



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 396**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/118** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

**C07K 16/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04743211 .7**

96 Fecha de presentación : **01.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1638599**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54

Título: **Composición de vacuna para vacunar a los perros contra la enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC).**

30

Prioridad: **01.07.2003 GB 0315323**

73

Titular/es: **The Royal Veterinary College  
University of London, Royal College Street  
London NW1 0TU, GB**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.04.2011**

72

Inventor/es: **Brownlie, John;  
Chalker, Victoria Jane y  
Erles, Kerstin**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.04.2011**

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 396 T3

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

## DESCRIPCIÓN

La presente invención trata de una composición de vacuna y en particular en una composición de vacuna para el uso contra enfermedades respiratorias infecciosas caninas.

5 La enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC) es una enfermedad altamente contagiosa común en los perros de casa y en condiciones donde existe multitud de ellos como en centros de reacomodación, de internamiento y centros de entrenamiento. Muchos perros sufren sólo de una tos suave y se recuperan después de un corto tiempo, sin embargo en algunos casos puede desarrollarse una bronconeumonía (Appel y Binn, 1987). ERIC es raramente mortal pero puede retrasar la reacomodación de perros en centros de rescate y puede causar el trastorno en perreras de entrenamiento con un coste de tratamiento considerable.

10 La patogénesis de ERIC se considera que puede ser multifactorial, involucrando muchos virus y bacterias. Los agentes infecciosos que se consideran que son los mayores causantes patógenos de ERIC son los parainfluenzavirus caninos (CPIV)-(Binn et al, 1967), adenovirus canino tipo 2 (CAV-2) (Ditchfield et al, 1962), y herpesvirus canino (CHV) (Karpas et al, 1968 a y 1986b), coronavirus respiratorio canino (CRCV) (WO 2004/011651 (The Royal Veterinary Collage) y Erles et al, 2003) y la bacteria Bordetella Bronchiseptica (B. bronchiseptica) (Bemis et al, 1977a Keil et al, 1998).

15 Estos virus y bacterias han sido frecuentemente aislados durante los brotes y han sido mostrados para causar los síntomas respiratorios o lesiones de pulmón en infecciones experimentales (Appel y Percil 1970, Swango et al, 1970, Karpas et al, 1986b).

20 También, reovirus humanos y especies micoplasmáticas han sido aisladas de perros con síntomas de ERIC (Lou y Wenner 1963, Randolph et al, 1993). Además, factores como el estrés pueden ser importantes.

25 B. bronchiseptica fue descubierta como un agente primario etiológico en la enfermedad respiratoria "tos de las perreras" (Bemis et al, 1977b y Thompson et al, 1976). Ello predispone que los perros sean influenciados por otros agentes respiratorios y frecuentemente existe al mismo tiempo con ellos. La tos de las perreras puede reproducirse por un cambio virulento de B. bronchiseptica. Además, los factores medioambientales tales como frío, aire, y alta humedad, típicas condiciones en perreras, incrementan la susceptibilidad a la enfermedad (Ejlis et al, 2001). Los antibióticos son generalmente reconocidos como agentes pobres para tratar la enfermedad primaria (Ellis et al, 2001). En contraste, la inmunopropilaxis para B. bronchiseptica proporciona una eficacia relativa media para ayudar al control de esta enfermedad.

30 Los síntomas externos de la infección de B. bronchiseptica es una tos seca, violenta, la cual es agravada por la actividad o excitación. La tos ocurre en paroxismos, seguida de arcadas para intentar limpiar pequeñas cantidades de mocos de la garganta. La temperatura corporal puede ser elevada a medida que tiene lugar una invasión secundaria bacteriana. Como la tos de las perreras es altamente contagiosa, la enfermedad puede ser rápidamente transmitida a perros susceptibles y produce una severa tos. Los más importantes signos salen al principio de dos a cinco días después de la infección, pero puede continuar en periodos ampliados. El stress, particularmente en condiciones medioambientales adversas, podría causar una recaída durante etapas posteriores de la enfermedad.

