el antígeno de *Bordetella bronchiseptica* p68 recombinante
- 20 que reconoce el anticuerpo monoclonal específico de p68 Bord 2-7 (descrito en el documento US 7.736.658, incorporado en el presente documento por referencia) y en un modo de realización preferente, tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en el documento US 7.736.658 o tiene homología con ella.

Preferentemente, el antígeno de pertactina p68 recombinante se prepara en forma soluble, de modo que durante el procesamiento se conserva o se restablece la estructura nativa. En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona una pertactina p68 recombinante que está sustancialmente libre de
5 agregados (menos de aproximadamente el 80 %, el 90 %, el 95 % o incluso el 99 %). En otro modo de realización se solubiliza la pertactina p68 recombinante 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, se puede purificar el antígeno p68, tal como a través de cromatografía en columna. Se describe un procedimiento de
10 solubilización de este tipo en Surinder *et al.*, J. Bioscience and Bioengineering, v. 99(4), págs 303-310 (2005).

Los antígenos de pertactina usados en el presente documento también incluyen formas lipidadas. Se proporcionan ejemplos de producción de
15 proteínas lipidadas en Erdile et al., Infection and Immunity, (1993) v. 61(1) págs. 81-90, incorporado por referencia. Los procedimientos divulgados en él se pueden usar para preparar proteínas de pertactina con modificaciones postraduccionales que contienen un resto lipídico unido.

20 Además, en otro modo de realización, una composición inmunógena comprende *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno Bsp22 aislado. En otro modo de realización, la composición inmunógena comprende *Bordetella bronchiseptica*, un antígeno de pertactina aislado y comprende además un antígeno Bsp22 aislado. Se puede preparar el antígeno Bsp22 como se
25 establece en Medhekar et al., Molecular Microbiology (2009) 71(2), 492–504.

Preferentemente, el antígeno Bsp22 aislado está presente junto con (es decir, añadido a) un extracto de *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado, específicamente p68 recombinante. "Bsp22" también incluye formas lipidadas del antígeno. Se proporcionan ejemplos de producción de proteínas lipidadas en Erdile et al., *Infection and Immunity*, (1993) v. 61(1) págs. 81-90, incorporado por referencia. Los procedimientos divulgados en él se pueden usar para preparar proteínas Bsp22 con modificaciones postraduccionales que contienen un resto lipídico unido.

- 10 Los virus que engloba la presente invención se pueden propagar en células, líneas celulares y células huésped. Dichas células, líneas celulares o células huésped pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, células de mamíferos y células que no son de mamíferos, incluidas células de insectos y células vegetales. Las células, líneas celulares y células huésped en las que se
- 15 pueden propagar los virus que engloba la presente invención se conocen fácilmente y son fácilmente accesibles para los expertos en la técnica.

Las bacterias que engloba la presente invención se pueden cultivar y propagar usando diversos medios de cultivo conocidos por los expertos en la técnica,

20 incluidos tanto medios de cultivo de caldo (líquidos) como de agar (sólidos; semisólidos). Algunas bacterias también se pueden cultivar y propagar en células de mamíferos o células que no son de mamíferos.

Los virus y bacterias que engloba la presente invención se pueden atenuar o

25 inactivar antes de su uso en una composición inmunógena o vacuna. Los

expertos en la técnica conocen bien los procedimientos de atenuación e inactivación. Los procedimientos de atenuación incluyen, pero sin limitación, paso en serie en cultivo celular en una línea celular adecuada (virus y algunas bacterias), paso en serie en caldo de cultivo (bacterias), irradiación ultravioleta
5 (virus y bacterias) y mutagénesis química (virus y bacterias). Los procedimientos para la inactivación vírica o bacteriana incluyen, pero sin limitación, el tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL) o etilenimina binaria (BEI), u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

- 10 La inactivación por formalina se puede realizar mezclando la suspensión que contiene el microorganismo con formaldehído al 37 % hasta una concentración final de formaldehído del 0,5 %. La mezcla de microorganismo-formaldehído se mezcla por agitación constante durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de microorganismo inactivada se prueba
15 después para determinar los microorganismos vivos residuales realizando un ensayo del crecimiento en una línea celular o un medio de cultivo adecuados.

Para algunos antígenos, se puede realizar la inactivación por BEI mezclando la suspensión que contiene el microorganismo de la presente invención con BEI
20 (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) 0,1 M hasta una concentración final de BEI de 1 mM. Para otros antígenos, la concentración final de BEI es de 2 mM. Un experto en la técnica conocerá la concentración apropiada que se debe usar. La mezcla de virus-BEI se mezcla por agitación constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de
25 tiosulfato de sodio 1,0 M hasta una concentración final de 0,1 mM. Se continúa

mezclando durante dos horas más. La mezcla que contiene el microorganismo inactivado se prueba para determinar el virus vivo residual realizando un ensayo del crecimiento en una línea celular o un medio de cultivo adecuados.

- 5 Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden incluir uno o más vehículos veterinariamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo veterinariamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, 10 agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros conocidos por los expertos en la técnica. Los estabilizantes incluyen albúmina, 15 entre otros conocidos por el experto en la técnica. Los conservantes incluyen mertiolato, entre otros conocidos por el experto en la técnica.

- El adyuvante puede ser metabolizable, en referencia a adyuvantes que consisten en componentes que puede metabolizar la especie objetivo tales 20 como adyuvantes a base de aceite vegetal. Un adyuvante metabolizable puede ser un aceite metabolizable. Los aceites metabolizables son grasas y aceites presentes normalmente en plantas y animales, y habitualmente consisten en gran medida en mezclas de triacilglicérols, también conocidos como triglicéridos o grasas neutras. Estas sustancias apolares, insolubles en agua, 25 son triésteres de ácidos grasos de glicerol. Los triacilglicérols difieren en

función de la identidad y ubicación de sus tres residuos de ácido graso o cadenas laterales.

El adyuvante también puede ser no metabolizable, en referencia a adyuvantes
5 que consisten en componentes que no puede metabolizar el organismo 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 correspondientes ácidos y alcoholes, los
éteres y ésteres de los mismos, y mezclas de los mismos. Preferentemente, los
10 compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburo ligeros, es
decir, estos compuestos tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite se
puede preparar por síntesis o purificar a partir de productos del petróleo. Los
aceites no metabolizables preferentes para su uso en las composiciones
descritas en el presente documento incluyen aceite mineral, queroseno y
15 cicloparafinas, por ejemplo. El término “aceite mineral” se refiere a un aceite
adyuvante no metabolizable que es una mezcla de hidrocarburos líquidos
obtenida a partir de vaselina por medio de una técnica de destilación. El
término es sinónimo de “vaselina licuada”, “vaselina líquida” y “vaselina filante”.
También se pretende que el término incluya “aceite de vaselina fluido”, es decir,
20 un aceite que se obtiene de manera similar por destilación de la vaselina, pero
que tiene una densidad ligeramente inferior que la vaselina filante. El aceite
mineral se puede obtener de diversas fuentes comerciales, por ejemplo, J.T.
Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite de
vaselina fluido está disponible en el mercado con el nombre DRAKEOL®.

Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, el sistema adyuvante Emulsigen (MVP Laboratories; Ralston, NE), el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, p. ej., los adyuvantes de

5 Freund completo e incompleto, copolímeros de 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 lípido-amina Avridine, enterotoxina

10 termolábil de *E. coli* (recombinante u otra), toxina del cólera, muramil dipéptido, copolímero de bloque /tensioactivo de escualeno/plurónico (SP-oil), sulfolipobeta-ciclodextrina (SL-CD), liposomas que contienen un inmunomodulador (p. ej., CpG o poly I:C), muramil dipéptido (MDP), iscomatrix (Quil A/fosfatidilcolina), CpG/DEAE-dextrano/aceite mineral (TXO), CpG,

15 triterpenoides (p. ej., Quil A u otra preparación de saponina purificada o parcialmente purificada), esteroides (p. ej., colesterol), agentes inmunomoduladores (p. ej., bromuro de dimetil dioctadecil amonio - DDA), polímeros (p. ej., poli(ácido acrílico) tal como CARBOPOL[®]) y estimuladores de Th2 (p. ej., glucolípidos tales como Bay R1005[®]), y combinaciones de los

20 mismos, entre muchos otros adyuvantes conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos no limitantes de diversas combinaciones que se pueden usar incluyen un triterpenoide más un esteroide (p. ej., Quil A/colesterol, también conocido

25 como QAC), un triterpenoide más un esteroide, un agente inmunomodulador y un

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

5

El experto en la técnica puede determinar fácilmente las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención. En un modo de realización, la presente invención contempla composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden de desde
10 aproximadamente 20 µg hasta aproximadamente 2000 µg de adyuvante. En otro modo de realización, se incluye el adyuvante en una cantidad de desde aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 1500 µg, o desde aproximadamente 250 µg hasta aproximadamente 1000 µg, o desde aproximadamente 350 µg hasta aproximadamente 750 µg. En otra realización,
15 se incluye en adyuvante en una cantidad de aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición inmunógena o vacuna.

Las composiciones inmunógenas y vacunas también pueden incluir antibióticos. Tales antibióticos incluyen, pero sin limitación, los de las clases de
20 aminoglucósidos, carbapenémicos, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. En un modo de realización, la presente invención contempla composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden de desde aproximadamente 1 µg/ml hasta aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico. En otro modo de realización, las
25 composiciones inmunógenas y vacunas comprenden de desde

aproximadamente 5 µg/ml hasta aproximadamente 55 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 10 µg/ml hasta aproximadamente 50 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 15 µg/ml hasta aproximadamente 45 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 20 µg/ml hasta aproximadamente 40 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 25 µg/ml hasta aproximadamente 35 µg/ml de antibiótico. En otro modo de realización más, las composiciones inmunógenas y vacunas comprenden menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibiótico.

- 10 Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden incluir una o más moléculas polinucleotídicas que codifican un virus o bacteria, o proteína vírica o bacteriana. Se pueden usar moléculas de ADN o ARN en las composiciones inmunógenas o vacunas. La molécula de ADN o ARN se puede administrar en ausencia de otros agentes o se puede
- 15 administrar junto con un agente que facilita la incorporación celular (p. ej., liposomas o lípidos catiónicos). En general, el total de polinucleótido en la composición inmunógena o vacuna estará entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml. En otro modo de realización, el total de polinucleótido en la composición inmunógena o vacuna será de desde
- 20 aproximadamente 1 µg/ml hasta aproximadamente 4,0 mg/ml, o desde aproximadamente 10 µg/ml hasta aproximadamente 3,0 mg/ml, o desde aproximadamente 100 µg/ml hasta aproximadamente 2,0 mg/ml. En la técnica se han descrito bien las vacunas y procedimientos de vacunación que usan ácidos nucleicos (ADN o ARNm), por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º
- 25 5.703.055, en la patente de EE. UU. N.º 5.580.859, en la patente de EE. UU.

N.º 5.589.466, la totalidad de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Además de los virus o bacterias descritos anteriormente, las composiciones
5 inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden incluir otros
antígenos adicionales. Los antígenos pueden estar en forma de una
preparación completa o parcial inactivada del microorganismo, o en forma de
moléculas antigénicas obtenidas por técnicas de ingeniería genética o de
síntesis química. Otros antígenos apropiados para su uso de acuerdo con la
10 presente invención incluyen, pero sin limitación, los derivados de virus
patógenos tales como el virus del moquillo canino, herpesvirus canino, virus de
la gripe canina, virus de la rabia, bacterias patógenas tales como *Leptospira*
bratislava, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira*
icterohaemorrhagiae, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, especies del
15 género *Porphyromonas*, especies del género *Bacteriodes*, especies del género
Borrelia, especies del género *Streptococcus*, incluida *Streptococcus equi*
subespecie *zooepidemicus*, especies del género *Ehrlichia*, especies del género
Mycoplasma, incluida *Mycoplasma cynos*, y *Microsporum canis*. También se
pueden obtener antígenos de hongos patógenos tales como *Candida*,
20 protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*,
Toxoplasma gondii, especies del género *Eimeria*, especies del género *Babesia*,
especies del género *Giardia*, especies del género *Leishmania*, o helmintos tales
como *Taenia*, *Cuterebra*, *Echinococcus* y especies del género *Paragonimus*.

25 **Formas, dosificación, vías de administración**

Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención se pueden administrar a animales para inducir una respuesta inmunitaria eficaz el CERI. En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos de estimulación de una respuesta inmunitaria eficaz mediante la administración
5 a un animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena o vacuna descrita en el presente documento.

Las composiciones inmunógenas y vacunas descritas en el presente documento se pueden administrar a un animal para vacunar al sujeto animal
10 contra el CERI. Las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden administrar al animal para evitar o tratar el CERI en el animal. En consecuencia, en el presente documento se describen procedimientos de vacunación de un animal contra el CERI y de prevención o tratamiento del CERI que comprenden administrar al animal una cantidad terapéuticamente
15 eficaz de una composición inmunógena o vacuna descrita en el presente documento.

Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención se pueden preparar de diversas formas en función de la vía de administración.
20 Por ejemplo, las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden preparar en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles adecuadas para uso inyectable, o se pueden preparar en formas liofilizadas usando técnicas de criodesecación. Normalmente, las composiciones inmunógenas y vacunas liofilizadas se mantienen a aproximadamente 4 °C y se pueden reconstituir en
25 una solución estabilizante, p. ej., solución salina o HEPES, con o sin

adyuvante. Las composiciones inmunógenas y vacunas también se pueden preparar en forma de suspensiones o emulsiones.

Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención
5 incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los
microorganismos descritos anteriormente. Los virus y/o bacterias purificados se
pueden usar directamente en una composición inmunógena o vacuna, o se
pueden atenuar adicionalmente o inactivar. Normalmente, una composición
inmunógena o vacuna contiene entre aproximadamente 1×10^2 y
10 aproximadamente 1×10^{12} partículas víricas 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
aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 partículas, o entre
aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 partículas. Un experto en la
15 técnica puede determinar la cantidad precisa de un microorganismo en una
composición inmunógena o vacuna eficaz para proporcionar un efecto
protector.

En general, las composiciones inmunógenas y vacunas comprenden un
20 vehículo veterinariamente aceptable en un volumen de entre aproximadamente
0,5 ml y aproximadamente 5 ml. En otro modo de realización, el volumen del
vehículo está entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 4 ml, o entre
aproximadamente 2 ml y aproximadamente 3 ml. En otro modo de realización,
el volumen del vehículo es de aproximadamente 1 ml, o es de
25 aproximadamente 2 ml, o es de aproximadamente 5 ml. Pueden ser vehículos

veterinariamente aceptables adecuados para su uso en composiciones inmunógenas y vacunas todos los descritos anteriormente en el presente documento.

- 5 Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente si es necesario atenuar o inactivar un virus o bacteria antes de su administración. En otro modo de realización de la presente invención, se puede administrar directamente un virus o bacteria a un animal sin atenuación adicional. La cantidad de un microorganismo que es terapéuticamente eficaz puede variar en función del
- 10 microorganismo en particular usado, la afección del animal y/o el grado de infección, y la puede determinar un experto en la técnica.

- De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, se puede administrar a los animales una dosis individual, o, alternativamente, pueden
- 15 tener lugar dos o más inoculaciones con intervalos de desde aproximadamente dos hasta aproximadamente diez semanas. Pueden ser necesarios tratamientos de refuerzo y se puede ajustar la pauta posológica para proporcionar una inmunización óptima. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la pauta posológica óptima.

20

- Las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden administrar directamente en el torrente circulatorio, en el músculo, en vísceras o bajo la piel. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen las administraciones intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea. Los
- 25 dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyector de

aguja (incluidos los de microaguja) e inyectores sin aguja.

Normalmente, las formulaciones parenterales son soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, hidratos de carbono y agentes
5 tamponadores (preferentemente a un pH de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 9, o desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8, o desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7,5, o desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular
10 más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma desecada para su uso junto con un vehículo adecuado, tal como agua sin pirógenos estéril o solución salina.

La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por
15 ejemplo, por liofilización, se puede llevar a cabo fácilmente usando técnicas farmacéuticas ordinarias bien conocidas por los expertos en la técnica.

La solubilidad de los materiales usados en la preparación de soluciones parenterales se puede incrementar mediante el uso de técnicas de formulación
20 apropiadas conocidas por el experto en la técnica, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad, incluidos tampones, sales, tensioactivos, liposomas, ciclodextrinas y similares.

Las composiciones para administración parenteral se pueden formular para que
25 sean de liberación inmediata o modificada. Las formulaciones de liberación

modificada incluyen liberación retardada, mantenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada. Por tanto, las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden formular como un sólido, un semisólido o un líquido tixotrópico para su administración como un depósito implantado que proporciona liberación

5 modificada de las composiciones inmunógenas y vacunas.

Otros medios de administración de la composición inmunógena o vacuna incluyen la administración por inyección con microaguja o sin aguja (p. ej., Powderject™, Bioject™, etc.).