35 La tos de las perreras es típicamente una condición de vías respiratorias superiores y caracterizadas por secreción nasal y tos. Mientras que la tos de las perreras implica cambios en las vías respiratorias superiores, la patología ERIC indica que está involucrada en los daños al pulmón y, en algunos casos, bronconeumonía. La tos de las perreras es un síndrome más suave que ERIC y no tiene el ancho rango de patología descrita en ERIC. ERIC es también distinguido por un incremento en la severidad y mortalidad.

40 ERIC es un síndrome en perros que se presenta con signos respiratorios en un rango que va desde una enfermedad suave hasta la muerte. Se caracteriza por involucrar en la enfermedad las vías respiratorias superiores e inferiores con una progresión de patología desde inflamatoria hasta exudativa, edematosa y algunas veces hemorrágica que puede extenderse dentro del tejido pulmonar. ERIC puede también ocurrir en ausencia B. bronchiseptica, y en efecto algunos perros contraen ERIC al tiempo que no tienen B. bronchiseptica detectable, la cual indica que la tos de las perreras y ERIC son distintas infecciones.

45 Nosotros también hemos confirmado la asociación de B. bronchiseptica con las enfermedades respiratorias mientras que se concluye que otros agentes están involucrados en las enfermedades respiratorias (Chalker et al, 2003).

50 Nosotros ahora hemos demostrado que el Streptococcus equisug especies zoepidemicus (vea ejemplo 1), Micoplasma cynos (vea ejemplo 2), y un Chlamydomphila (vea ejemplo 3), están asociados con ERIC. Como todos los perros en nuestro estudio de población fueron vacunados contra CPIV y CAV-2, no teníamos nuevos datos para apoyar la implicación de estos virus en el ERIC. Sin embargo hemos encontrado un incremento en la prevalencia del herpesvirus canino en perros con síntomas de respiración graves (vea ejemplo 4).

55 El Streptococcus equi sub especies zoepidemicus (S. zoepidemicus) es un patógeno oportunista el cual es aislado frecuentemente de una variedad de animales huéspedes, no solo de caballos. Es a menudo encontrado como un comensal de las vías respiratorias superiores en la extensión de las mucosas de mamíferos (Timoney et al, 1998; Quinn et al, 1999) y ha sido asociado con múltiples síndromes de enfermedades incluyendo la enfermedad de

las vías respiratorias inferiores, neumonía de potro y cervicitis en caballos (Chanter, 1997; Biberstein y Hirsh, 1999), neumonía en llamas (Biberstein y Hirsh, 1999), septicemia y artritis en cerdos (Timoney, 1987), mastitis en vacas y cabras (Timoney et al, 1988), septicemia en aves de corral, pericarditis y neumonía en ovejas (Timoney, 1987), limfadenitis en cobayas (Quinn et al, 1999), glomerulonefritis en humanos (Balter et al, 2000) y meningitis en humanos (Ural et al, 2003). En perros, la *S. zooepidemicus* ha sido asociada con infecciones cruzadas y septicemia (Quinn et al, 1999) y neumonía hemorrágica necrótica aguda (Garnett et al, 1982).

Aunque los perros en sus últimas etapas de neumonía hemorrágica estreptocócica (NHE) comparte algunas características histológicas con perros con ERIC, este no es el caso en sus etapas iniciales (vea Chalker et al, 2003) y los trombos sépticos están presentes en NHE (Garnett et al, 1982). NHE tiene una rápida aparición que era mortal en la mayoría de los casos sin signos clínicos, donde el ERIC solo lo vimos como una aparición lenta con amplio rango de signos clínicos desde mucosidad nasal, tos, estornudos, arcadas, inapetencia, neumonía y bronconeumonía.

*Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) ha estado asociada con la infección del conducto urinario canino (Jang et al, 1984). Ello ha sido identificado en los pulmones de un perro con el moquillo (Rosendal, 1978), y la inoculación endobronquial de *M. cynos* fue encontrada para inducir neumonía en perros (Rosendal & Vinther, 1977).

El moquillo canino descrito por Rosendal (1978) es una compleja enfermedad seguida de una infección con el virus de moquillo canino, varias especies de *Mycoplasma* y la bacteria *Pseudomonas*. Esto es una combinación poderosa de desafíos microbianos y, no sorprendentemente, resulta en neumonía. La proporción de la patología se debe al *Mycoplasma* spp, y no fue claro. Posteriormente al desafío con *m. cynos* fue caracterizado sin ninguna señal de enfermedad en los perros aunque algunas lesiones inflamatorias locales pequeñas fueron halladas en 4 de cada 5 perros inoculados. La significancia de *M. cynos* en este síndrome fue, como Rosendal lo planteó, "dificultad para evaluar".

Las especies de *Chlamydia* asociadas con ERIC están muy relacionadas con *Chlamydia abortus* (*C. abortus*) por comparación de la secuencia de 218 nucleótidos en los 23 genes de ARNr. La secuencia de nucleótidos de esta región en estas especies de *Chlamydia* (SEQ ID NO: 1) es idéntica en más del 99% para el *C. abortus*, 98.6% idéntico para el *Chlamydia psittaci* y 96.3% idéntico para el *Chlamydia felis*.

La especie de *Chlamydia* fue identificada en la tráquea y los pulmones de los perros con ERIC. En contraste, la infección con *C. abortus* está típicamente asociado con desordenes reproductivos, a menudo liderando abortos no deseados, especialmente en ovejas. *C. abortus* no ha sido previamente descrito como una infección respiratoria en perros.

Hay pocas publicaciones que tratan de especies de *Chlamydiae* infecciosas en perros, y con lo cual muy pocas son conocidas de la diversidad de las especies *Chlamydiae* caninas. Recientemente, la *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) ha estado asociado con la aterosclerosis en perros (Sako et al, 2002). Un no identificado *Chlamydia* spp ha sido también identificada en un perro con poliartritis séptica (Lambrechts et al, 1999).

*C. psittaci* ha sido previamente aislada en las heces, cerebro, hígado, bazo, riñón y tejido pulmonar de perros de casa (Asizmendi et al, 1992; Fraser et al, 1985 y Gresham et al, 1996). Estudios han demostrado que el 20% de la población de las mascotas caninas en Alemania y 10% en Japón han sido expuestos a anticuerpos elevados de *Chlamydiae* (Perth et al, 1987 y Fukushi et al, 1985). El predominio de *C. psittaci* en perros seropositivos en Gran Bretaña es desconocido (Gresham et al, 1996). Los perros infectados con *C. psittaci* podría desarrollar infecciones crónicas sub-clínicas, aterosclerosis, artritis, conjuntivitis o incluso enfermedades respiratorias (Gresham et al, 1996, y Store 1988). Gresham et al, (1996) aislado *C. psittaci* de un perro con síntomas de enfermedad respiratoria aunque estos síntomas no eran tan severos como en ERIC. Ello sugiere que los perros podrían estar en reserva potencialmente y, con lo cual, importante en la epidemiología de infecciones humanas de *Chlamydiae* (Gresham et al, 1996; Perth 1989). Hay sólo un caso documentado de aislamiento en el cultivo celular de *C. psittaci* de un perro naturalmente infectado (Arizmendi et al, 1992), y un caso de aislamiento de perros infectados experimentalmente (Young et al, 1972).

Las vacunas están disponibles contra algunos agentes infecciosos asociados con ERIC, nombrado B. bronchiseptica tan bien como CPIV y CAV-2. Sin embargo, a pesar del uso de estas vacunas, ERIC es todavía prevalente en el mundo de las perreras, lo cual es posible debido a que las vacunas no proporcionan protección contra todos los agentes infecciosos involucrados en ERIC.

Un primer aspecto de la invención de este modo proporciona una composición de la vacuna para la vacunación de perros que comprende:

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

(b) un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra *M. cynos*;

como se define en la reivindicación 1.

Por un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra un organismo particular, incluimos el significado de que cuando es administrado a un perro que no es inmunocomprometido o inmunosuprimido, el agente

induce a la inmunidad del sistema del perro produciendo anticuerpos los cuales se unen específicamente al organismo. De esta manera, el agente es capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra un organismo en particular.

5 Es preferible, que el anticuerpo de esta manera producido específicamente, se una al organismo particular con una gran afinidad que por cualquier otra molécula en el individual. Preferentemente, el anticuerpo se une al organismo en particular con al menos 2, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 50 veces con una mayor afinidad que otra cualquier molécula individual. Es más preferible que el anticuerpo una el organismo particular con al menos 100, o al menos 1.000, o al menos 10.000 veces una mayor afinidad que para cualquier molécula en el individual.