10

En casos en los que se usa la inyección subcutánea o intramuscular, es preferente una formulación isotónica. En general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En casos particulares, se usan soluciones isotónicas tales como la

15 solución salina tamponada con fosfato. Las formulaciones pueden englobar además estabilizantes tales como gelatina y albúmina. En algunos modos de realización, se añade a la formulación un agente vasoconstrictor. En general las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se proporcionan estériles y sin pirógenos. No obstante, los expertos en la técnica

20 saben bien que las formulaciones para el vehículo farmacéuticamente aceptable son los vehículos farmacéuticos aprobados en las normativas promulgadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, o una instancia gubernamental equivalente en un país extranjero tal como Canadá o México, o cualquiera de las naciones europeas, para cualquier vacuna canina,

25 composiciones inmunógenas y vacunas de subunidades polipeptídicas (de

antígeno), vacunas de vectores víricos recombinantes y vacunas de ADN. Por lo tanto, el vehículo farmacéuticamente aceptable para la producción comercial de las composiciones inmunógenas o vacunas es un vehículo que ya está aprobado o lo aprobará la administración gubernamental apropiada en Estados Unidos o en un país extranjero. Las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden mezclar además con un adyuvante que sea farmacéuticamente aceptable. En determinadas formulaciones de las composiciones inmunógenas y vacunas, se combina la composición inmunógena o vacuna con otras composiciones inmunógenas o vacunas caninas para producir un producto polivalente que pueda proteger al cánido de una amplia variedad de enfermedades provocadas por otros patógenos caninos.

Procedimientos de detección y diagnóstico

El alcance y la naturaleza de las respuestas inmunitarias inducidas en el animal se pueden evaluar usando diversas técnicas. Por ejemplo, se pueden recoger sueros de los animales inoculados y someterlos a pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para los inmunógenos. La detección de linfocitos T citotóxicos (CTL) de respuesta en tejidos linfáticos, indicador de la inducción de una respuesta inmunitaria celular, se puede lograr mediante ensayos tales como los de proliferación de linfocitos T. Las técnicas pertinentes están bien descritas en la técnica.

Kits

Dado que puede ser deseable administrar una composición inmunógena o vacuna en combinación con composiciones o compuestos adicionales (por

ejemplo, con el fin de tratar una enfermedad o afección en particular), está dentro del alcance de la presente invención que, de forma conveniente, una composición inmunógena o vacuna puede estar incluida en, o combinada en, forma de un kit adecuado para la administración o coadministración de las composiciones.

Así, los kits que engloba la presente invención pueden comprender una o más composiciones farmacéuticas independientes, al menos una de las cuales es una composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, y un medio para mantener separadas dichas composiciones, tal como un recipiente, un frasco dividido o un envase de lámina metálica dividido. Un ejemplo de un kit de este tipo es una jeringuilla y una aguja, y similares. Un kit de la presente invención es particularmente adecuado para administrar diferentes formas farmacéuticas, por ejemplo, oral o parenteral, para administrar las composiciones independientes a intervalos de dosificación diferentes, o para valorar las composiciones independientes una frente a la otra. Para ayudar a la administración de una composición que engloba la presente invención, normalmente, el kit comprende instrucciones para la administración.

Otro kit que engloba 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 para detectar la presencia de microorganismos completos, polipéptidos, epítomos o secuencias polinucleotídicas. La presencia de virus, bacterias, polipéptidos o secuencias

polinucleotídicas se puede determinar usando anticuerpos, PCR, hibridación y otros procedimientos de detección conocidos por los expertos en la técnica.

Otro kit que engloba la presente invención puede proporcionar reactivos para la
5 detección de anticuerpos frente a epítomos particulares. Estos reactivos son útiles para analizar una muestra para detectar la presencia de anticuerpos y los conocen fácilmente y están fácilmente disponibles para el experto en la técnica. La presencia de anticuerpos se puede determinar usando procedimientos de detección ordinarios conocidos por los expertos en la técnica.

10

En determinados modos de realización, los kits pueden incluir un juego de instrucciones impresas o una etiqueta que indique que el kit es útil para la detección de animales infectados.

15 **Anticuerpos**

Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o recombinantes. Los anticuerpos se pueden preparar contra el inmunógeno o contra una parte del mismo. Por ejemplo, se pueden aislar y usar como inmunógeno un péptido sintético basado en la secuencia de aminoácidos del inmunógeno, o preparado
20 de forma recombinante por técnicas de clonación, o el producto génico natural y/o partes del mismo. Se pueden usar inmunógenos para producir anticuerpos mediante tecnología ordinaria de producción de anticuerpos bien conocida por los expertos en la técnica. También se pueden preparar fragmentos de anticuerpo a partir de los anticuerpos por procedimientos conocidos por los
25 expertos en la técnica, e incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv.

En la producción de anticuerpos, se puede llevar a cabo la selección del anticuerpo deseado por procedimientos ordinarios en inmunología conocidos en la técnica. En general, los tipos de inmunoensayos preferentes son ELISA y la transferencia de bandas Western. Los expertos en la técnica conocen bien ambos ensayos. En los ensayos se pueden usar tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Como se conoce bien en la técnica, se puede unir el anticuerpo a un sustrato de soporte sólido, conjugarlo con un resto detectable, o unirlo y conjugarlo. También se conoce bien en la técnica la unión de anticuerpos a un sustrato de soporte sólido. Los restos detectables que se contemplan para su uso en la presente invención pueden incluir, pero sin limitación, marcadores fluorescentes, metálicos, enzimáticos y radioactivos tales como biotina, oro, ferritina, fosfatasa alcalina, b-galactosidasa, peroxidasa, ureasa, fluoresceína, rodamina, tritio, ^{14}C y yodación.

15

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero en modo alguno se limita, mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Inmunogenicidad de una vacuna de subunidades de extracto bacteriano de *Bordetella bronchiseptica*.

Se incluyeron en el estudio treinta y dos Beagle de aproximadamente 8 semanas de edad con *Bordetella bronchiseptica* baja (valores de anticuerpo microaglutinador (MAT) de ≤ 16). Se repartió a los cachorros aleatoriamente en dos grupos de tratamiento (T1 y T2) de 16 cada uno. Se retiró un cachorro del

25

T2 antes de la primera vacunación debido a una hernia inguinal.

Tabla 1. Diseño del estudio

Grupo	Vacuna	N	Vacunación			Exposición		
			Volumen ml	Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis/Perro	Vía
T1	Solución salina	16	1,0	0 y 21	SC	42	6,4x10 ⁸ UFC	Intranasal
T2	Vacuna de subunidades- Extracto de <i>B. bronchiseptica</i>	15	1,0				(unidades formadoras de colonias)	Aerosolización en la cámara

- 5 Se vacunó a los perros por vía subcutánea (SC) con la vacuna apropiada en los días 0 y 21, de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 1. A cada perro se le administraron las vacunas en la región del hombro derecho para la primera vacunación y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

10

- En el día 42, se expuso a los perros de todos los grupos de tratamiento a *B. bronchiseptica* por vía intranasal mediante el uso de aerosolización en una cámara de plexiglás durante 30 minutos. Se expuso a cuatro perros (2 del T1 y 2 del T2) al mismo tiempo, con la excepción de un grupo, que tenía únicamente
- 15 3 animales (dos del T1 y uno del T2) porque se había retirado un animal del estudio anteriormente.

La variable principal de eficacia fue la tos. Todas las demás variables (rinorrea, secreción ocular, estornudos, depresión, arcadas, respiración) se consideraron

variables secundarias de apoyo. Se realizaron observaciones clínicas para detectar signos de enfermedad respiratoria, incluida la tos, dos veces al día (“períodos de observación”; a.m. y p.m.), durante aproximadamente 30 minutos en cada habitación por cada sesión, desde el día 42 y hasta el día 70 (finalización del estudio). Se calculó para cada animal si un animal tosía durante dos períodos de observación tras la exposición o no. Se calculó una distribución de la frecuencia de tos/sin tos durante dos períodos de observación consecutivos para cada tratamiento. Se analizó la tos/sin tos durante dos períodos de observación consecutivos con una prueba de Cochran-Armitage, ajustando para cada habitación, dado que no era posible analizar los datos con un modelo mixto lineal generalizado. Se calcularon las distribuciones de la frecuencia de aislamiento bacteriano nasal (+/-) para cada tratamiento y punto temporal. También se determinó para cada animal si en algún momento se le aislaron o no bacterias tras la exposición.

15

Se calculó una distribución de la frecuencia de si a un animal se le habían aislado en algún momento *B. bronchiseptica* tras la exposición para cada tratamiento y se analizó con un modelo mixto lineal generalizado, cuando fue posible. Se calculó la duración de la presencia nasal tras la exposición para cada animal y se analizó con un modelo mixto lineal general. Los valores de anticuerpos se transformaron logarítmicamente y se analizaron usando un modelo mixto lineal general para medidas repetidas.

20

Resultados: No se observó dolor o fiebre ($\geq 39,5$ °C) en ninguno de los perros tras la vacunación. Se observó que algunos perros de ambos grupos de

25

tratamiento se rascaban en el momento de la vacunación. Se observaron hinchazones por inyección de tamaño pequeño (2x2x1 cm) únicamente en dos perros del T2 durante las 3-6 horas de observación posteriores a la primera vacunación. Los datos indican que la vacuna era segura y que los perros la
5 toleraron bien.

Todos los controles con solución salina presentaron tos, lo que indican una exposición adecuada. La media de los mínimos cuadrados (MC) de la duración de la tos del grupo de control fue de 20,3. En contraste, la vacuna redujo
10 significativamente la duración de la tos hasta una media de MC de 5,2 en los vacunados con un valor de $p < 0,0001$. Adicionalmente, se redujeron otros signos clínicos respiratorios, tales como las arcadas y la respiración, en los vacunados en comparación con los controles.

15 Los datos de aislamiento bacteriano tras la exposición mostraron que la vacuna de prueba reducía significativamente la duración de la presencia nasal del microorganismo inmunógeno en el grupo vacunado (media de MC de 20,5) en comparación con los controles con solución salina (media de MC de 25,3) con un valor de p de 0,0061. Los datos indican que la vacuna es eficaz en la
20 reducción del grado de infección, como confirma la reducción de la duración de la presencia en los vacunados.

Las respuestas de anticuerpos generadas tras la vacunación (días 21 y 42) en el grupo T2 fueron similares a las del T1, probablemente debido a la naturaleza
25 del ensayo de anticuerpos aglutinadores, y no a la carencia de antigenicidad.

En el día 70 se observó que en la mayoría de los vacunados se indujo una fuerte respuesta anamnésica tras la vacunación (media de MC de 426) en comparación con el control con solución salina (media de MC de 13), lo que indica una inmunización eficaz.

5

Tomados conjuntamente, los datos de este estudio indican claramente que la vacuna de subunidades de extracto bacteriano de *Bordetella bronchiseptica* demostró eficacia por la reducción de la duración de la tos y la presencia nasal.

10 **Ejemplo 2: Evaluación de la eficacia y la seguridad de una vacuna de *Bordetella bronchiseptica* inyectable.**

Se incluyeron en el estudio cincuenta perros Beagle, aproximadamente a las 8 semanas de edad. Se repartió a los perros en 5 grupos de 10 cada uno. Todos los animales tenían un estado de salud general bueno y no recibieron ninguna
15 vacunación de *Bordetella*. Las muestras de suero previas a la selección dieron resultados negativos para *B. bronchiseptica*, con valores <16 por la prueba de microaglutinación (MAT) antes de la primera vacunación. Mediante una prueba de aislamiento bacteriano de hisopos nasales antes de la primera vacunación (día 0) se determinó que ninguno de los animales tenía *B. bronchiseptica*.

20

Tabla 2. Diseño del estudio

Grupo	Producto en fase de investigación clínica veterinaria (PIV)	N	Vacunación			Exposición		
			Volumen ml	Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis/Perro	Vía
T01:	Solución salina	10	1,0	0 y 21	SC	42	5,4x10 ⁸ UFC (<u>unidades</u> <u>formadoras de</u> <u>colonias</u>)	Intranasal Aerosolización en la cámara
T02	Extracto bacteriano de <i>B. bronchiseptica</i> / pertactina (10µg) / QCDC	10	1,0	0 y 21	SC			
T03	Vacuna comercial de extracto de <i>B. bronchiseptica</i> modificada con adyuvante	10	1,0	0 y 21	SC			
T04	Pertactina (10µg) / QCDC	10	1,0	0 y 21	SC			
T05	Vacuna intranasal comercial	10	0,5	0	IN			

Se vacunó a los animales con la vacuna apropiada en los días 0 y 21, de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 2. Las vacunas de los grupos T01, T02, T03 y T04 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. El grupo T05 recibió una única vacunación intranasal de una vacuna intranasal disponible comercialmente en el día 0. Este grupo fue vacunado en último lugar para evitar la propagación de la vacuna viva por las instalaciones, y se alojó a los perros de este grupo por separado en una habitación distinta para evitar la exposición a otros grupos.

En el día 42, se expuso a los perros de todos los grupos de tratamiento a *Bordetella bronchiseptica* por vía intranasal mediante el uso de aerosolización en una cámara de plexiglás durante un total de 30 minutos. Se expuso a cinco perros de cada recinto (uno de cada grupo de tratamiento) al mismo tiempo.

La variable principal de eficacia fue la tos; el aislamiento bacteriano fue la variable secundaria. Se realizaron observaciones clínicas para detectar signos de enfermedad respiratoria, incluida la tos, dos veces al día (“períodos de observación”; a.m. y p.m.), durante aproximadamente 30 minutos en cada habitación por cada sesión, desde el día 42 y hasta el día 62 y una vez (a.m.) en el día 63 (finalización del estudio). Antes del análisis de la tos, se transformó el porcentaje de períodos de observación con tos con una transformación de raíz cuadrada del arcoseno. El porcentaje de períodos de observación transformado y el número de días con tos se analizaron con un modelo mixto lineal general. Para cada animal se calcularon el porcentaje de períodos de observación tras la exposición en los que un animal tose y el número de días tras la exposición con tos.

Resultados: Se observaron hinchazones de leves a moderadas en los sitios de

inyección de perros del grupo de tratamiento T02 y T04 (datos no mostrados). La intensidad de las reacciones y el número de perros afectados aumentaron después de la segunda vacunación. Se observaron reacciones leves en el sitio de inyección en unos pocos perros del grupo de tratamiento T03. No se observó ninguna hinchazón por inyección medible en el grupo de solución salina T01. No se observó fiebre sintomática ($\geq 39,5$ °C), excepto en un perro del grupo T02 en el día 4 tras la vacunación. No se observó dolor en ninguno de los perros vacunados.

- 10 La inoculación del inmunógeno de *B. bronchiseptica* indujo tos en todos los controles no vacunados (el 53,3 % y tosieron 14,7 días), lo que indica que la exposición era adecuada para evaluar las vacunas de prueba. Los resultados obtenidos para el grupo T05, que recibió la vacuna intranasal comercial (control positivo), mostraron que se observó tos en el 4,6 % hasta 2 días tras la
- 15 exposición, lo que apunta a que el grado de exposición es óptimo y no excesivo.

En este estudio se evaluaron tres formulaciones de prueba. En el T02 se observó tos en el 16,1 % hasta 6 días tras la exposición, en el T03 se observó

20 tos en el 34,7 % hasta 10,5 días tras la exposición y en el T04 se observó tos en el 34,5 % hasta 10,7 días tras la exposición. En consecuencia, todos los grupos vacunados mostraron puntuaciones de tos reducidas en comparación con los controles no vacunados. El grupo T02 vacunado con un extracto bacteriano de *B. bronchiseptica*, con adición de pertactina y con QCDC como

25 adyuvante, demostró una reducción estadísticamente significativa en los

criterios de puntuación de la tos. Por tanto, la eficacia de la formulación probada en el T02 resultó eficaz.

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

Para el estudio se seleccionaron cincuenta (50) perros, repartidos en 5 grupos de tratamiento. Basándose en una exploración física en el día -4 se determinó que los animales eran adecuados para el estudio.

- 10 En los días -2, 21 y 28 antes de cada vacunación se recogieron muestras de sangre (de aproximadamente 8 ml) para la serología en tubos SST de todos los animales del estudio. Las muestras de suero recogidas en el día -2 se usaron para confirmar que los animales no tenían *B. bronchiseptica*. En el día 0 antes de la vacunación se recogieron hisopos nasales y se sometieron a pruebas
- 15 para detectar la presencia de *B. bronchiseptica*. Comenzando en el día -4 se tomaron las temperaturas timpánicas para establecer un valor inicial antes de la vacunación.

- En los días 0, 21 y 28 se vacunó a los animales con la vacuna apropiada de
- 20 acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 3. A cada perro se le administraron las vacunas por vía subcutánea en la región del hombro derecho para la primera vacunación y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

Tabla 3. Diseño del estudio

Grupo	PIV	N	Vacunación ¹			Exposición ²		
			Vol (ml)	Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis objetivo/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 rehidratada con <i>B. bronchiseptica</i> (inactivada) + pertactina (10 µg) Sin adyuvante	10	1,0	0 y 28				
T05	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 rehidratada con agua (diluyente)	10	1,0	0 y 28				

¹ El producto en fase de investigación clínica veterinaria (PIV) se administró por vía subcutánea (SC).

² Dosis de exposición objetivo de 10⁹ microorganismos de cepa de *Bordetella bronchiseptica*.

En los días de vacunación 0, 21 y 28 se observó a todos los animales para
5 evaluar las reacciones en el sitio de inyección tras la vacunación. Desde los
días 1 hasta 7 y 22-35 se les observó a diario para evaluar las reacciones tras

la vacunación. En los días de 0 a 7 y de 21 a 35 se tomaron las temperaturas timpánicas.