10 Por un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra un organismo particular, hemos incluido el significado que, cuando se le administró al perro el cual no es inmunocomprometido o inmunosupresivo, el agente induce al sistema inmune del perro a producir anticuerpos los cuales se unen específicamente a macromoléculas como proteínas que son secretadas desde el organismo. Los anticuerpos podrían unir específicamente la macromolécula secretada como una toxina o hemolisina, e hincarla, además de reducir los cambios patogénicos en el huésped y la severidad de la enfermedad, de esta manera permitiendo que el huésped supere la infección en el huésped. De esta manera, a través de un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra un organismo particular, nosotros incluimos a los agentes los cuales son capaces de elevar una respuesta inmune que parta del organismo como una macromolécula secretada.

15 Típicamente, un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro comprende la inactividad o el atenuado *S. zooepidemicus*, o un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus*, o un ácido nucleótido encodificando dicho fragmento.

20 *Streptococcus equi* sub species *zooepidemicus* ha sido depositado en NCTC (Depósito nº4676. S34), el ATCC (Depósito nº43079) y la Nacional Collection of Dairy Organims (NCDO) (Depósito nº1358), y es descrito por Farrow et al (1984).

25 Por un componente "inactivo" de una vacuna, nosotros incluimos el significado que la composición de la vacuna en particular, tal como una bacteria, micoplasma o virus, ha sido tratada de tal manera para eliminar su capacidad para causar la enfermedad, pero todavía mantiene su habilidad para provocar la inmunidad protectora. Por un componente de vacuna "inactivado" nosotros incluimos un organismo destructor.

30 Métodos para la inactivación y destrucción de organismos como bacterias, mycoplasmas y virus para el uso en una vacuna son bien conocidos en la técnica, y han sido usados, por ejemplo, en la preparación de algunos de los componentes para vacunas de perro descritas abajo.

Hay muchos métodos para la desactivación de microorganismos por preparaciones de vacunas. El método más simple es la destrucción por calor (por ejemplo, calentando los virus a 58°C durante 30 minutos, hirviendo la bacteria por 5 minutos o calentando a 65°C durante una hora) o destruyendo por mezcla con formalina. Tu puedes también destruir microorganismos con una variedad de otros compuestos químicos, o tratándolos con luz ultravioleta.

35 Por un componente "atenuado" de una vacuna, nosotros incluimos el significado que un componente particular de la vacuna, tal como la bacteria, micoplasma o virus, ha sido seleccionado o tratado de otra manera en tal forma que disminuya en gran medida su capacidad para causar la enfermedad pero todavía retenga su capacidad para provocar una inmunidad protectora.

40 Métodos para la atenuación de organismos como bacterias, mycoplasmas y virus para el uso en una vacuna son bien conocidos en la técnica, y han sido usados, por ejemplo, en la preparación de algunos componentes para vacunas de perros descritas abajo.

45 Se pueden atenuar microorganismos a través de estancias prolongadas en una sedimentación diferente - por ejemplo en cultivos celulares para virus, y en un medio sólido o en un diferente huésped para bacterias, hasta que se nota una disminución en la virulencia. Alternativamente, se puede apuntar a la mutación o eliminar genes específicos en las bacterias las cuales están involucradas de esta manera a la limitación del potencial patogénico del organismo, o mutar el organismo de modo que tenga un requerimiento específico químico que no está presente en el animal huésped y así no puede multiplicarse y sobrevivir una vez en el huésped. La atenuación puede ser desarrollada en la bacteria con un tratamiento químico y un tratamiento de luz ultravioleta para causar las mutaciones indicadas en el genoma.

50 Un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* podría ser cualquier fragmento de *S. zooepidemicus* capaz de elevar una respuesta protectora inmune en un perro, de esta manera cuando un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* es administrado al perro que no es inmunocomprometido o inmunosupresivo, induce al sistema inmune del perro a producir anticuerpos los cuales se unen a *S. zooepidemicus*.