En el día 55, un día antes de la exposición, se recogieron muestras de sangre
5 (de aproximadamente 6 ml) para serología. En los días 54, 55 y 56 antes de la
exposición se tomaron las temperaturas timpánicas. En el día 55, un día antes
de la vacunación, se recogieron hisopos nasales y se sometieron a pruebas
para detectar la presencia de *B. bronchiseptica*. Se observó a los animales dos
veces al día (a.m. y p.m.), aproximadamente 30 minutos cada sesión en los
10 días 54 y 55, y a.m. en el día 56, para detectar signos clínicos de enfermedad
respiratoria, con el fin de establecer valores iniciales.

Se usó *Bordetella bronchiseptica* (cepa inmunógena) para preparar una dosis
de exposición objetivo de 10^9 UFC/4 ml/perro. En el día 56, se expuso a los
15 perros de todos los grupos de tratamiento a *B. bronchiseptica* por vía intranasal
mediante el uso de aerosolización en una cámara de plexiglás durante un total
de 30 minutos para cada recinto expuesto. Se expuso a cinco perros de cada
recinto (uno de cada grupo de tratamiento) al mismo tiempo.

20 Desde el día 56 hasta el 77 se registraron las temperaturas timpánicas una vez
al día. Se realizaron observaciones clínicas dos veces al día (a.m. y p.m.),
durante aproximadamente 30 minutos en cada habitación por cada sesión,
desde el día 56 y hasta el día 76 y una vez (a.m.) en el día 77. Brevemente, se
observaron la tos, la rinorrea, los estornudos, la secreción ocular, las arcadas y
25 la depresión usando el siguiente sistema de puntuación: ausente (0), leve (1),

moderado (2) e intenso (3). En los días 59, 62, 66, 69, 74, 76 y 77 se recogieron hisopos nasales para determinar la presencia de microorganismos inmunógenos.

- 5 En el día 77 se recogieron muestras de sangre (de aproximadamente 6 ml) para serología. Se tomaron hisopos nasales para el aislamiento de *B. bronchiseptica* usando bastoncillos de algodón y medios de transporte.

- Se determinaron los anticuerpos aglutinantes frente a *B. bronchiseptica*
10 mediante la prueba de microaglutinación (MAT). Se valoraron muestras de suero de los grupos de tratamiento T04 y T05 de los días 0, 28, 55 y 77 para determinar los anticuerpos frente al CRCoV por neutralización sérica e IFA, y para el CIV por HAI. El aislamiento de *B. bronchiseptica* a partir de hisopos nasales se realizó de acuerdo con el procedimiento ordinario. Se sometió a
15 prueba cada muestra cualitativamente para determinar la presencia o ausencia de bacterias.

- Resultados.** Mediante aislamiento por cultivo de hisopos nasales se confirmó que cincuenta (50) cachorros de Beagle sanos de aproximadamente 8
20 semanas de edad no tenían microorganismos de *B. bronchiseptica* en el día 0. Las muestras de suero evaluadas para detectar anticuerpos aglutinantes frente a *B. bronchiseptica* por MAT confirmaron que todos los cachorros eran sensibles con valores de MAT de ≤ 8 en el día -2.

- 25 Todas las vacunas experimentales evaluadas en este estudio produjeron

hinchazones de leves a moderadas después de la primera vacunación. En la mayoría de los vacunados las hinchazones por inyección se limitaron al día 0 del estudio. También se observaron hinchazones por inyección de leves a moderadas después de la segunda vacunación. Cuando se produjeron, las hinchazones en el sitio de inyección desaparecieron entre uno y tres días después de la segunda vacunación. Se observó rascado de forma predominante en el grupo combinado de 5 elementos (T04). No se observó fiebre sintomática después de las vacunaciones. No se observaron hinchazones en el grupo de solución salina. Los datos confirmaron la seguridad de las vacunas.

El recuento de colonias realizado antes de la inoculación de inmunógeno confirmó que se aerosolizaron un promedio de $1,45 \times 10^8$ UFC de *Bordetella* por perro en la cámara. La inoculación del inmunógeno indujo tos en todos los perros de control con solución salina (T02) con un porcentaje medio de observación de tos del 43,5 % y 12,2 con tos. El grupo de tratamiento T05, vacunado únicamente con los 4 elementos víricos (CRCoV/CIV/CPIV/CAV2) sin antígeno de *Bordetella* padeció tos de forma similar al control con solución salina con un porcentaje medio de tos observada del 43,4 % y 12,2 días de tos. Estos descubrimientos indican que la exposición era adecuada y consistente para evaluar las vacunas de prueba.

Los perros del grupo de tratamiento T01 vacunados con la vacuna de *Bordetella* estaban significativamente protegidos contra el inmunógeno (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 les administró con una pauta posológica a intervalos de 3 semanas (5,8 días de tos, $p=0,0004$). La reducción de las puntuaciones de tos en estos dos grupos (T01 frente a T03) no fue significativamente diferente (valor de $p=0,1883$), lo que sugiere que el grado de protección para la vacuna dada con un intervalo de 3 o 4 semanas es similar.

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

15

La evaluación serológica de las fracciones víricas de la vacuna combinada de 5 elementos fue posible únicamente para dos fracciones, el CIV y el CRCoV, donde se confirmó que los perros eran seronegativos en el día -2 del estudio. La respuesta de HAI para el CIV en el grupo con la vacuna de 4 elementos (T04) en el día 56 del estudio fue numéricamente similar a la del grupo de la vacuna de 5 elementos (T05) e indica que no hay interferencia de la fracción de *Bordetella* con el antígeno del CIV. Las respuestas de SN del CRCoV en el día 56 del estudio fueron numéricamente superiores en el grupo de la vacuna de 4 elementos (T04) que en el grupo de la vacuna de 5 elementos (T05), lo que indica una posible interferencia de la *Bordetella* con la fracción del CRCoV. No

25

obstante, estos descubrimientos no son concluyentes, dado que estas vacunas no tenían adyuvantes y la formulación no estaba optimizada y no se realizó la exposición al CRCoV para probar la eficacia.

- 5 Se confirmó que la vacuna monovalente de *Bordetella* era segura y eficaz. La eficacia de la vacuna monovalente se demostró cuando se administró la vacuna a intervalos de 21 o 28 días. También se demostró que la fracción de *Bordetella* era eficaz al administrarla en una vacuna combinada de 5 elementos sin adyuvante.

10

Ejemplo 4. Estudio serológico multivalente

- Se realizó una selección previa en cuarenta perros, de aproximadamente 8 semanas de edad en buen estado general de salud, para detectar *Bordetella bronchiseptica* por la prueba de microaglutinación (MAT), y coronavirus
- 15 respiratorio canino (CRCoV) por ensayo de anticuerpos por fluorescencia indirecta (IFA). También se usó la neutralización sérica (SN) para evaluar los niveles de anticuerpos. En el día 0, todos los perros presentaron resultados negativos para anticuerpos frente a *Bordetella bronchiseptica* determinados por MAT (≤ 16), y negativos para anticuerpos frente al CRCoV determinados por
 - 20 IFA (< 40). Asimismo, ninguno de los perros tenía *Bordetella bronchiseptica* ni CRCoV, determinado mediante una prueba de aislamiento en hisopos nasales antes de la primera vacunación (día 0).

- Se repartieron los perros en 5 grupos de tratamiento de 8 perros cada uno y se
- 25 les vacunó de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 4. A cada

perro se le administraron las vacunas en la región del hombro derecho para la primera vacunación y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

5 Tabla 4. Diseño del estudio

Grupo de tratamiento	Producto en fase de investigación clínica veterinaria (PIV)	Adyuvante	N	Vacunación ¹	
				Días del estudio	Vía
T01:	CAV2/CPIV/CPV/L4	Rehydragel al 5 %	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	EMA al 1 % ¹ / Neocryl al 3 %/ Emulsigen SA al 5 %	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 etilenmaleico

Después de la segunda vacunación, debido a complicaciones, se retiraron del estudio los grupos T04 y T05. Se observó a los perros de los grupos restantes (T01, T02 y T03) a diario para detectar reacciones tras la vacunación y se realizó un seguimiento de la temperatura corporal (timpánica) durante 7 días

después de cada vacunación. En los días 0, 21, 42 y 56 se recogieron muestras de sangre de los perros para medir las respuestas de anticuerpos.

Se sometieron a pruebas las muestras de suero de los días 0, 21, 42 y 56 para
5 detectar anticuerpos aglutinantes frente a *Bordetella bronchiseptica* mediante el ensayo MAT. También se valoraron las muestras de suero de los mismos días para determinar los anticuerpos frente al CRCoV por neutralización sérica, para el CIV por HAI y para los anticuerpos frente al CAV-2 y el CPI por neutralización sérica. Para cada grupo de tratamiento se obtuvieron las medias
10 geométricas de los valores de anticuerpos.

Resultados:

Las vacunas de prueba de los grupos T02 y T03 indujeron respuestas de anticuerpos en todos (100 %) los perros vacunados después de la segunda
15 dosis, lo que indica una inmunización activa contra los antígenos víricos. En la mayoría de los perros vacunados la respuesta de anticuerpos aumentó después de la segunda vacunación, lo que indica un efecto de refuerzo de la segunda vacunación. Cabe destacar que las respuestas de anticuerpos entre las fracciones víricas se logró en presencia de múltiples antígenos víricos y
20 bacterianos (*B. bronchiseptica*), lo que indica una ausencia de interferencia inmunológica. La serología de MAT no es correlativa con la protección contra *Bordetella*, sino que es una valiosa herramienta de selección para la inclusión de animales de estudio adecuados. En conclusión, basándose en la respuesta inmunológica en los perros vacunados, se predice la eficacia de los antígenos
25 víricos de la vacuna multivalente de 5 elementos.

Ejemplo 5. Estudio de la duración de la inmunidad

A. Monovalente:

El propósito de este estudio es demostrar la duración de la inmunidad de una
5 vacuna de subunidades de extracto de *Bordetella bronchiseptica* en perros de 8
semanas de edad contra un inmunógeno virulento de *B. bronchiseptica*.

Todos los animales están en buen estado general de salud y no han recibido
ninguna vacunación de *Bordetella*. Los animales tienen valores bajos (≤ 16) o
10 nulos de anticuerpos frente a *B. bronchiseptica*, determinado por la prueba de
microaglutinación (MAT) antes de la primera vacunación. Además, ninguno de
los animales tiene *B. bronchiseptica*, determinado mediante una prueba de
aislamiento bacteriano de hisopos nasales antes de la primera vacunación.

15 Se reparten los perros en 2 grupos de tratamiento; un grupo recibe una vacuna
de placebo y el otro un extracto de *B. bronchiseptica* complementado con un
antígeno recombinante. El antígeno es pertactina, Bsp22, o ambos. Se vacuna
a los animales dos veces, con una separación de aproximadamente 3-4
semanas. Después de cada vacunación, se les observa para detectar
20 reacciones en el sitio de inyección.

Aproximadamente 6-12 meses después de la vacunación, se expone a los
perros de todos los grupos de tratamiento por aerosolización con *Bordetella
bronchiseptica*. Antes y después de la exposición se determinan la dosis de
25 inmunógeno y la pureza del inóculo inmunógeno. Se realizan observaciones

clínicas previamente y después de la exposición.

Se recogen hisopos nasales para el aislamiento de *B. bronchiseptica*. Se recoge sangre de cada animal para obtener suero. Se determinan los anticuerpos aglutinantes frente a *B. bronchiseptica* por MAT. Se valoran las muestras de suero para detectar la respuesta de anticuerpos IgG específicos de pertactina usando ELISA. Se realiza el aislamiento de *B. bronchiseptica* a partir de hisopos nasales de acuerdo con el procedimiento ordinario.

- 10 La tos, el aislamiento de *Bordetella* (tras la exposición) y la respuesta serológica tras la vacunación son los criterios usados para evaluar la eficacia de la vacuna en el estudio.

B. Multivalente:

- 15 El propósito de este estudio es demostrar la duración de la inmunidad de una vacuna combinada 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, ya sea pertactina, Bsp22, o ambos.

Todos los animales están en buen estado general de salud y no han recibido ninguna vacunación para ninguno de los patógenos contra los ha de proteger la vacuna diseñada. Se reparten los perros en varios juegos de grupos de tratamiento. Cada juego consiste en dos grupos de tratamiento, un grupo de

control que recibe una vacuna de placebo y un grupo vacunado que recibe la vacuna de prueba. Se vacuna a los animales dos veces, con una separación de aproximadamente 2-4 semanas. Después de cada vacunación, se les observa para detectar reacciones en el sitio de inyección.

5

Aproximadamente 6-12 meses después de la vacunación, se expone a cada juego de dos grupos de tratamiento (vacunados y de control) a uno de los patógenos contra los que ha de proteger la vacuna diseñada). Se realizan observaciones clínicas previamente y después de la exposición. Durante el periodo posterior a la exposición se recogen hisopos nasales para el aislamiento del patógeno inmunógeno. Se recoge sangre de cada animal para obtener suero, que se usa para estudios analíticos posteriores. Los signos clínicos de enfermedad respiratoria, la presencia de patógenos tras la exposición y las respuestas serológicas se usan como criterios para evaluar la eficacia de las vacunas.

10
15

Una vez descritos en detalle diversos modos de realización de la presente invención, se ha de entender que la invención definida por las reivindicaciones adjuntas no debe quedar limitada a los detalles particulares descritos en la descripción anterior, dado que son posibles muchas variaciones evidentes de los mismos sin alejarse del espíritu o el alcance de la presente invención.

20

Todas las referencias anteriores se incorporan en el presente documento por referencia como si se describieran en su totalidad en el presente documento.

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende *Bordetella bronchiseptica* y
5 un antígeno de pertactina aislado.
2. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que dicho antígeno de pertactina es una proteína de *Bordetella bronchiseptica*.
- 10 3. La composición inmunógena de la reivindicación 2, en la que dicho antígeno de pertactina es una proteína p68 recombinante.
4. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la *Bordetella bronchiseptica* es una vacuna bacteriana o un extracto
15 bacteriano.
5. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición no tiene adyuvantes.
- 20 6. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antígeno de pertactina está presente en entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 30 µg.
7. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones
25 anteriores, en la que dicho antígeno de pertactina se prepara solubilizando

cuerpos de inclusión de pertactina en urea y en la que la composición está sustancialmente libre de agregados de antígenos de pertactina.

8. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones
5 anteriores, en la que el antígeno de pertactina está lipidado.

9. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un diluyente o excipiente para su administración parenteral a un perro.

10

10. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un antígeno Bsp22 aislado, opcionalmente lipidado.

15 11. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un antígeno de un patógeno respiratorio canino seleccionado del grupo que consiste en: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV), *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) y el virus de la
20 gripe canina (CIV).

12. La composición inmunógena de la reivindicación 11, en donde dicha composición comprende al menos dos, tres o cuatro de los antígenos del patógeno respiratorio canino.

25

13. La composición inmunógena de la reivindicación 11, en donde dicha composición comprende antígenos del virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

5

14. Una composición inmunógena que comprende una pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes, en donde dicha composición está sustancialmente libre de agregados de p68.

10 15. La composición inmunógena de la reivindicación 14, en la que dicha pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes se preparan solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna.

15 16. Uso de la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el tratamiento o la prevención de la infección por un patógeno respiratorio canino en un perro.

17. El uso de la reivindicación 16, en el que dicha composición evita la
20 infección por dicho patógeno respiratorio canino en dicho perro durante un periodo de 6 meses o más.

18. El uso de la reivindicación 16 o 17, en el que el patógeno respiratorio canino es *Bordetella bronchiseptica*.

25

19. El uso de la reivindicación 18, en el que el patógeno respiratorio canino comprende además al menos uno, dos, tres o cuatro de: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

5

20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19, para el tratamiento o la prevención del complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CERI), en el que la composición trata o evita la infección por una pluralidad de dichos patógenos.

10

21.

Resumen

En el presente documento se proporcionan composiciones, combinaciones y
5 procedimientos que comprenden *Bordetella bronchiseptica* y pertactina aislada,
que son eficaces en el tratamiento o la prevención de infecciones respiratorias,
tales como la tos de las perreras, en animales.

Composiciones inmunógenas de *Bordetella bronchiseptica*

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la inmunología y, en particular, al
5 campo de las composiciones inmunógenas y de vacuna. Más específicamente,
la presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden una
preparación de *Bordetella bronchiseptica* en combinación con pertactina para el
tratamiento o la prevención de enfermedades respiratorias en perros.

10 Antecedentes de la invención

Bordetella bronchiseptica es una bacteria gramnegativa que coloniza las vías
respiratorias de los perros y provoca la traqueobronquitis o “tos de las
perreras”. Hawkins, E.C., Veterinary Internal Medicine (1995), págs. 767-811.
Bordetella bronchiseptica predispone a los perros a la influencia de otros
15 agentes respiratorios y, con frecuencia, existe de forma concurrente con ellos.
Hasta el momento se dispone de una serie de vacunas para el tratamiento de
la traqueobronquitis provocada por *Bordetella bronchiseptica*, incluidas
Nobivac®, Bronchi-Shield®, Bronchicine® CAe, Vanguard® B, Univac 2,
Recombitek® KC2, Naramune™-2 y Kennel-Jec™ 2.

20

Sin embargo, la mayoría de las vacunas comerciales existentes requieren
administraciones intranasales engorrosas, así como la adición de adyuvantes,
lo que puede dar lugar a efectos secundarios perjudiciales, tales como
quemazón e irritación. Viera Scheibner et al., *Nexus* Dic. 2000 (vol. 8, n.º 1).
25 Las vacunas intranasales gozan de escasa popularidad entre los veterinarios

debido a su riesgo personal con animales agitados durante la administración de la vacuna. Se han examinado vacunas de subunidades, tales como las que implican el uso de la proteína p68 de *Bordetella bronchiseptica* (pertactina), pero hasta el momento no se han incluido en ninguna vacuna canina comercial, 5 posiblemente debido a su insuficiente inmunogenicidad, reactividad y/o estabilidad de la formulación.

Bordetella bronchiseptica es un factor significativo en el complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CERI), que es una 10 enfermedad muy contagiosa común en perros alojados en condiciones de hacinamiento, tales como centros de acogida y residencias caninas o perreras de adiestramiento. La patogenia del CERI se considera multifactorial, al participar varios virus y bacterias. Los agentes infecciosos que se sabe que son agentes causantes del CERI incluyen, además de la bacteria *Bordetella* 15 *bronchiseptica* (Bemis et al., Lab. Anim. Sci., 29:48-52, 1977), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) (Erles et al., Virology, 310(2):216-223, 2003), el virus de la gripe canina (CIV) (Crawford et al., Science, 310(5747):482-485, 2005), el virus paragripal canino (CPIV) (Binn et al., Exp. Biol. Med., 126:140-145, 1967), *Mycoplasma cynos* (Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 20 2004) y el adenovirus canino de serotipo 2 (CAV-2) (Ditchfield et al., Can. Vet. J., 3:238-247, 1962). Hasta el momento no ha aparecido ninguna vacuna combinada integral contra la totalidad, o la mayoría, de los patógenos mencionados anteriormente.

25 En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de una composición

inmunógena que se pueda administrar por vía parenteral de forma segura a un perro, que proporcione una inmunoprotección de larga duración frente a *Bordetella bronchiseptica* sin efectos secundarios perjudiciales o interferencias con otros antígenos de una vacuna combinada o que ponga en riesgo al veterinario. La presente divulgación satisface estas y otras necesidades relacionadas.

Sumario de la invención

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende, entre otros, *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado. En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina es una proteína recombinante. En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina es de *Bordetella bronchiseptica*. En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina es p68. En otro modo de realización, dicha composición comprende además un antígeno Bsp22 aislado.

En otro modo de realización, el componente de *Bordetella bronchiseptica* es una vacuna bacteriana o un extracto bacteriano. En otro modo de realización, dicha composición no tiene adyuvantes. En otro modo de realización, dicha composición comprende además un adyuvante.

En otro modo de realización, dicho antígeno de pertactina está presente en entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 30 µg. Más en particular, dicha pertactina está presente en entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 20 µg, aún más en particular, en entre aproximadamente 7

μg y aproximadamente 15 μg, y todavía más en particular, en aproximadamente 5 μg, 10 μg, 15 μg o 20 μg. Preferentemente, dicho antígeno de pertactina se prepara solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna. Dichos
5 antígenos de pertactina son solubles y, preferentemente, están sustancialmente libres de agregados.

Otro modo de realización proporciona una composición inmunógena que comprende una pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes, en el
10 que dicha composición está sustancialmente libre de agregados de p68. Más en particular, dicha pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes se preparan solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna. La invención también proporciona procedimientos de preparación de antígenos de pertactina
15 p68 solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna.

En otro modo de realización, se formula dicha composición para su administración parenteral, de modo que comprende además un diluyente o
20 excipiente para su administración parenteral a un perro.

En otro modo de realización, dicha composición comprende además un antígeno de un patógeno respiratorio canino seleccionado del grupo que consiste en: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2),
25 el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

En un modo de realización más en particular, dicha composición comprende al menos dos, tres o cuatro de los antígenos de los patógenos respiratorios caninos.

- 5 En otro modo de realización, las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento no comprenden antígenos no respiratorios. Por tanto, un modo de realización de la invención proporciona una composición como se describe en el presente documento con la condición de que no incluya un antígeno no respiratorio. Los antígenos no respiratorios no provocan
- 10 enfermedades respiratorias en un sujeto. Ejemplos no limitantes de estos antígenos no respiratorios incluyen el virus de la rabia, el parvovirus canino, el coronavirus entérico canino, especies del género *Leptospira* y *Borrelia burgdorferi*.
- 15 En otro modo de realización, dicho antígeno es del coronavirus respiratorio canino (CRCoV). En otro modo de realización, dicho antígeno es del virus de la gripe canina (CIV). En otro modo de realización, dicho antígeno es del virus paragripal canino (CIV). En otro modo de realización, dicho antígeno es del adenovirus canino 2 (CAV-2). En otro modo de realización, dicho antígeno es
- 20 del virus paragripal canino (CPIV) y del adenovirus canino 2 (CAV-2).

En otro modo de realización, dicha composición comprende antígenos del virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

En otro modo de realización, la composición induce una respuesta inmunitaria frente a *Bordetella bronchiseptica* y al menos uno del virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

5

Otro modo de realización de la invención proporciona una composición inmunógena que comprende el coronavirus respiratorio canino (CRCoV), una preparación de *Bordetella bronchiseptica* y el virus de la gripe canina (CIV). Más en particular, dicha composición comprende un antígeno de pertactina

10 aislado.

Otro modo de realización de la presente invención proporciona un procedimiento o uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los modos de realización anteriores para el tratamiento o la prevención de la
15 infección por un patógeno respiratorio canino en un perro. En otro modo de realización, dicha composición evita la infección por dicho patógeno respiratorio canino en dicho perro durante un periodo de 6 meses o más. En otro modo de realización, dicha composición evita la infección por dicho patógeno respiratorio canino en dicho perro durante un periodo de aproximadamente 1 año.

20

En otro modo de realización, el patógeno respiratorio canino es *Bordetella bronchiseptica*. En otro modo de realización, el patógeno respiratorio canino comprende además al menos uno, dos, tres o cuatro de: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio
25 canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

Otro modo de realización de la presente invención proporciona un procedimiento o uso de la composición inmunógena de uno cualquiera de los modos de realización anteriores para el tratamiento o la prevención del complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CERI), en el que la composición trata o evita la infección por una pluralidad de patógenos respiratorios caninos. Otro modo de realización proporciona el uso o procedimiento de administración por vía parenteral de una composición inmunógena como se describe en el presente documento.

10

Otro modo de realización proporciona la fabricación de un medicamento que comprende la composición inmunógena para el tratamiento o la prevención de la infección por un patógeno respiratorio canino en un perro.

15 Estos y otros modos de realización, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas descritas más adelante en el presente documento. Se entiende que todos los modos de realización anteriores y siguientes se pueden combinar en un único modo de realización.

20

Descripción detallada de la invención

Las definiciones que figuran a continuación se aplican a la presente divulgación. Reemplazan cualquier definición contradictoria contenida en las referencias individuales incorporadas en el presente documento por referencia.

25 Las palabras no definidas tienen el significado usado comúnmente por un

experto en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular.

- 5 “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 se encuentren dentro del error experimental del valor indicado (p. ej., 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”
10 con referencia a intervalos de tiempo 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.

Tal como se usa en el presente documento, “adyuvante” se refiere a cualquier
15 sustancia que sirva como estimulador inespecífico de la respuesta inmunitaria. Para una descripción más detallada de los adyuvantes, véase más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, el término “animal” incluye cualquier animal sensible a infecciones por *Bordetella bronchiseptica* y/o al
20 complejo de enfermedades respiratorias caninas, incluidos mamíferos tanto domesticados como salvajes. Preferentemente, tal como se usa en el presente documento, animal se refiere a un perro o un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, “anticuerpo” es cualquier
25 polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno, independientemente

del origen, el 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 consecuencia de una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas séricas

5 compuestas de cadenas polipeptídicas “ligeras” y “pesadas” que tienen regiones “constantes” y “variables” y que se dividen en clases (p. ej., 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 unen un antígeno específico de forma

10 exclusiva. El término incluye, pero sin limitación: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio

15 único, un anticuerpo de dominio suprimido, una proteína de fusión, una proteína de fusión ScFc, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo sintético, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo híbrido, un anticuerpo mutado y anticuerpos con injertos de CDR. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas obtenidas de fuentes

20 naturales o de fuentes recombinantes, o pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Se puede convertir un “anticuerpo” en 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 monocatenario (ScFv), un fragmento Fd, un

25 fragmento dAb, diacuerpos, un péptido de CDR3, un péptido de FR3-CDR3-

FR4 restringido, un nanocuerpo, un nanocuerpo bivalente, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP) y un minicuerpo y cualquiera de los fragmentos mencionados anteriormente y sus equivalentes modificados química o genéticamente, así como otros fragmentos de anticuerpos que
5 mantengan la función de unión a antígeno. Normalmente, estos fragmentos comprenderán un dominio de unión a antígeno. Como conocerán los expertos en la técnica, se puede manipular (por ejemplo, con líneas germinales) cualquiera de estas moléculas para reducir su inmunogenicidad, aumentar su afinidad, modificar su especificidad o con otros fines.

10

Tal como se usa en el presente documento, “antígeno” o “inmunógeno” 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 “epítomo” es el
15 sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocitos T o anticuerpo específico y, normalmente, comprende de aproximadamente 3 residuos de aminoácido a aproximadamente 20 residuos de aminoácido. El término antígeno se refiere a antígenos de subunidad (antígenos discretos e independientes de un organismo completo con el que al antígeno está asociado
20 en la naturaleza), así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. El término antígeno también se refiere a anticuerpos, tales como anticuerpos antiidiotípicos o fragmentos de los mismos, y a mimótopos peptídicos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico (epítomo). El término “antígeno” se refiere también a un
25 oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante

antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de inmunización de ADN.

Tal como se usa en el presente documento, “antigenicidad” se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido de unirse inmunoespecíficamente a un
5 anticuerpo obtenido frente a la proteína o polipéptido.

El término “*Bordetella bronchiseptica*” o “*B. bronchiseptica*” se refiere a: una bacteria *Bordetella bronchiseptica* viva atenuada, un extracto de célula completa muerta (vacuna bacteriana) de *Bordetella bronchiseptica* o un
10 extracto celular bacteriano de *Bordetella bronchiseptica*.

“Tampón” significa un sistema químico que evita que cambie la concentración de otra sustancia química. Los sistemas donadores y aceptores de protones funcionan como tampones, evitando cambios pronunciados de la
15 concentraciones de iones de hidrógeno (pH). Otro ejemplo de un tampón es una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada) o una base débil y su sal (ácido conjugado).

Tal como se usa en el presente documento, “canino” incluye lo que
20 comúnmente se denomina perro, pero incluye otros miembros de la familia *Canidae*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “línea celular” o “célula huésped” significa una célula procariota o eucariota en la que se puede replicar
25 y/o mantener un virus.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cultivo” significa una población de células o microorganismos que crecen en ausencia de otros tipos o especies.

5

“Dosis” se refiere a una vacuna o composición inmunógena dada a un sujeto. Una “primera dosis” o “dosis de sensibilización” se refiere a la dosis de dicha composición administrada en el día 0. Una “segunda dosis” o una “tercera dosis” o una “dosis anual” se refiere a una cantidad de dicha composición dada
10 después de la primera dosis, que puede ser, aunque no lo es necesariamente, la misma vacuna o composición inmunógena de la primera dosis.

Un “epítopo” es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocitos T o anticuerpo específico y, normalmente, comprende de desde
15 aproximadamente 3 residuos de aminoácido hasta aproximadamente 20 residuos de aminoácido.

Tal como se usa en el presente documento, “excipiente” se refiere a un componente de vehículo de una vacuna o composición inmunógena no reactivo
20 que no es un antígeno. Son excipientes preferentes aquellos conocidos en la técnica para inyección parenteral.

“Fragmento” se refiere a una parte truncada de una proteína o gen. “Fragmento funcional” y “fragmento biológicamente activo” se refieren a un fragmento que
25 mantiene las propiedades biológicas del gen o la proteína de longitud completa.

“Homología” o “porcentaje de homología” se refiere al porcentaje de nucleótidos o residuos de aminoácido de la secuencia candidata que son idénticos o similares a los residuos de la(s) secuencia(s) de comparación
5 después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y considerando también parte de la identidad de secuencia cualquier sustitución conservadora.

“Homólogos” u “homólogos de especie” incluyen genes que se encuentran en
10 dos o más especies diferentes que poseen una homología de secuencia polinucleotídica 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 rigurosas, como las descritas en el presente documento, por ejemplo, y poseen
15 las mismas 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 aproximadamente el 80 % de homología de secuencia, más de
20 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 aproximadamente el 98 % de homología de secuencia o más de
25 aproximadamente el 99 % de homología de secuencia.

“Identidad” o “porcentaje de identidad” se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos de la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de la secuencia de comparación después de alinear ambas secuencias e introducir
5 huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar parte de la identidad de secuencia cualquier sustitución conservadora.

Tal como se usa en el presente documento, “respuesta inmunitaria” en un
10 sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o una respuesta inmunitaria humoral y celular frente a un antígeno. Una “respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una que está mediada, al menos en parte, por anticuerpos. Una “respuesta inmunitaria celular” es una mediada por linfocitos T u otros leucocitos o ambos, e incluye la
15 producción de citocinas, quimiocinas y moléculas similares producidas por linfocitos T activados, leucocitos, o ambos. Las respuestas inmunitarias se pueden determinar usando inmunoensayos ordinarios y ensayos de neutralización conocidos en la técnica.

20 Tal como se usa en el presente documento, “inmunogenicidad” se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido de desencadenar una respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra una bacteria o virus que provoca la enfermedad identificada.

25 Una “composición inmunógena” es una preparación que contiene un

inmuógeno, incluidos, p. ej., una proteína, un péptido, una célula completa, virus inactivados, subunidades o atenuados, o un polisacárido, o una combinación de los mismos, administrada para estimular los sistemas inmunitarios humoral y celular del receptor frente a uno o más de los antígenos
5 presentes de la composición inmunógena. La “inmunización” es el procedimiento de administrar una composición inmunógena y estimular una respuesta inmunitaria o inmunogénica frente a un antígeno en un huésped. Son huéspedes preferentes los mamíferos, tales como los perros. Preferentemente, la composición inmunógena es una vacuna.

10

Tal como se usa en el presente documento, “cantidad inmunológicamente protectora” es una cantidad de un antígeno eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor que sea adecuada para evitar o mejorar los signos o síntomas de la enfermedad, incluidos efectos adversos para la salud o
15 complicaciones de los mismos. Se puede inducir inmunidad humoral o mediada por células o ambas. Se puede evaluar la respuesta inmunogénica de un animal frente a una composición, p. ej., indirectamente a través de la medida de valores de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del seguimiento de signos y síntomas después de la
20 exposición a la cepa natural. Se puede evaluar la inmunidad protectora conferida por una composición o vacuna midiendo, p. ej., la reducción de la presencia de microorganismos inmunógenos y/o la reducción de los signos clínicos, tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, salud y comportamiento del sujeto. La respuesta inmunitaria puede
25 comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La

cantidad de una composición o vacuna terapéuticamente eficaz puede variar en función del microorganismo en particular usado o de la afección del animal que se trata o vacuna, y la puede determinar un veterinario.

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

10

- El término “aislado” se refiere a una sustancia que está en forma sustancialmente pura, por ejemplo, más de aproximadamente el 95 % de pureza; o purificada o enriquecida de algún modo a partir de su entorno natural. La referencia a la “pertactina aislada” indica una proteína pertactina retirada de su entorno natural, tal como de un animal/perro huésped, en un medio de cultivo, o purificada a partir de una preparación de células completas de *Bordetella bronchiseptica* y que posteriormente se puede añadir de nuevo a la composición que comprende extracto de *Bordetella bronchiseptica* (es decir, a la que se han añadido aislados de pertactina). El término “aislado” engloba
- 15
- 20 inmunógenos que están en solución con otros agentes/diluyentes/excipientes/adyuvantes/proteínas.

- “Medicamento” se refiere a cualquier agente útil en la prevención, la cura o la mejora de una afección médica, o la prevención de algunas manifestaciones o afecciones fisiológicas.
- 25

- Tal como se usa en el presente documento, “anticuerpo monoclonal” se refiere a anticuerpos producidos por una única línea de células de hibridoma, todos dirigidos contra un epítipo sobre un antígeno en particular. Se puede proporcionar el antígeno usado para preparar el anticuerpo monoclonal como
- 5 una proteína aislada del patógeno o como el patógeno completo. Un “hibridoma” es una línea celular clonal que consiste en células híbridas formadas por la fusión de una línea de mieloma y una célula productora de anticuerpos específica. En general, los anticuerpos monoclonales son de origen murino. No obstante, anticuerpo monoclonal también se refiere a una población
- 10 clonal de un anticuerpo preparada contra un epítipo en particular de un antígeno producido por tecnología de presentación en fagos, o un procedimiento que sea equivalente a la presentación en fagos, o células híbridas de origen no murino.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, administración “oral” o “peroral” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través de o por medio de la boca, e implica la deglución o el transporte de la sustancia a través de la mucosa oral (p. ej., absorción sublingual o bucal) o ambos. La vía intratraqueal también es
- 20 un medio de administración oral o peroral.