55 Típicamente, el fragmento inmunogénico de un organismo en particular es un componente de la proteína de un organismo. A través de "un componente de proteína" de un organismo, nosotros incluimos el significado de una proteína entera, o una porción de una proteína. Ello se aprecia en que el fragmento de proteína podría ser o no glicosilada. De esta manera, por "la proteína" incluimos también la glicoproteína. La secuencia de aminoácido de una glicoproteína se refiere a la secuencia del aminoácido del polipéptido DEL ESQUELETO / DEL EJE CENTRAL de la glicoproteína, independientemente del tipo, número, secuencia y posición de azúcares adjuntos a esto.

Las proteínas de *S. zooepidemicus* incluyen superficie celular de precursores proteínicas (Genbank Accesoión Nos. AAA86832 y BAD00711), Cpn60 (Genbank Accesoión nº AAM88472), M-like proteína (Genbank Accesoión Nos. AAP33082, AAP33081, AAP33080, AAP33079, AAP22285, AAB92635, AAB92634, AAB92633, AAB92632, AAB92631, AAB92630, AAB92629, AAB92628, AAB92627, AAB92626, AAB92625, AAB92624, AAB92623, AAB92622, 2111310A y BAD00712), M-like proteína precursor (Genbank Accesoión No. AAD37432), M-like proteína Szp2 precursor (Genbank Accesoión No. AAF75674), M-like proteína Szp3 precursor (Genbank Accesoión No. AAF75675), M-like protein Szp4 precursor (Genbank Accesoión otros químicos, o por tratamiento con luz ultravioleta. No. AAF75676), la proteína similar a *Streptococcus pneumoniae* ORF5 (Genbank Accesoión No. BAB16041), la proteína putativa adhesina-ligando metálico (Genbank Accesoión No. CAB56710), factor inmunidad A zocin (Genbank Accesoión No. AAC46073) y las proteínas Szp descritas por Walker et al (1998, 2003; incluyendo Genbank Accesoión Nos. AAQ08488-AAQ08510).

Es preferible, que el fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus*, es una proteína estructural de *S. zooepidemicus* o una porción inmunogénica en sí. Más preferiblemente, el fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* es una toxina secretada, o hemolisina, o una proteína adhesión/superficie, o una porción inmunogénica del mismo.

Las proteínas adicionales de superficie podrían ser aisladas de una bacteria como la *S. zooepidemicus* por métodos estándar conocidos de la piel de una persona en la técnica. Sambrook et al (2001) "Molecular Cloning a Laboratory Manual" 3ª edición, Sambrook et al (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, describe las técnicas de clonación bacterial que el mundo usa para este propósito.

Si el agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro es un componente de un organismo, como una proteína, ella podría ser aislada de un cultivo del organismo. Es preferible, que las proteínas fabricadas por expresión de un adecuado ADN constructivo codifica la proteína usando la tecnología de ADN recombinante.

Técnicas adecuadas para la clonación, manipulación, modificación y expresión de ácidos nucleicos, y purificación de las proteínas expresadas, son bien conocidas en la técnica y son descritas por ejemplo en Sambrook et al (2001), incorporadas aquí en la referencia.

Alternativamente, las proteínas podrían fabricarse usando técnicas químicas proteínicas, por ejemplo usando una proteólisis parcial de proteínas aisladas (también exolíticamente o endolíticamente) o por sistemas de novo. Los péptidos podrían ser sintetizados por el Fmoc-poliámidas hecha de la síntesis de una fase sólida como se describe en Lu et al (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433 y referencias del mismo.

Un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra un organismo podría ser "un derivado" de un fragmento inmunogénico de un organismo, por el cual nosotros incluimos el significado de proteína, o porción de proteína, la cual ha sido modificada desde la forma en la cual está naturalmente presente en el organismo, pero el cual retiene la habilidad de elevar una respuesta inmune en el perro, tal como la habilidad de inducir a la producción de anticuerpos que se unen específicamente al organismo.

Por ejemplo, una derivada podría incluir una variedad de secuencia de la proteína o porción de la misma la cual podría ser usada para inducir a la producción de anticuerpos los cuales se unen específicamente a ese organismo. Típicamente, las sustituciones de aminoácido son hechas para mejorar la antigenicidad de la vacuna. Preferiblemente, la variación de la secuencia es al menos 90% o al menos 91% o al menos 92%, o al menos 93%, o al menos 94% o al menos 95% idéntica a la secuencia original de la proteína o parte de la misma. Se prefiere más que la variación de la secuencia sea al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99%, o al menos 99.5% idéntica a la secuencia original de la proteína o parte de la misma.