Tal como se usa en el presente documento, administración “oronasal” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una composición o vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través de o por medio de la nariz y la boca, como se

25 produciría, por ejemplo, al colocar una o más gotitas en la nariz. La

administración oronasal implica procesos de transporte asociados con la administración oral e intranasal.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “patógeno” o “microorganismo patógeno” significa un microorganismo (por ejemplo, CPIV, CAV-2, CRCoV, *Mycoplasma cynos*, CIV o *Bordetella bronchiseptica*) que es capaz de inducir o provocar una enfermedad, síndrome o estado anómalo en el animal que lo alberga, preferentemente una enfermedad respiratoria, tal como el CERL.

Tal como se usa en el presente documento, “pertactina” se refiere a una proteína de la membrana externa de las bordetelas. Preferentemente, la pertactina es de *B. bronchiseptica* y lo más preferentemente, es “p68” y está codificada por el gen *prnA*. La pertactina se puede aislar en su forma nativa a partir de *Bordetella bronchiseptica*, o se puede producir de forma recombinante. En la patente de EE. UU. N.º 7.736.658, cuyo contenido se incorpora en el

presente documento por referencia, se proporcionan secuencias y ejemplos de pertactina. El antígeno de pertactina usado en el presente documento incluye formas lipidadas de la proteína.

- 5 “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a sustancias que, en el ámbito del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, conmensuradas con una proporción razonable de beneficio y riesgo y eficaces para su uso pretendido.

10

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

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

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” significa

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

Tal como se usa en el presente documento, “evitar la infección” significa evitar
5 o inhibir la replicación de las bacterias o virus que provocan la enfermedad
identificada, inhibir la transmisión de las bacterias o virus, evitar que las
bacterias o virus se establezcan en su huésped o aliviar los síntomas de la
enfermedad provocados por la infección. El tratamiento se considera
terapéutico si hay una reducción de la carga bacteriana o vírica.

10

Tal como se usa en el presente documento, “protección”, “proteger”,
“inmunidad protectora” y similares con respecto a una vacuna u otra
composición, significa que la vacuna o composición evita o reduce los síntomas
de la enfermedad provocada por el microorganismo del que deriva(n) el/los
15 antígeno(s) usado(s) en la vacuna o composición. Los términos “protección”,
“proteger” y similares, también significan que se puede usar la vacuna o
composición para “tratar” la enfermedad, o uno o más síntomas de la
enfermedad, que ya existe en un sujeto.

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

por lo tanto, es diferente de la administración intranasal o la peroral.

Los términos “unión específica”, “se une específicamente” y similares, se definen como dos o más moléculas que forman un complejo que se puede
5 medir bajo condiciones de ensayo o fisiológicas y es selectivo. Se dice que un anticuerpo u otro inhibidor “se une específicamente” a una proteína si, bajo condiciones apropiadamente seleccionadas, tal unión no se inhibe sustancialmente, mientras que al mismo tiempo se inhibe la unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es
10 selectiva para el compuesto o la proteína. La unión no específica normalmente tiene baja afinidad. La unión de anticuerpos IgG, por ejemplo, se caracteriza por lo general por una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o mayor, tal como al menos aproximadamente 10^{-8} M o mayor, o la menos aproximadamente 10^{-9} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-10} o mayor,
15 o al menos aproximadamente 10^{-11} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor. El término también es aplicable, p. ej., cuando un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo en particular que no cuenta con numerosos antígenos portadores, en cuyo caso, por lo general, el anticuerpo portador del dominio de unión a antígeno no se unirá a otros antígenos.

20

Tal como se usa en el presente documento, “fragmento inmunógeno específico” se refiere a una parte de una secuencia reconocible por un anticuerpo o linfocito T específico para esa secuencia.

25 Tal como se usa en el presente documento, “sujeto” se refiere a cualquier

animal que tenga un sistema inmunitario, lo que incluye mamíferos, tales como perros.

Tal como se usa en el presente documento, “sustancialmente idénticas” se
5 refiere a un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 %.

10 Tal como se usa en el presente documento, “vacuna de subunidades” y “composición de subunidades” se refiere a un tipo de vacuna o composición que incluye antígenos (pero no todos los antígenos) derivados de u homólogos a, antígenos de un patógeno de interés, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Una composición o vacuna de este tipo está sustancialmente libre de
15 células de patógeno o partículas patógenas intactas o del lisado de dichas células o partículas. Por tanto, se puede preparar una vacuna de subunidades o composición de subunidades a partir de polipéptidos inmunógenos al menos parcialmente purificados o sustancialmente purificados a partir del patógeno o sus análogos. Los procedimientos de obtención de un antígeno o antígenos de
20 la vacuna de subunidades o composición de subunidades incluyen técnicas ordinarias de purificación, producción recombinante o síntesis química. Por tanto, una “vacuna de subunidades” o “composición de subunidades” se refiere a una vacuna o composición que consiste en un componente o componentes antigénicos definidos de un virus, bacteria u otro inmunógeno.
25 Preferentemente, el componente de subunidad de la presente invención se

produce de forma recombinante y lo más preferentemente es pertactina (p68).

“TCID₅₀” se refiere a la “dosis infectiva en cultivo tisular” y se define como la dilución de un virus necesaria para infectar el 50 % de un lote dado de cultivos
5 celulares inoculados. Se pueden usar diversos procedimientos para calcular la TCID₅₀, incluido 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 B. W. Mahy y H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

10

Tal como se usa en el presente documento, “agente terapéutico” 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, enfermedad o afección vírica, bacteriana, parasitaria o fúngica
15 originada de este modo.

Tal como se usa en el presente documento, “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna o composición que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto (p. ej., perro) que recibe el antígeno o
20 vacuna o composición, que es adecuada para evitar o mejorar signos o síntomas de enfermedad, incluidos efectos adversos para la salud o complicaciones de los mismos, provocados por una infección con un patógeno, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Se puede inducir inmunidad humoral o inmunidad mediada por células, o tanto inmunidad humoral como
25 inducida por células. Se puede evaluar la respuesta inmunogénica de un

animal frente a un antígeno, vacuna o composición indirectamente a través de la medida de valores de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del seguimiento de signos y síntomas después de la exposición a la cepa natural. Se puede evaluar la inmunidad protectora

5 conferida por una vacuna o composición midiendo la reducción de la presencia de microorganismos inmunógenos y/o la reducción de los signos clínicos, tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, salud y comportamiento del sujeto. La cantidad de una vacuna o composición que es terapéuticamente eficaz puede variar en función del inmunógeno en particular

10 usado o de la afección del sujeto, y la puede determinar un experto en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, “tratar” o “que trata” se refiere a invertir, aliviar, inhibir la progresión de, o evitar un trastorno, afección o

15 enfermedad al que se aplica tal término, o evitar uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere al acto de “tratar”, como se define justo anteriormente.

20

Tal como se usa en el presente documento, “vacuna” o “composición de vacuna” se refiere a una composición inmunógena seleccionada de entre virus o bacterias, modificados vivos, atenuados o muertos, o una vacuna de subunidades o cualquier combinación de lo mencionado anteriormente. La

25 administración de la vacuna a un sujeto da lugar a una respuesta inmunitaria.

La vacuna se puede introducir directamente en el sujeto por cualquier vía de administración conocida, incluidas las vías parenteral, peroral y similares. Los términos significan una composición que evita o reduce una infección, o que evita o reduce uno o más signos o síntomas de infección. Normalmente, los efectos protectores de una composición de vacuna contra un patógeno se logran induciendo en el sujeto una respuesta inmunitaria. En general, la supresión o reducción de la incidencia de infección, la mejora de los signos o síntomas, o la eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicativos de los efectos protectores de una composición de vacuna. Las composiciones de vacuna de la presente invención proporcionan efectos protectores contra infecciones provocadas por patógenos de enfermedades respiratorias caninas.

Tal como se usa en el presente documento, “veterinariamente aceptable” se refiere a sustancias que, en el ámbito del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de animales sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, conmensuradas con una proporción razonable de beneficio y riesgo, y eficaces para su uso pretendido.

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

Antígenos, composiciones inmunógenas y vacunas

La presente divulgación se basa en el descubrimiento inesperado de que la inclusión de antígenos de pertactina aislados junto con una preparación de *Bordetella bronchiseptica* da lugar a mejora sustancial de la eficacia y la seguridad. Es decir, cuando se administra por vía parenteral a un perro antes
5 de la exposición bacteriana, la composición evita la aparición de la traqueobronquitis y no da lugar a efectos secundarios adversos.

La presente invención también proporciona composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden uno o más virus y bacterias o subunidades que son
10 adecuados para su administración a un cánido para el tratamiento contra el CERL. El coronavirus respiratorio canino (CRCoV) que engloba la presente invención se puede caracterizar como un coronavirus presente en las vías respiratorias de perros con enfermedades respiratorias infecciosas. En el plano filogenético, el CRCoV guarda una estrecha relación con el coronavirus bovino
15 (BCoV), el coronavirus humano (HCoV) cepa OC43 y el virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante (HEV); el coronavirus canino entérico (CCoV) solo guarda una relación lejana con el CRCoV. Un ejemplo representativo de un CRCoV adecuado para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada como CRCoV cepa 4182 (Erles et al., Virus Res., 124:78-87, 2007).

20

Los antígenos de la gripe que engloba la presente invención pueden ser cualquier cepa de virus de la gripe identificada, de cualquier ave o mamífero, incluidos, pero sin limitación, el virus de la gripe con el subtipo H3 de hemaglutinina y el subtipo N8 de neuraminidasa, o el subtipo H3N8,
25 denominado más comúnmente virus H3N8. La gripe puede ser de origen

mamífero o aviar, incluidos, pero sin limitación, los orígenes porcino, equino o canino. En un modo de realización se usa un antígeno de gripe canina. En un modo de realización se usa un antígeno de gripe equina. En un modo de realización, se usa una cepa con los subtipos de glucoproteínas denominados

5 H3 o N8. En un modo de realización, se usa una cepa que tiene tanto el subtipo de glucoproteína H3 como el N8.

Los antígenos de gripe que engloba la presente invención se pueden aislar a partir de perros, caballos, cerdos y aves, tanto domésticos como salvajes. Los

10 animales escogidos para la toma de muestras deberán presentar síndromes clínicos agudos y/o subagudos, que pueden incluir síntomas respiratorios de leves a graves y fiebre. Los animales también pueden mostrar signos de anorexia y letargo. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos de aislamiento de virus, que incluyen: inocular cultivos celulares de mamíferos

15 o aves, inocular huevos embrionados con muestras de moco nasal o faríngeo de especímenes clínicos, recogida pasando un bastoncillo de algodón por las fosas nasales o la garganta, o recogida de tejidos tales como el bazo, el pulmón, las amígdalas y lavado hepático y pulmonar. Se puede observar el efecto citopático del virus en el cultivo celular. Se puede probar la capacidad

20 del líquido alantoideo o los lisados celulares para aglutinar eritrocitos humanos, de pollo, pavo o cobaya, presuntas pruebas de la presencia de un virus de la gripe.

Un ejemplo representativo de una cepa del virus de la gripe canina (CIV)

25 adecuada para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada

como A/canine/Iowa/9A1/B5/08/D12, que se depositó como PTA-7694 el 29 de junio de 2006 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Una cepa representativa de antígeno del CIV es la cepa del virus CIV de la vacuna comercial Vanguard® CIV

5 (Pfizer). La presente invención también engloba vacunas que comprenden una cepa identificada como cepa de gripe equina A/Equine/2/Miami/1/63. Esta cepa está depositada en la ATCC con el número de acceso VR 317. Son ejemplos adicionales de virus de la gripe para su uso en la presente invención

A/canine/Iowa/13628/2005, A/Equine/Kentucky/1998,

10 A/Equine/Kentucky/15/2002, A/Equine/Ohio/1/2003, A/Equine/Kentucky/1/1994, A/Equine/Massachusetts/213/2003, A/Equine/Wisconsin/2003, A/Equine/NewYork/1999 y A/Equine/Newmarket/A2/1993. Otras cepas y/o aislados preferentes del CIV incluyen los divulgados en las patentes de EE. UU. n.º 7.959.929 (en particular las cepas y secuencias de HA

15 identificadas en ella como Jacksonville/2005, Miami/2005, FL/242/03 y Florida/43/04), 7.384.642, 7.572.620 y 7.468.187, cuyos contenidos, incluidas todas las secuencias, en particular las secuencias de HA, y cepas, se incorporan en el presente documento por referencia como si se describieran en su totalidad en el presente documento. Adicionalmente, una cepa del CIV

20 adecuada para su uso en el presente documento incluye el aislado del CIV Colorado descrito en Barrell et al., J. Vet. Intern. Med., 24 (6), 1524-1527 (2010), con número de acceso ADW41784.

El virus paragripal canino (CPIV) que engloba la presente invención se puede

25 caracterizar como uno de los virus que se sabe que son un agente causante

asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa de antígeno del CPIV es la cepa del virus CPI atenuado de la vacuna comercial Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Otra cepa representativa de antígeno del CPIV es la cepa del CPI atenuado que tiene la denominación "NL-CPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

El adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2) englobado por la presente invención se puede caracterizar como uno de los virus de los que también se sabe que son un agente causante asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa de antígeno del CAV-2 es la cepa del virus CAV-2 atenuado de la vacuna comercial Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Una cepa representativa de antígeno del CAV-2 es la cepa del CAV-2 atenuado denominada la cepa "Manhattan" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

El *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) que engloba la presente invención se describe en Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004 y es la única especie de micoplasma asociada comúnmente con enfermedades respiratorias. Se describen composiciones inmunógenas contra *M. cynos* en el documento US 2007/0098739, incorporado en el presente documento por referencia.

20

El componente de *Bordetella bronchiseptica* que engloba la presente invención se puede caracterizar como el agente causante bacteriano asociado con la tos de las perreras. Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden ser una o más de: una *Bordetella bronchiseptica* viva atenuada, una vacuna bacteriana de *Bordetella bronchiseptica* o un

25

extracto bacteriano. Adicionalmente, la composición también incluye, preferentemente, un antígeno de subunidad aislado de *Bordetella bronchiseptica*.

- 5 En un modo de realización se prepara la *Bordetella bronchiseptica* como un sonificado de células completas purificado por cromatografía en columna como se establece en la solicitud de patente n.º 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
- 10 de material antigénico extraído de células de *Bordetella bronchiseptica*. Otro ejemplo de *Bordetella bronchiseptica* es la cepa de *bronchiseptica* B-C2 viva atenuada presente en Nobivac® y/o la cepa de *bronchiseptica* viva de Intra-Trac®, Bronchi-Shield®, Naramune™, Recombitek®, Univac y/o Kennel-Jec™.
- 15 Adicionalmente, también está presente, preferentemente, una subunidad (es decir, complementada), en combinación con el componente de *Bordetella bronchiseptica*. Un ejemplo representativo de la subunidad es un antígeno de pertactina aislado, preferentemente, un antígeno de *Bordetella bronchiseptica* p68, en particular el antígeno de *Bordetella bronchiseptica* p68 recombinante
- 20 que reconoce el anticuerpo monoclonal específico de p68 Bord 2-7 (descrito en el documento US 7.736.658, incorporado en el presente documento por referencia) y en un modo de realización preferente, tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en el documento US 7.736.658 o tiene homología con ella.

Preferentemente, el antígeno de pertactina p68 recombinante se prepara en forma soluble, de modo que durante el procesamiento se conserva o se restablece la estructura nativa. En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona una pertactina p68 recombinante que está sustancialmente libre de
5 agregados (menos de aproximadamente el 80 %, el 90 %, el 95 % o incluso el 99 %). En otro modo de realización se solubiliza la pertactina p68 recombinante 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, se puede purificar el antígeno p68, tal como a través de cromatografía en columna. Se describe un procedimiento de
10 solubilización de este tipo en Surinder *et al.*, J. Bioscience and Bioengineering, v. 99(4), págs 303-310 (2005).

Los antígenos de pertactina usados en el presente documento también incluyen formas lipidadas. Se proporcionan ejemplos de producción de
15 proteínas lipidadas en Erdile *et al.*, Infection and Immunity, (1993) v. 61(1) págs. 81-90, incorporado por referencia. Los procedimientos divulgados en él se pueden usar para preparar proteínas de pertactina con modificaciones postraduccionales que contienen un resto lipídico unido.

20 Además, en otro modo de realización, una composición inmunógena comprende *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno Bsp22 aislado. En otro modo de realización, la composición inmunógena comprende *Bordetella bronchiseptica*, un antígeno de pertactina aislado y comprende además un antígeno Bsp22 aislado. Se puede preparar el antígeno Bsp22 como se
25 establece en Medhekar *et al.*, Molecular Microbiology (2009) 71(2), 492–504.

Preferentemente, el antígeno Bsp22 aislado está presente junto con (es decir, añadido a) un extracto de *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado, específicamente p68 recombinante. "Bsp22" también incluye formas lipidadas del antígeno. Se proporcionan ejemplos de producción de proteínas lipidadas en Erdile et al., *Infection and Immunity*, (1993) v. 61(1) págs. 81-90, incorporado por referencia. Los procedimientos divulgados en él se pueden usar para preparar proteínas Bsp22 con modificaciones postraduccionales que contienen un resto lipídico unido.