El porcentaje de la identidad de la secuencia entre dos polipéptidos podría determinarse usando adecuados programas de ordenador, por ejemplo GAP de la University of Wisconsin Genetic Computing Group. El porcentaje de identidad entre dos nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos podrían determinarse usando GCG versión 10 (Genetics Computer Group, (1991)), Program Manual para el GCG Package, Versión 7, April 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711). Los parámetros de GCG usados pueden ser: penalización por creación de gap 50, penalización por extensión de gap 3 para el ADN, penalización por creación de gap 8 y penalización por extensión de gap 2 por la proteína. El porcentaje de identidad entre dos nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos podrían determinarse usando FASTA versión 34 (Pearson WR. (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA". *Método Enzymol.*;183:63-98). La posición de FASTA podría estar en penalización de apertura de gap -16 y en penalización por extensión de gap -4.

Se apreciará que el porcentaje de identidad es calculado en relación a polipéptidos cuya secuencia ha sido alineada óptimamente.

La alineación podría llevarse a cabo alternativamente usando el programa W Clustal (Thomson et al., (1994) *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80). Los parámetros usados podrían ser los que siguen:

Los parámetros de alineamiento de emparejamiento rápido: k-tuple (palabra) tamaño; 1, tamaño de ventana; 5, penalización de gap; 3, número de diagonales superiores; 5. Resultado del método: x por ciento.

Parámetros de alineamientos múltiples: penalización por creación de gap; 10, penalización por extensión de gap; 0.05. Resultado de la matriz: BLOSUM.

Típicamente, la variación de la secuencia tiene menos de 100, o menos de 50, o menos de 40, o menos de 30, o menos de 20 residuos de aminoácidos diferentes de la secuencia original de la proteína o parte de la misma. Más preferiblemente, la secuencia tiene 15 o 14 o 13 o 12 o 11 o 10 o 9 o 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o sólo un residuo de aminoácido diferente de la secuencia original de la proteína o parte de la misma.

5 La secuencia de la derivada podría haber sido alterada para aumentar la inmunogenicidad del agente o podría no tener efecto en su inmunogenicidad. Por ejemplo, la derivada podría haber tenido una o más secuencias de aminoácidos que no son necesarios para eliminar la inmunogenicidad.

10 Por "derivativa" incluimos péptidos en los cuales uno o mas de un residuo de aminoácido son químicamente modificados, antes o después de que el péptido sea sintetizado, proporcionando la función del péptido, nombrado la producción de anticuerpos específicos en vivo, continuando substancialmente no cargados. Tales modificaciones incluyen la formación de sales con ácidos o bases, orgánicos especialmente aceptables fisiológicamente o ácidos o bases inorgánicas, formando un éster o amida de un grupo carboxil terminal, y unido al aminoácido protector de grupos como N-t-butoxicarbonil. Tales modificaciones podrían proteger el péptido del metabolismo en vivo. Los péptidos podrían estar presentes como copias simples o múltiples, por ejemplo una repetición de tandem. Tal tandem o múltiples repeticiones podrían ser suficientemente antígenicos ellos mismos para obviar el uso de un portador. Ello podría ser ventajoso para el péptido que se forma en forma de un rizo, con unos extremos N-terminal y C-terminal que se unen juntos, o se añaden uno o más residuos Cys en el extremo para aumentar la antigenicidad y/o para permitir que las uniones de sulfuro sean posibles. Si el péptido es unido covalentemente a un portador, preferiblemente un polipéptido, entonces el encuentro es preferiblemente tal que el péptido de la invención forma un rizo.

15 En relación a las actuales teorías inmunológicas, la función del portador debería estar presente en cualquier formulación inmunogénica para estimular o aumentar la estimulación del sistema inmune. Ello se piensa que los mejores portadores que expresan (o, juntos con el antígeno, crea) un epítipo celular-T. Los péptidos podrían asociarse, por ejemplo por cross-linking, con un portador de separación, como suero de albúminas, mioglobinas, bacterias toxoides y hemocianina de lapa ojo de cerradura. Más recientemente los portadores desarrollados los cuales inducen a ayudar a la célula-T en la respuesta inmune, incluye el núcleo del antígeno de la hepatitis-B (también llamada proteína nucleocapside), epítipos supuestos célula-T, beta-galactosidasa y el péptido 163-171 de interleukina-1. El último componente se puede considerar como un portador o como adyuvante o como ambos. Alternativamente, muchas copias de el mismo o diferentes péptidos de la invención podrían ser entrecruzados a otro; en esta situación no hay separación del portador, pero tal función del portador podría proporcionarse por cross-linking. Agentes adecuados de cross-linking se incluyen en esta lista como en los catálogos Sigma y Pierce, por ejemplo glutaraldehído, carbodiimida y succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, el último agente aprovechando el grupo -SH en el residuo C-terminal de cisteína (si está presente).

25 Si el péptido es preparado por expresión de una secuencia de nucleótido adecuado en un huésped adecuado, entonces puede ser ventajoso expresar el péptido como un producto de fusión con una secuencia de péptido la cual actúa como un portador. El sistema Kabigen's "Ecosec" es un ejemplo de tal disposición.

30 Típicamente, la codificación del polinucleótido de la fracción inmunogénica de *S. zooepidemicus* codifica una proteína estructural, y más preferiblemente una superficie de proteína de *S. zooepidemicus*, o una porción inmunogénica de la misma. Las secuencias de polinucleótidos codificadoras de varias proteínas de *S. zooepidemicus* pueden ser establecidas en referencia al Genbank Accession Nos. mencionado anteriormente. Sin embargo, la secuencia de polinucleótido codificadora de cualquier proteína inmunogénica de *S. zooepidemicus* puede ser determinada por técnicas estándar de biología molecular.

35 Típicamente, un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro se compone de *M. cynos* inactivada o atenuada, o un fragmento de *M. cynos* inmunogénico o un ácido nucleico codificador de dicho fragmento.

*Mycoplasma cynos* siendo depositado en NCTC (Deposit n. 10142H831) y en el ATCC (Deposit no. 27544) y es descrito por Rosendal (1972).

40 Preferiblemente, el fragmento inmunogénico de *M. cynos* es una proteína estructural de *M. cynos* o una porción inmunogénica de la misma, y más preferiblemente, una proteína de superficie de *M. cynos* o una porción inmunogénica de la misma. Las proteínas de superficie pueden ser aisladas de un micoplasma tal como *M. cynos* por métodos estándar conocidos por una persona con conocimiento de la técnica.

45 Métodos para la identificación e aislamiento de las proteínas de micoplasma son generalmente los mismos para una bacteria experto que algunos genes requieren vectores especializados que reconocen el uso el único codón de mycoplasmas (vea todos los capítulos en la Sección B, en Genome Characterisation and Genetics, In Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol 1 Ed S. Razin & J. Tully. Academia Press Inc. 1995).

50 Las vacunas más eficaces de micoplasma tienden a contener una vacuna de célula entera inactivada por calor o formalina o viva atenuada, y en consecuencia conteniendo todas, o al menos la mayoría, de sus proteínas. Los componentes de micoplasma potenciales para el uso como vacunas incluyen proteínas como proteínas de membrana de estructura unida primaria, que se cree está entre 45kDA (equivalente a P1 citadhesina de *M. pneumoniae* y homólogas tal que MgPa de *M. genitalium* los cuales están en todas partes de el operón de tres

genes), superficie expuesta a las proteínas y otras proteínas unidas, membrana glicolípida, fracción de membrana polisacárida, lipogliconas y todas las mencionadas en las revistas de vacunas de micoplama animal (Barlie 1985 y Barile et al, 1985).

5 Para el uso de la vacuna, los agentes polinucleótidos pueden desarrollarse en varias replications (vacunas recombinantes adenovirus) o vectores no replicantes (vacuna ADN).

Una dosis típica de una vacuna, se compone de proteína recombinante de unos 5-10 µg. Una típica dosis de vacuna de bacteria es  $10^8$  unidades de colonia formadas por ml.