- 10 Los virus que engloba la presente invención se pueden propagar en células, líneas celulares y células huésped. Dichas células, líneas celulares o células huésped pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, células de mamíferos y células que no son de mamíferos, incluidas células de insectos y células vegetales. Las células, líneas celulares y células huésped en las que se
- 15 pueden propagar los virus que engloba la presente invención se conocen fácilmente y son fácilmente accesibles para los expertos en la técnica.

Las bacterias que engloba la presente invención se pueden cultivar y propagar usando diversos medios de cultivo conocidos por los expertos en la técnica,

20 incluidos tanto medios de cultivo de caldo (líquidos) como de agar (sólidos; semisólidos). Algunas bacterias también se pueden cultivar y propagar en células de mamíferos o células que no son de mamíferos.

Los virus y bacterias que engloba la presente invención se pueden atenuar o

25 inactivar antes de su uso en una composición inmunógena o vacuna. Los

expertos en la técnica conocen bien los procedimientos de atenuación e inactivación. Los procedimientos de atenuación incluyen, pero sin limitación, paso en serie en cultivo celular en una línea celular adecuada (virus y algunas bacterias), paso en serie en caldo de cultivo (bacterias), irradiación ultravioleta
5 (virus y bacterias) y mutagénesis química (virus y bacterias). Los procedimientos para la inactivación vírica o bacteriana incluyen, pero sin limitación, el tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL) o etilenimina binaria (BEI), u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

- 10 La inactivación por formalina se puede realizar mezclando la suspensión que contiene el microorganismo con formaldehído al 37 % hasta una concentración final de formaldehído del 0,5 %. La mezcla de microorganismo-formaldehído se mezcla por agitación constante durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de microorganismo inactivada se prueba
15 después para determinar los microorganismos vivos residuales realizando un ensayo del crecimiento en una línea celular o un medio de cultivo adecuados.

Para algunos antígenos, se puede realizar la inactivación por BEI mezclando la suspensión que contiene el microorganismo de la presente invención con BEI
20 (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) 0,1 M hasta una concentración final de BEI de 1 mM. Para otros antígenos, la concentración final de BEI es de 2 mM. Un experto en la técnica conocerá la concentración apropiada que se debe usar. La mezcla de virus-BEI se mezcla por agitación constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de
25 tiosulfato de sodio 1,0 M hasta una concentración final de 0,1 mM. Se continúa

mezclando durante dos horas más. La mezcla que contiene el microorganismo inactivado se prueba para determinar el virus vivo residual realizando un ensayo del crecimiento en una línea celular o un medio de cultivo adecuados.

- 5 Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden incluir uno o más vehículos veterinariamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo veterinariamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes,
- 10 agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros conocidos por los expertos en la técnica. Los estabilizantes incluyen albúmina,
- 15 entre otros conocidos por el experto en la técnica. Los conservantes incluyen mertiolato, entre otros conocidos por el experto en la técnica.

- El adyuvante puede ser metabolizable, en referencia a adyuvantes que consisten en componentes que puede metabolizar la especie objetivo tales
- 20 como adyuvantes a base de aceite vegetal. Un adyuvante metabolizable puede ser un aceite metabolizable. Los aceites metabolizables son grasas y aceites presentes normalmente en plantas y animales, y habitualmente consisten en gran medida en mezclas de triacilgliceroles, también conocidos como triglicéridos o grasas neutras. Estas sustancias apolares, insolubles en agua,
- 25 son triésteres de ácidos grasos de glicerol. Los triacilgliceroles difieren en

función de la identidad y ubicación de sus tres residuos de ácido graso o cadenas laterales.

El adyuvante también puede ser no metabolizable, en referencia a adyuvantes
5 que consisten en componentes que no puede metabolizar el organismo 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 correspondientes ácidos y alcoholes, los
éteres y ésteres de los mismos, y mezclas de los mismos. Preferentemente, los
10 compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburo ligeros, es
decir, estos compuestos tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite se
puede preparar por síntesis o purificar a partir de productos del petróleo. Los
aceites no metabolizables preferentes para su uso en las composiciones
descritas en el presente documento incluyen aceite mineral, queroseno y
15 cicloparafinas, por ejemplo. El término “aceite mineral” se refiere a un aceite
adyuvante no metabolizable que es una mezcla de hidrocarburos líquidos
obtenida a partir de vaselina por medio de una técnica de destilación. El
término es sinónimo de “vaselina licuada”, “vaselina líquida” y “vaselina filante”.
También se pretende que el término incluya “aceite de vaselina fluido”, es decir,
20 un aceite que se obtiene de manera similar por destilación de la vaselina, pero
que tiene una densidad ligeramente inferior que la vaselina filante. El aceite
mineral se puede obtener de diversas fuentes comerciales, por ejemplo, J.T.
Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite de
vaselina fluido está disponible en el mercado con el nombre DRAKEOL®.

Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, el sistema adyuvante Emulsigen (MVP Laboratories; Ralston, NE), el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, p. ej., los adyuvantes de

5 Freund completo e incompleto, copolímeros de 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 lípido-amina Avridine, enterotoxina

10 termolábil de *E. coli* (recombinante u otra), toxina del cólera, muramil dipéptido, copolímero de bloque /tensioactivo de escualeno/plurónico (SP-oil), sulfolipobeta-ciclodextrina (SL-CD), liposomas que contienen un inmunomodulador (p. ej., CpG o poly I:C), muramil dipéptido (MDP), iscomatrix (Quil A/fosfatidilcolina), CpG/DEAE-dextrano/aceite mineral (TXO), CpG,

15 triterpenoides (p. ej., Quil A u otra preparación de saponina purificada o parcialmente purificada), esteroides (p. ej., colesterol), agentes inmunomoduladores (p. ej., bromuro de dimetil dioctadecil amonio - DDA), polímeros (p. ej., poli(ácido acrílico) tal como CARBOPOL[®]) y estimuladores de Th2 (p. ej., glucolípidos tales como Bay R1005[®]), y combinaciones de los

20 mismos, entre muchos otros adyuvantes conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos no limitantes de diversas combinaciones que se pueden usar incluyen un triterpenoide más un esteroide (p. ej., Quil A/colesterol, también conocido

25 como QAC), un triterpenoide más un esteroide, un agente inmunomodulador y un

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

5

El experto en la técnica puede determinar fácilmente las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención. En un modo de realización, la presente invención contempla composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden de desde
10 aproximadamente 20 µg hasta aproximadamente 2000 µg de adyuvante. En otro modo de realización, se incluye el adyuvante en una cantidad de desde aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 1500 µg, o desde aproximadamente 250 µg hasta aproximadamente 1000 µg, o desde aproximadamente 350 µg hasta aproximadamente 750 µg. En otra realización,
15 se incluye en adyuvante en una cantidad de aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición inmunógena o vacuna.

Las composiciones inmunógenas y vacunas también pueden incluir antibióticos. Tales antibióticos incluyen, pero sin limitación, los de las clases de
20 aminoglucósidos, carbapenémicos, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. En un modo de realización, la presente invención contempla composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden de desde aproximadamente 1 µg/ml hasta aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico. En otro modo de realización, las
25 composiciones inmunógenas y vacunas comprenden de desde

aproximadamente 5 µg/ml hasta aproximadamente 55 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 10 µg/ml hasta aproximadamente 50 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 15 µg/ml hasta aproximadamente 45 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 20 µg/ml hasta aproximadamente 40 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 25 µg/ml hasta aproximadamente 35 µg/ml de antibiótico. En otro modo de realización más, las composiciones inmunógenas y vacunas comprenden menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibiótico.

- 10 Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden incluir una o más moléculas polinucleotídicas que codifican un virus o bacteria, o proteína vírica o bacteriana. Se pueden usar moléculas de ADN o ARN en las composiciones inmunógenas o vacunas. La molécula de ADN o ARN se puede administrar en ausencia de otros agentes o se puede
- 15 administrar junto con un agente que facilita la incorporación celular (p. ej., liposomas o lípidos catiónicos). En general, el total de polinucleótido en la composición inmunógena o vacuna estará entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml. En otro modo de realización, el total de polinucleótido en la composición inmunógena o vacuna será de desde
- 20 aproximadamente 1 µg/ml hasta aproximadamente 4,0 mg/ml, o desde aproximadamente 10 µg/ml hasta aproximadamente 3,0 mg/ml, o desde aproximadamente 100 µg/ml hasta aproximadamente 2,0 mg/ml. En la técnica se han descrito bien las vacunas y procedimientos de vacunación que usan ácidos nucleicos (ADN o ARNm), por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º
- 25 5.703.055, en la patente de EE. UU. N.º 5.580.859, en la patente de EE. UU.

N.º 5.589.466, la totalidad de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Además de los virus o bacterias descritos anteriormente, las composiciones
 5 inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención pueden incluir otros
 antígenos adicionales. Los antígenos pueden estar en forma de una
 preparación completa o parcial inactivada del microorganismo, o en forma de
 moléculas antigénicas obtenidas por técnicas de ingeniería genética o de
 síntesis química. Otros antígenos apropiados para su uso de acuerdo con la
 10 presente invención incluyen, pero sin limitación, los derivados de virus
 patógenos tales como el virus del moquillo canino, herpesvirus canino, virus de
 la gripe canina, virus de la rabia, bacterias patógenas tales como *Leptospira*
bratislava, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira*
icterohaemorrhagiae, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, especies del
 15 género *Porphyromonas*, especies del género *Bacteriodes*, especies del género
Borrelia, especies del género *Streptococcus*, incluida *Streptococcus equi*
 subespecie *zooepidemicus*, especies del género *Ehrlichia*, especies del género
Mycoplasma, incluida *Mycoplasma cynos*, y *Microsporum canis*. También se
 pueden obtener antígenos de hongos patógenos tales como *Candida*,
 20 protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*,
Toxoplasma gondii, especies del género *Eimeria*, especies del género *Babesia*,
 especies del género *Giardia*, especies del género *Leishmania*, o helmintos tales
 como *Taenia*, *Cuterebra*, *Echinococcus* y especies del género *Paragonimus*.

25 **Formas, dosificación, vías de administración**

Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención se pueden administrar a animales para inducir una respuesta inmunitaria eficaz el CERI. En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos de estimulación de una respuesta inmunitaria eficaz mediante la administración
5 a un animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena o vacuna descrita en el presente documento.

Las composiciones inmunógenas y vacunas descritas en el presente documento se pueden administrar a un animal para vacunar al sujeto animal
10 contra el CERI. Las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden administrar al animal para evitar o tratar el CERI en el animal. En consecuencia, en el presente documento se describen procedimientos de vacunación de un animal contra el CERI y de prevención o tratamiento del CERI que comprenden administrar al animal una cantidad terapéuticamente
15 eficaz de una composición inmunógena o vacuna descrita en el presente documento.

Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención se pueden preparar de diversas formas en función de la vía de administración.
20 Por ejemplo, las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden preparar en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles adecuadas para uso inyectable, o se pueden preparar en formas liofilizadas usando técnicas de criodesecación. Normalmente, las composiciones inmunógenas y vacunas liofilizadas se mantienen a aproximadamente 4 °C y se pueden reconstituir en
25 una solución estabilizante, p. ej., solución salina o HEPES, con o sin

adyuvante. Las composiciones inmunógenas y vacunas también se pueden preparar en forma de suspensiones o emulsiones.

Las composiciones inmunógenas y vacunas que engloba la presente invención
5 incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los
microorganismos descritos anteriormente. Los virus y/o bacterias purificados se
pueden usar directamente en una composición inmunógena o vacuna, o se
pueden atenuar adicionalmente o inactivar. Normalmente, una composición
inmunógena o vacuna contiene entre aproximadamente 1×10^2 y
10 aproximadamente 1×10^{12} partículas víricas 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
aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 partículas, o entre
aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 partículas. Un experto en la
15 técnica puede determinar la cantidad precisa de un microorganismo en una
composición inmunógena o vacuna eficaz para proporcionar un efecto
protector.

En general, las composiciones inmunógenas y vacunas comprenden un
20 vehículo veterinariamente aceptable en un volumen de entre aproximadamente
0,5 ml y aproximadamente 5 ml. En otro modo de realización, el volumen del
vehículo está entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 4 ml, o entre
aproximadamente 2 ml y aproximadamente 3 ml. En otro modo de realización,
el volumen del vehículo es de aproximadamente 1 ml, o es de
25 aproximadamente 2 ml, o es de aproximadamente 5 ml. Pueden ser vehículos

veterinariamente aceptables adecuados para su uso en composiciones inmunógenas y vacunas todos los descritos anteriormente en el presente documento.

- 5 Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente si es necesario atenuar o inactivar un virus o bacteria antes de su administración. En otro modo de realización de la presente invención, se puede administrar directamente un virus o bacteria a un animal sin atenuación adicional. La cantidad de un microorganismo que es terapéuticamente eficaz puede variar en función del
- 10 microorganismo en particular usado, la afección del animal y/o el grado de infección, y la puede determinar un experto en la técnica.

- De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, se puede administrar a los animales una dosis individual, o, alternativamente, pueden
- 15 tener lugar dos o más inoculaciones con intervalos de desde aproximadamente dos hasta aproximadamente diez semanas. Pueden ser necesarios tratamientos de refuerzo y se puede ajustar la pauta posológica para proporcionar una inmunización óptima. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la pauta posológica óptima.

20

- Las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden administrar directamente en el torrente circulatorio, en el músculo, en vísceras o bajo la piel. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen las administraciones intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea. Los
- 25 dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de

aguja (incluidos los de microaguja) e inyectores sin aguja.

Normalmente, las formulaciones parenterales son soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, hidratos de carbono y agentes
5 tamponadores (preferentemente a un pH de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 9, o desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8, o desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7,5, o desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular
10 más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma desecada para su uso junto con un vehículo adecuado, tal como agua sin pirógenos estéril o solución salina.

La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por
15 ejemplo, por liofilización, se puede llevar a cabo fácilmente usando técnicas farmacéuticas ordinarias bien conocidas por los expertos en la técnica.

La solubilidad de los materiales usados en la preparación de soluciones parenterales se puede incrementar mediante el uso de técnicas de formulación
20 apropiadas conocidas por el experto en la técnica, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad, incluidos tampones, sales, tensioactivos, liposomas, ciclodextrinas y similares.

Las composiciones para administración parenteral se pueden formular para que
25 sean de liberación inmediata o modificada. Las formulaciones de liberación

modificada incluyen liberación retardada, mantenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada. Por tanto, las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden formular como un sólido, un semisólido o un líquido tixotrópico para su administración como un depósito implantado que proporciona liberación

5 modificada de las composiciones inmunógenas y vacunas.

Otros medios de administración de la composición inmunógena o vacuna incluyen la administración por inyección con microaguja o sin aguja (p. ej., Powderject™, Bioject™, etc.).

10

En casos en los que se usa la inyección subcutánea o intramuscular, es preferente una formulación isotónica. En general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En casos particulares, se usan soluciones isotónicas tales como la

15 solución salina tamponada con fosfato. Las formulaciones pueden englobar además estabilizantes tales como gelatina y albúmina. En algunos modos de realización, se añade a la formulación un agente vasoconstrictor. En general las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se proporcionan estériles y sin pirógenos. No obstante, los expertos en la técnica

20 saben bien que las formulaciones para el vehículo farmacéuticamente aceptable son los vehículos farmacéuticos aprobados en las normativas promulgadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, o una instancia gubernamental equivalente en un país extranjero tal como Canadá o México, o cualquiera de las naciones europeas, para cualquier vacuna canina,

25 composiciones inmunógenas y vacunas de subunidades polipeptídicas (de

antígeno), vacunas de vectores víricos recombinantes y vacunas de ADN. Por lo tanto, el vehículo farmacéuticamente aceptable para la producción comercial de las composiciones inmunógenas o vacunas es un vehículo que ya está aprobado o lo aprobará la administración gubernamental apropiada en Estados Unidos o en un país extranjero. Las composiciones inmunógenas y vacunas se pueden mezclar además con un adyuvante que sea farmacéuticamente aceptable. En determinadas formulaciones de las composiciones inmunógenas y vacunas, se combina la composición inmunógena o vacuna con otras composiciones inmunógenas o vacunas caninas para producir un producto polivalente que pueda proteger al cánido de una amplia variedad de enfermedades provocadas por otros patógenos caninos.

Procedimientos de detección y diagnóstico

El alcance y la naturaleza de las respuestas inmunitarias inducidas en el animal se pueden evaluar usando diversas técnicas. Por ejemplo, se pueden recoger sueros de los animales inoculados y someterlos a pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para los inmunógenos. La detección de linfocitos T citotóxicos (CTL) de respuesta en tejidos linfáticos, indicador de la inducción de una respuesta inmunitaria celular, se puede lograr mediante ensayos tales como los de proliferación de linfocitos T. Las técnicas pertinentes están bien descritas en la técnica.

Kits

Dado que puede ser deseable administrar una composición inmunógena o vacuna en combinación con composiciones o compuestos adicionales (por

ejemplo, con el fin de tratar una enfermedad o afección en particular), está dentro del alcance de la presente invención que, de forma conveniente, una composición inmunógena o vacuna puede estar incluida en, o combinada en, forma de un kit adecuado para la administración o coadministración de las composiciones.

Así, los kits que engloba la presente invención pueden comprender una o más composiciones farmacéuticas independientes, al menos una de las cuales es una composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, y un medio para mantener separadas dichas composiciones, tal como un recipiente, un frasco dividido o un envase de lámina metálica dividido. Un ejemplo de un kit de este tipo es una jeringuilla y una aguja, y similares. Un kit de la presente invención es particularmente adecuado para administrar diferentes formas farmacéuticas, por ejemplo, oral o parenteral, para administrar las composiciones independientes a intervalos de dosificación diferentes, o para valorar las composiciones independientes una frente a la otra. Para ayudar a la administración de una composición que engloba la presente invención, normalmente, el kit comprende instrucciones para la administración.

Otro kit que engloba 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 para detectar la presencia de microorganismos completos, polipéptidos, epítomos o secuencias polinucleotídicas. La presencia de virus, bacterias, polipéptidos o secuencias

polinucleotídicas se puede determinar usando anticuerpos, PCR, hibridación y otros procedimientos de detección conocidos por los expertos en la técnica.

Otro kit que engloba la presente invención puede proporcionar reactivos para la
5 detección de anticuerpos frente a epítomos particulares. Estos reactivos son útiles para analizar una muestra para detectar la presencia de anticuerpos y los conocen fácilmente y están fácilmente disponibles para el experto en la técnica. La presencia de anticuerpos se puede determinar usando procedimientos de detección ordinarios conocidos por los expertos en la técnica.

10

En determinados modos de realización, los kits pueden incluir un juego de instrucciones impresas o una etiqueta que indique que el kit es útil para la detección de animales infectados.

15 **Anticuerpos**

Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o recombinantes. Los anticuerpos se pueden preparar contra el inmunógeno o contra una parte del mismo. Por ejemplo, se pueden aislar y usar como inmunógeno un péptido sintético basado en la secuencia de aminoácidos del inmunógeno, o preparado
20 de forma recombinante por técnicas de clonación, o el producto génico natural y/o partes del mismo. Se pueden usar inmunógenos para producir anticuerpos mediante tecnología ordinaria de producción de anticuerpos bien conocida por los expertos en la técnica. También se pueden preparar fragmentos de anticuerpo a partir de los anticuerpos por procedimientos conocidos por los
25 expertos en la técnica, e incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv.

En la producción de anticuerpos, se puede llevar a cabo la selección del anticuerpo deseado por procedimientos ordinarios en inmunología conocidos en la técnica. En general, los tipos de inmunoensayos preferentes son ELISA y la transferencia de bandas Western. Los expertos en la técnica conocen bien ambos ensayos. En los ensayos se pueden usar tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Como se conoce bien en la técnica, se puede unir el anticuerpo a un sustrato de soporte sólido, conjugarlo con un resto detectable, o unirlo y conjugarlo. También se conoce bien en la técnica la unión de anticuerpos a un sustrato de soporte sólido. Los restos detectables que se contemplan para su uso en la presente invención pueden incluir, pero sin limitación, marcadores fluorescentes, metálicos, enzimáticos y radioactivos tales como biotina, oro, ferritina, fosfatasa alcalina, b-galactosidasa, peroxidasa, ureasa, fluoresceína, rodamina, tritio, ^{14}C y yodación.

15

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero en modo alguno se limita, mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Inmunogenicidad de una vacuna de subunidades de extracto bacteriano de *Bordetella bronchiseptica*.

Se incluyeron en el estudio treinta y dos Beagle de aproximadamente 8 semanas de edad con *Bordetella bronchiseptica* baja (valores de anticuerpo microaglutinador (MAT) de ≤ 16). Se repartió a los cachorros aleatoriamente en dos grupos de tratamiento (T1 y T2) de 16 cada uno. Se retiró un cachorro del

25

T2 antes de la primera vacunación debido a una hernia inguinal.

Tabla 1. Diseño del estudio

Grupo	Vacuna	N	Vacunación			Exposición		
			Volumen ml	Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis/Perro	Vía
T1	Solución salina	16	1,0	0 y 21	SC	42	6,4x10 ⁸ UFC	Intranasal
T2	Vacuna de subunidades- Extracto de <i>B. bronchiseptica</i>	15	1,0				(unidades formadoras de colonias)	Aerosolización en la cámara

- 5 Se vacunó a los perros por vía subcutánea (SC) con la vacuna apropiada en los días 0 y 21, de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 1. A cada perro se le administraron las vacunas en la región del hombro derecho para la primera vacunación y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

10

- En el día 42, se expuso a los perros de todos los grupos de tratamiento a *B. bronchiseptica* por vía intranasal mediante el uso de aerosolización en una cámara de plexiglás durante 30 minutos. Se expuso a cuatro perros (2 del T1 y 2 del T2) al mismo tiempo, con la excepción de un grupo, que tenía únicamente
- 15 3 animales (dos del T1 y uno del T2) porque se había retirado un animal del estudio anteriormente.

La variable principal de eficacia fue la tos. Todas las demás variables (rinorrea, secreción ocular, estornudos, depresión, arcadas, respiración) se consideraron

variables secundarias de apoyo. Se realizaron observaciones clínicas para detectar signos de enfermedad respiratoria, incluida la tos, dos veces al día ("períodos de observación"; a.m. y p.m.), durante aproximadamente 30 minutos en cada habitación por cada sesión, desde el día 42 y hasta el día 70 (finalización del estudio). Se calculó para cada animal si un animal tosía durante dos períodos de observación tras la exposición o no. Se calculó una distribución de la frecuencia de tos/sin tos durante dos períodos de observación consecutivos para cada tratamiento. Se analizó la tos/sin tos durante dos períodos de observación consecutivos con una prueba de Cochran-Armitage, ajustando para cada habitación, dado que no era posible analizar los datos con un modelo mixto lineal generalizado. Se calcularon las distribuciones de la frecuencia de aislamiento bacteriano nasal (+/-) para cada tratamiento y punto temporal. También se determinó para cada animal si en algún momento se le aislaron o no bacterias tras la exposición.

15

Se calculó una distribución de la frecuencia de si a un animal se le habían aislado en algún momento *B. bronchiseptica* tras la exposición para cada tratamiento y se analizó con un modelo mixto lineal generalizado, cuando fue posible. Se calculó la duración de la presencia nasal tras la exposición para cada animal y se analizó con un modelo mixto lineal general. Los valores de anticuerpos se transformaron logarítmicamente y se analizaron usando un modelo mixto lineal general para medidas repetidas.

20

Resultados: No se observó dolor o fiebre ($\geq 39,5$ °C) en ninguno de los perros tras la vacunación. Se observó que algunos perros de ambos grupos de

25

tratamiento se rascaban en el momento de la vacunación. Se observaron hinchazones por inyección de tamaño pequeño (2x2x1 cm) únicamente en dos perros del T2 durante las 3-6 horas de observación posteriores a la primera vacunación. Los datos indican que la vacuna era segura y que los perros la
5 toleraron bien.

Todos los controles con solución salina presentaron tos, lo que indican una exposición adecuada. La media de los mínimos cuadrados (MC) de la duración de la tos del grupo de control fue de 20,3. En contraste, la vacuna redujo
10 significativamente la duración de la tos hasta una media de MC de 5,2 en los vacunados con un valor de $p < 0,0001$. Adicionalmente, se redujeron otros signos clínicos respiratorios, tales como las arcadas y la respiración, en los vacunados en comparación con los controles.

15 Los datos de aislamiento bacteriano tras la exposición mostraron que la vacuna de prueba reducía significativamente la duración de la presencia nasal del microorganismo inmunógeno en el grupo vacunado (media de MC de 20,5) en comparación con los controles con solución salina (media de MC de 25,3) con un valor de p de 0,0061. Los datos indican que la vacuna es eficaz en la
20 reducción del grado de infección, como confirma la reducción de la duración de la presencia en los vacunados.

Las respuestas de anticuerpos generadas tras la vacunación (días 21 y 42) en el grupo T2 fueron similares a las del T1, probablemente debido a la naturaleza
25 del ensayo de anticuerpos aglutinadores, y no a la carencia de antigenicidad.

En el día 70 se observó que en la mayoría de los vacunados se indujo una fuerte respuesta anamnésica tras la vacunación (media de MC de 426) en comparación con el control con solución salina (media de MC de 13), lo que indica una inmunización eficaz.

5

Tomados conjuntamente, los datos de este estudio indican claramente que la vacuna de subunidades de extracto bacteriano de *Bordetella bronchiseptica* demostró eficacia por la reducción de la duración de la tos y la presencia nasal.

10 **Ejemplo 2: Evaluación de la eficacia y la seguridad de una vacuna de *Bordetella bronchiseptica* inyectable.**

Se incluyeron en el estudio cincuenta perros Beagle, aproximadamente a las 8 semanas de edad. Se repartió a los perros en 5 grupos de 10 cada uno. Todos los animales tenían un estado de salud general bueno y no recibieron ninguna
15 vacunación de *Bordetella*. Las muestras de suero previas a la selección dieron resultados negativos para *B. bronchiseptica*, con valores <16 por la prueba de microaglutinación (MAT) antes de la primera vacunación. Mediante una prueba de aislamiento bacteriano de hisopos nasales antes de la primera vacunación (día 0) se determinó que ninguno de los animales tenía *B. bronchiseptica*.

20

Tabla 2. Diseño del estudio

Grupo	Producto en fase de investigación clínica veterinaria (PIV)	N	Vacunación			Exposición		
			Volumen ml	Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis/Perro	Vía
T01:	Solución salina	10	1,0	0 y 21	SC	42	5,4x10 ⁸ UFC (unidades formadoras de colonias)	Intranasal Aerosolización en la cámara
T02	Extracto bacteriano de <i>B. bronchiseptica</i> / pertactina (10µg) / QCDC	10	1,0	0 y 21	SC			
T03	Vacuna comercial de extracto de <i>B. bronchiseptica</i> modificada con adyuvante	10	1,0	0 y 21	SC			
T04	Pertactina (10µg) / QCDC	10	1,0	0 y 21	SC			
T05	Vacuna intranasal comercial	10	0,5	0	IN			

Se vacunó a los animales con la vacuna apropiada en los días 0 y 21, de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 2. Las vacunas de los grupos T01, T02, T03 y T04 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. El grupo T05 recibió una única vacunación intranasal de una vacuna intranasal disponible comercialmente en el día 0. Este grupo fue vacunado en último lugar para evitar la propagación de la vacuna viva por las instalaciones, y se alojó a los perros de este grupo por separado en una habitación distinta para evitar la exposición a otros grupos.

En el día 42, se expuso a los perros de todos los grupos de tratamiento a *Bordetella bronchiseptica* por vía intranasal mediante el uso de aerosolización en una cámara de plexiglás durante un total de 30 minutos. Se expuso a cinco perros de cada recinto (uno de cada grupo de tratamiento) al mismo tiempo.

La variable principal de eficacia fue la tos; el aislamiento bacteriano fue la variable secundaria. Se realizaron observaciones clínicas para detectar signos de enfermedad respiratoria, incluida la tos, dos veces al día (“períodos de observación”; a.m. y p.m.), durante aproximadamente 30 minutos en cada habitación por cada sesión, desde el día 42 y hasta el día 62 y una vez (a.m.) en el día 63 (finalización del estudio). Antes del análisis de la tos, se transformó el porcentaje de períodos de observación con tos con una transformación de raíz cuadrada del arcoseno. El porcentaje de períodos de observación transformado y el número de días con tos se analizaron con un modelo mixto lineal general. Para cada animal se calcularon el porcentaje de períodos de observación tras la exposición en los que un animal tose y el número de días tras la exposición con tos.

Resultados: Se observaron hinchazones de leves a moderadas en los sitios de

inyección de perros del grupo de tratamiento T02 y T04 (datos no mostrados). La intensidad de las reacciones y el número de perros afectados aumentaron después de la segunda vacunación. Se observaron reacciones leves en el sitio de inyección en unos pocos perros del grupo de tratamiento T03. No se observó ninguna hinchazón por inyección medible en el grupo de solución salina T01. No se observó fiebre sintomática ($\geq 39,5$ °C), excepto en un perro del grupo T02 en el día 4 tras la vacunación. No se observó dolor en ninguno de los perros vacunados.

- 10 La inoculación del inmunógeno de *B. bronchiseptica* indujo tos en todos los controles no vacunados (el 53,3 % y tosieron 14,7 días), lo que indica que la exposición era adecuada para evaluar las vacunas de prueba. Los resultados obtenidos para el grupo T05, que recibió la vacuna intranasal comercial (control positivo), mostraron que se observó tos en el 4,6 % hasta 2 días tras la
- 15 exposición, lo que apunta a que el grado de exposición es óptimo y no excesivo.

En este estudio se evaluaron tres formulaciones de prueba. En el T02 se observó tos en el 16,1 % hasta 6 días tras la exposición, en el T03 se observó

20 tos en el 34,7 % hasta 10,5 días tras la exposición y en el T04 se observó tos en el 34,5 % hasta 10,7 días tras la exposición. En consecuencia, todos los grupos vacunados mostraron puntuaciones de tos reducidas en comparación con los controles no vacunados. El grupo T02 vacunado con un extracto bacteriano de *B. bronchiseptica*, con adición de pertactina y con QCDC como

25 adyuvante, demostró una reducción estadísticamente significativa en los

criterios de puntuación de la tos. Por tanto, la eficacia de la formulación probada en el T02 resultó eficaz.

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

Para el estudio se seleccionaron cincuenta (50) perros, repartidos en 5 grupos de tratamiento. Basándose en una exploración física en el día -4 se determinó que los animales eran adecuados para el estudio.

- 10 En los días -2, 21 y 28 antes de cada vacunación se recogieron muestras de sangre (de aproximadamente 8 ml) para la serología en tubos SST de todos los animales del estudio. Las muestras de suero recogidas en el día -2 se usaron para confirmar que los animales no tenían *B. bronchiseptica*. En el día 0 antes de la vacunación se recogieron hisopos nasales y se sometieron a pruebas
- 15 para detectar la presencia de *B. bronchiseptica*. Comenzando en el día -4 se tomaron las temperaturas timpánicas para establecer un valor inicial antes de la vacunación.

- En los días 0, 21 y 28 se vacunó a los animales con la vacuna apropiada de
- 20 acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 3. A cada perro se le administraron las vacunas por vía subcutánea en la región del hombro derecho para la primera vacunación y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

Tabla 3. Diseño del estudio

Grupo	PIV	N	Vacunación ¹			Exposición ²		
			Vol (ml)	Días del estudio	Vía	Día del estudio	Dosis objetivo/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 rehidratada con <i>B. bronchiseptica</i> (inactivada) + pertactina (10 µg) Sin adyuvante	10	1,0	0 y 28				
T05	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 rehidratada con agua (diluyente)	10	1,0	0 y 28				

¹ El producto en fase de investigación clínica veterinaria (PIV) se administró por vía subcutánea (SC).

² Dosis de exposición objetivo de 10⁹ microorganismos de cepa de *Bordetella bronchiseptica*.

En los días de vacunación 0, 21 y 28 se observó a todos los animales para
5 evaluar las reacciones en el sitio de inyección tras la vacunación. Desde los
días 1 hasta 7 y 22-35 se les observó a diario para evaluar las reacciones tras

la vacunación. En los días de 0 a 7 y de 21 a 35 se tomaron las temperaturas timpánicas.

En el día 55, un día antes de la exposición, se recogieron muestras de sangre
5 (de aproximadamente 6 ml) para serología. En los días 54, 55 y 56 antes de la
exposición se tomaron las temperaturas timpánicas. En el día 55, un día antes
de la vacunación, se recogieron hisopos nasales y se sometieron a pruebas
para detectar la presencia de *B. bronchiseptica*. Se observó a los animales dos
veces al día (a.m. y p.m.), aproximadamente 30 minutos cada sesión en los
10 días 54 y 55, y a.m. en el día 56, para detectar signos clínicos de enfermedad
respiratoria, con el fin de establecer valores iniciales.

Se usó *Bordetella bronchiseptica* (cepa inmunógena) para preparar una dosis
de exposición objetivo de 10^9 UFC/4 ml/perro. En el día 56, se expuso a los
15 perros de todos los grupos de tratamiento a *B. bronchiseptica* por vía intranasal
mediante el uso de aerosolización en una cámara de plexiglás durante un total
de 30 minutos para cada recinto expuesto. Se expuso a cinco perros de cada
recinto (uno de cada grupo de tratamiento) al mismo tiempo.

20 Desde el día 56 hasta el 77 se registraron las temperaturas timpánicas una vez
al día. Se realizaron observaciones clínicas dos veces al día (a.m. y p.m.),
durante aproximadamente 30 minutos en cada habitación por cada sesión,
desde el día 56 y hasta el día 76 y una vez (a.m.) en el día 77. Brevemente, se
observaron la tos, la rinorrea, los estornudos, la secreción ocular, las arcadas y
25 la depresión usando el siguiente sistema de puntuación: ausente (0), leve (1),

moderado (2) e intenso (3). En los días 59, 62, 66, 69, 74, 76 y 77 se recogieron hisopos nasales para determinar la presencia de microorganismos inmunógenos.

- 5 En el día 77 se recogieron muestras de sangre (de aproximadamente 6 ml) para serología. Se tomaron hisopos nasales para el aislamiento de *B. bronchiseptica* usando bastoncillos de algodón y medios de transporte.

- Se determinaron los anticuerpos aglutinantes frente a *B. bronchiseptica*
10 mediante la prueba de microaglutinación (MAT). Se valoraron muestras de suero de los grupos de tratamiento T04 y T05 de los días 0, 28, 55 y 77 para determinar los anticuerpos frente al CRCoV por neutralización sérica e IFA, y para el CIV por HAI. El aislamiento de *B. bronchiseptica* a partir de hisopos nasales se realizó de acuerdo con el procedimiento ordinario. Se sometió a
15 prueba cada muestra cualitativamente para determinar la presencia o ausencia de bacterias.

- Resultados.** Mediante aislamiento por cultivo de hisopos nasales se confirmó que cincuenta (50) cachorros de Beagle sanos de aproximadamente 8
20 semanas de edad no tenían microorganismos de *B. bronchiseptica* en el día 0. Las muestras de suero evaluadas para detectar anticuerpos aglutinantes frente a *B. bronchiseptica* por MAT confirmaron que todos los cachorros eran sensibles con valores de MAT de ≤ 8 en el día -2.

- 25 Todas las vacunas experimentales evaluadas en este estudio produjeron

hinchazones de leves a moderadas después de la primera vacunación. En la mayoría de los vacunados las hinchazones por inyección se limitaron al día 0 del estudio. También se observaron hinchazones por inyección de leves a moderadas después de la segunda vacunación. Cuando se produjeron, las hinchazones en el sitio de inyección desaparecieron entre uno y tres días después de la segunda vacunación. Se observó rascado de forma predominante en el grupo combinado de 5 elementos (T04). No se observó fiebre sintomática después de las vacunaciones. No se observaron hinchazones en el grupo de solución salina. Los datos confirmaron la seguridad de las vacunas.

El recuento de colonias realizado antes de la inoculación de inmunógeno confirmó que se aerosolizaron un promedio de $1,45 \times 10^8$ UFC de *Bordetella* por perro en la cámara. La inoculación del inmunógeno indujo tos en todos los perros de control con solución salina (T02) con un porcentaje medio de observación de tos del 43,5 % y 12,2 con tos. El grupo de tratamiento T05, vacunado únicamente con los 4 elementos víricos (CRCoV/CIV/CPIV/CAV2) sin antígeno de *Bordetella* padeció tos de forma similar al control con solución salina con un porcentaje medio de tos observada del 43,4 % y 12,2 días de tos. Estos descubrimientos indican que la exposición era adecuada y consistente para evaluar las vacunas de prueba.

Los perros del grupo de tratamiento T01 vacunados con la vacuna de *Bordetella* estaban significativamente protegidos contra el inmunógeno (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 les administró con una pauta posológica a intervalos de 3 semanas (5,8 días de tos, $p=0,0004$). La reducción de las puntuaciones de tos en estos dos grupos (T01 frente a T03) no fue significativamente diferente (valor de $p=0,1883$), lo que sugiere que el grado de protección para la vacuna dada con un intervalo de 3 o 4 semanas es similar.

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

15

La evaluación serológica de las fracciones víricas de la vacuna combinada de 5 elementos fue posible únicamente para dos fracciones, el CIV y el CRCoV, donde se confirmó que los perros eran seronegativos en el día -2 del estudio. La respuesta de HAI para el CIV en el grupo con la vacuna de 4 elementos (T04) en el día 56 del estudio fue numéricamente similar a la del grupo de la vacuna de 5 elementos (T05) e indica que no hay interferencia de la fracción de *Bordetella* con el antígeno del CIV. Las respuestas de SN del CRCoV en el día 56 del estudio fueron numéricamente superiores en el grupo de la vacuna de 4 elementos (T04) que en el grupo de la vacuna de 5 elementos (T05), lo que indica una posible interferencia de la *Bordetella* con la fracción del CRCoV. No

25

obstante, estos descubrimientos no son concluyentes, dado que estas vacunas no tenían adyuvantes y la formulación no estaba optimizada y no se realizó la exposición al CRCoV para probar la eficacia.

- 5 Se confirmó que la vacuna monovalente de *Bordetella* era segura y eficaz. La eficacia de la vacuna monovalente se demostró cuando se administró la vacuna a intervalos de 21 o 28 días. También se demostró que la fracción de *Bordetella* era eficaz al administrarla en una vacuna combinada de 5 elementos sin adyuvante.

10

Ejemplo 4. Estudio serológico multivalente

- Se realizó una selección previa en cuarenta perros, de aproximadamente 8 semanas de edad en buen estado general de salud, para detectar *Bordetella bronchiseptica* por la prueba de microaglutinación (MAT), y coronavirus
- 15 respiratorio canino (CRCoV) por ensayo de anticuerpos por fluorescencia indirecta (IFA). También se usó la neutralización sérica (SN) para evaluar los niveles de anticuerpos. En el día 0, todos los perros presentaron resultados negativos para anticuerpos frente a *Bordetella bronchiseptica* determinados por MAT (≤ 16), y negativos para anticuerpos frente al CRCoV determinados por
 - 20 IFA (< 40). Asimismo, ninguno de los perros tenía *Bordetella bronchiseptica* ni CRCoV, determinado mediante una prueba de aislamiento en hisopos nasales antes de la primera vacunación (día 0).

- Se repartieron los perros en 5 grupos de tratamiento de 8 perros cada uno y se
- 25 les vacunó de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la tabla 4. A cada

perro se le administraron las vacunas en la región del hombro derecho para la primera vacunación y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación.

5 Tabla 4. Diseño del estudio

Grupo de tratamiento	Producto en fase de investigación clínica veterinaria (PIV)	Adyuvante	N	Vacunación ¹	
				Días del estudio	Vía
T01:	CAV2/CPIV/CPV/L4	Rehydragel al 5 %	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	EMA al 1 % ¹ / Neocryl al 3 %/ Emulsigen SA al 5 %	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 etilenmaleico

Después de la segunda vacunación, debido a complicaciones, se retiraron del estudio los grupos T04 y T05. Se observó a los perros de los grupos restantes (T01, T02 y T03) a diario para detectar reacciones tras la vacunación y se realizó un seguimiento de la temperatura corporal (timpánica) durante 7 días

después de cada vacunación. En los días 0, 21, 42 y 56 se recogieron muestras de sangre de los perros para medir las respuestas de anticuerpos.

Se sometieron a pruebas las muestras de suero de los días 0, 21, 42 y 56 para
5 detectar anticuerpos aglutinantes frente a *Bordetella bronchiseptica* mediante el ensayo MAT. También se valoraron las muestras de suero de los mismos días para determinar los anticuerpos frente al CRCoV por neutralización sérica, para el CIV por HAI y para los anticuerpos frente al CAV-2 y el CPI por neutralización sérica. Para cada grupo de tratamiento se obtuvieron las medias
10 geométricas de los valores de anticuerpos.

Resultados:

Las vacunas de prueba de los grupos T02 y T03 indujeron respuestas de anticuerpos en todos (100 %) los perros vacunados después de la segunda
15 dosis, lo que indica una inmunización activa contra los antígenos víricos. En la mayoría de los perros vacunados la respuesta de anticuerpos aumentó después de la segunda vacunación, lo que indica un efecto de refuerzo de la segunda vacunación. Cabe destacar que las respuestas de anticuerpos entre las fracciones víricas se logró en presencia de múltiples antígenos víricos y
20 bacterianos (*B. bronchiseptica*), lo que indica una ausencia de interferencia inmunológica. La serología de MAT no es correlativa con la protección contra *Bordetella*, sino que es una valiosa herramienta de selección para la inclusión de animales de estudio adecuados. En conclusión, basándose en la respuesta inmunológica en los perros vacunados, se predice la eficacia de los antígenos
25 víricos de la vacuna multivalente de 5 elementos.

Ejemplo 5. Estudio de la duración de la inmunidad

A. Monovalente:

El propósito de este estudio es demostrar la duración de la inmunidad de una
5 vacuna de subunidades de extracto de *Bordetella bronchiseptica* en perros de 8
semanas de edad contra un inmunógeno virulento de *B. bronchiseptica*.

Todos los animales están en buen estado general de salud y no han recibido
ninguna vacunación de *Bordetella*. Los animales tienen valores bajos (≤ 16) o
10 nulos de anticuerpos frente a *B. bronchiseptica*, determinado por la prueba de
microaglutinación (MAT) antes de la primera vacunación. Además, ninguno de
los animales tiene *B. bronchiseptica*, determinado mediante una prueba de
aislamiento bacteriano de hisopos nasales antes de la primera vacunación.

15 Se reparten los perros en 2 grupos de tratamiento; un grupo recibe una vacuna
de placebo y el otro un extracto de *B. bronchiseptica* complementado con un
antígeno recombinante. El antígeno es pertactina, Bsp22, o ambos. Se vacuna
a los animales dos veces, con una separación de aproximadamente 3-4
semanas. Después de cada vacunación, se les observa para detectar
20 reacciones en el sitio de inyección.

Aproximadamente 6-12 meses después de la vacunación, se expone a los
perros de todos los grupos de tratamiento por aerosolización con *Bordetella
bronchiseptica*. Antes y después de la exposición se determinan la dosis de
25 inmunógeno y la pureza del inóculo inmunógeno. Se realizan observaciones

clínicas previamente y después de la exposición.

Se recogen hisopos nasales para el aislamiento de *B. bronchiseptica*. Se recoge sangre de cada animal para obtener suero. Se determinan los anticuerpos aglutinantes frente a *B. bronchiseptica* por MAT. Se valoran las muestras de suero para detectar la respuesta de anticuerpos IgG específicos de pertactina usando ELISA. Se realiza el aislamiento de *B. bronchiseptica* a partir de hisopos nasales de acuerdo con el procedimiento ordinario.

- 10 La tos, el aislamiento de *Bordetella* (tras la exposición) y la respuesta serológica tras la vacunación son los criterios usados para evaluar la eficacia de la vacuna en el estudio.

B. Multivalente:

- 15 El propósito de este estudio es demostrar la duración de la inmunidad de una vacuna combinada 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, ya sea pertactina, Bsp22, o ambos.

Todos los animales están en buen estado general de salud y no han recibido ninguna vacunación para ninguno de los patógenos contra los ha de proteger la vacuna diseñada. Se reparten los perros en varios juegos de grupos de tratamiento. Cada juego consiste en dos grupos de tratamiento, un grupo de

control que recibe una vacuna de placebo y un grupo vacunado que recibe la vacuna de prueba. Se vacuna a los animales dos veces, con una separación de aproximadamente 2-4 semanas. Después de cada vacunación, se les observa para detectar reacciones en el sitio de inyección.

5

Aproximadamente 6-12 meses después de la vacunación, se expone a cada juego de dos grupos de tratamiento (vacunados y de control) a uno de los patógenos contra los que ha de proteger la vacuna diseñada). Se realizan observaciones clínicas previamente y después de la exposición. Durante el
10 periodo posterior a la exposición se recogen hisopos nasales para el aislamiento del patógeno inmunógeno. Se recoge sangre de cada animal para obtener suero, que se usa para estudios analíticos posteriores. Los signos clínicos de enfermedad respiratoria, la presencia de patógenos tras la exposición y las respuestas serológicas se usan como criterios para evaluar la
15 eficacia de las vacunas.

Una vez descritos en detalle diversos modos de realización de la presente invención, se ha de entender que la invención definida por las reivindicaciones adjuntas no debe quedar limitada a los detalles particulares descritos en la
20 descripción anterior, dado que son posibles muchas variaciones evidentes de los mismos sin alejarse del espíritu o el alcance de la presente invención.

Todas las referencias anteriores se incorporan en el presente documento por referencia como si se describieran en su totalidad en el presente documento.

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende *Bordetella bronchiseptica* y
5 un antígeno de pertactina aislado.
2. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que dicho antígeno de pertactina es una proteína de *Bordetella bronchiseptica*.
- 10 3. La composición inmunógena de la reivindicación 2, en la que dicho antígeno de pertactina es una proteína p68 recombinante.
4. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la *Bordetella bronchiseptica* es una vacuna bacteriana o un extracto
15 bacteriano.
5. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición no tiene adyuvantes.
- 20 6. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antígeno de pertactina está presente en entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 30 µg.
7. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones
25 anteriores, en la que dicho antígeno de pertactina se prepara solubilizando

cuerpos de inclusión de pertactina en urea y en la que la composición está sustancialmente libre de agregados de antígenos de pertactina.

8. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones
5 anteriores, en la que el antígeno de pertactina está lipidado.

9. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un diluyente o excipiente para su administración parenteral a un perro.

10

10. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un antígeno Bsp22 aislado, opcionalmente lipidado.

15 11. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un antígeno de un patógeno respiratorio canino seleccionado del grupo que consiste en: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV), *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) y el virus de la
20 gripe canina (CIV).

12. La composición inmunógena de la reivindicación 11, en donde dicha composición comprende al menos dos, tres o cuatro de los antígenos del patógeno respiratorio canino.

25

13. La composición inmunógena de la reivindicación 11, en donde dicha composición comprende antígenos del virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

5

14. Una composición inmunógena que comprende una pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes, en donde dicha composición está sustancialmente libre de agregados de p68.

10 15. La composición inmunógena de la reivindicación 14, en la que dicha pluralidad de antígenos de pertactina p68 recombinantes se preparan solubilizando cuerpos de inclusión de pertactina en urea y, opcionalmente, purificándolos por cromatografía en columna.

15 16. Uso de la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el tratamiento o la prevención de la infección por un patógeno respiratorio canino en un perro.

17. El uso de la reivindicación 16, en el que dicha composición evita la
20 infección por dicho patógeno respiratorio canino en dicho perro durante un periodo de 6 meses o más.

18. El uso de la reivindicación 16 o 17, en el que el patógeno respiratorio canino es *Bordetella bronchiseptica*.

25

19. El uso de la reivindicación 18, en el que el patógeno respiratorio canino comprende además al menos uno, dos, tres o cuatro de: el virus paragripal canino (CPIV), el adenovirus canino 2 (CAV-2), el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) y el virus de la gripe canina (CIV).

5

20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19, para el tratamiento o la prevención del complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CERI), en el que la composición trata o evita la infección por una pluralidad de dichos patógenos.

10

21.

Resumen

En el presente documento se proporcionan composiciones, combinaciones y
5 procedimientos que comprenden *Bordetella bronchiseptica* y pertactina aislada,
que son eficaces en el tratamiento o la prevención de infecciones respiratorias,
tales como la tos de las perreras, en animales.

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. 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)
VIII-2-1(i i)		PFIZER INC. is entitled as employer of the inventor, GALVIN, Jeffrey E.

PCT

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application PFIZER INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/439,597 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from ABDELMAGID, Omar Yousif to PFIZER INC., dated 11 February 2011 (11.02.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from BRICKER, Joseph Michael to PFIZER INC., dated 15 February 2011 (15.02.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from SHIELDS, Shelly Lynn to PFIZER INC., dated 15 February 2011 (15.02.2011)

From the INTERNATIONAL BUREAU

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

To:

KLEIMAN, Gabriel, L.
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 PC71708A	
International application No. PCT/IB2012/050512	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 THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

Applicant: ZOETIS LLC
International Application No.: PCT/IB2012/050512
International Filing Date: 03 February 2012
Docket No.: PC71708A
Title: IMMUNOGENIC BORDETELLA BRONCHISEPTICA
COMPOSITIONS

Mail Stop PCT
Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

REQUEST FOR THE RECORDING OF CHANGE PURSUANT TO RULE 92bis

Dear Sir:

ZOETIS LLC, herewith submits a **Request for the Recording of Change Pursuant to Rule 92bis** for International Application No. PCT/IB2012/050512.

Applicant ZOETIS LLC hereby requests the following change of Applicant and Applicant Address be recorded in International Patent Application No. PCT/IB2012/050512:

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 07932

Respectfully Submitted,



Barbara L. Renda, Reg No. 27,626
Attorney for Applicant
Zoetis LLC
100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07932
Telephone No.: 973-443-2904
Facsimile No.: 973-966-3602

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC71708A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2012/050512	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. _____
- ☐ 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/IB2012/050512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/295 C07K14/235 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 C07K

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, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/082012 A1 (SHIELDS SHELLY L [US] ET AL) 12 April 2007 (2007-04-12) paragraph [0002] paragraph [0066] paragraph [0108] paragraph [0113]	11-13, 19,20
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	1-20
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 ----- -/-	1-20



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/IB2012/050512

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 -----	1-20
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] -----	1-20
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 -----	1-20
X	WO 01/90143 A2 (PASTEUR INSTITUT [FR]; GUIO MACLOUF NICOLE [FR]; BOURSAUX EUDE CAROLI) 29 November 2001 (2001-11-29) -----	1-7,9, 14-18
Y	page 3, paragraph 3 page 16, paragraph 5 page 17, lines 12-14 claims 52,49 -----	8,10-13, 19,20
A	US 2004/185062 A1 (DOMINOWSKI PAUL J [US] ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23) paragraph [0062] - paragraph [0065] paragraph [0067] -----	1-20
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 -----	1-20
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 -----	1-20
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/050512

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	10
Y	----- ERDILE LORNE F ET AL: "Role of attached lipid in immunogenicity of Borrelia burgdorferi OspA", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 61, no. 1, 1993, pages 81-90, XP009158475, ISSN: 0019-9567 abstract -----	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/050512

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/IB2012/050512

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