Típicamente, la composición de la vacuna se compone además de un portador aceptable farmacéuticamente, diluyente o adyuvante.

10 Ciertos portadores y adyuvantes son descritos arriba. Otros adyuvantes adecuados incluyen el completo o incompleto adyuvante de Freund, dipéptido muramyl, los "Iscoms" de EP 109 942, EP 180 546 y EP 231 039, hidróxido de aluminio, saponina, dextran-DEAE, aceites neutros (como el migliol), aceites vegetales (como aceites de cacahuete), liposomas, polioles Pluronic® o el sistema adyuvante Ribi (ver, por ejemplo GB-A-2189 141).

15 El portador(es) debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el agente(s) de la invención y no nocivo para el receptor del mismo. Típicamente, los portadores serán agua o suero fisiológico las cuales serán estériles y libres de pirógenos.

Típicamente, la vacuna será administrada vía oral, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o por ruta intranasal.

20 La composición de la vacuna podría ser formulada por administración parenteral, y podría incluir inyecciones de soluciones acuosas o no acuosas las cuales podrían contener antioxidantes, buffers, bacteriostatos y solutos los cuales se administran e la formulación isotónica con la sangre del recipiente previsto; y/o suspensiones estériles acuosas o no acuosas las cuales podrían incluir agentes de suspensión y agentes espesadores.

25 La composición de la vacuna podría estar presente en contenedores unidos o multidosis, por ejemplo en ampollas y viales selladas, y podrían estar almacenadas en condición de hielo-seco (liofilizado) requiriendo sólo la adición de un líquido portador estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente anterior a su uso. Inyecciones de solución improvisadas y suspensiones podrían prepararse a partir de polvo, granulado o comprimidos.

30 La composición de la vacuna podría ser formulada por administración intranasal y podría desarrollarse convenientemente en forma de spray de aerosol presentándose en un contenedor presurizado, bomba, spray o nebulizador con el uso de un adecuado propulsor, como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano (HFA 134A<sup>TM</sup>, o 1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-heptafluoropropano (HFA 227 EA<sup>TM</sup>), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis podría determinarse a través de una válvula para desarrollar un medidor de cantidad. El contenedor presurizado, bomba, spray o nebulizador podría contener una solución o suspensión del agente(s), usando una mezcla de etanol y el propulsor como el solvente, el cual puede contener adicionalmente un lubricante, como el trioleato sorbitano.

35 Para el uso veterinario, la vacuna es preparada como una formulación aceptable en relación con una práctica normal veterinaria el cirujano veterinario determinará el régimen de dosis y la vía de administración la cual será más apropiada para un animal en particular.

40 Formulaciones para vacunas adecuadas para la administración a perros son bien conocidas en la técnica e incluye las formulaciones usadas en vacunas de perros descritas debajo.

Como se describió arriba, la mayoría de los agentes virales y bacterianos conocidos se asocian a enfermedades respiratorias en perros, incluyendo coronavirus respiratorio canino (CRCV), virus parainfluenza canino (CPIV); adenovirus canino tipo-2 (CAV-2), herpesvirus (CHV), y Bordetella bronchiseptica (B. bronchiseptica).

Así, en una fabricación, la composición de la vacuna contiene además de uno más de:

- 45 (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra CRCV;  
 (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra CPIV;  
 (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2;  
 (g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra CHV; y  
 (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra B. bronchiseptica,  
 50 como se define en las reivindicaciones 3-8.

De este modo, la composición de la vacuna puede opcionalmente componerse de dos, o tres, o cuatro, o todos los cinco de estos agentes adicionales.

El agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra CRCV se compone de CRCV atenuado o inactivo, o un fragmento de inmunogénico de CRCV, o un ácido nucleótido codificando dicho fragmento inmunogénico.

5 Fragmentos adecuados inmunogénicos de CRCV son descritos en WO 2004/011651 (The Royal Veterinary Colleague) y en Erles et al, 2003. Fragmentos adecuados inmunogénicos de CRCV incluyen las proteínas superficiales Spike (S) y la hemaglutinina-esterasa (HE), la membrana glicoproteína (M), y la proteína nucleocápsida (N), o porciones inmunogénicas de la misma. Las proteínas Spike y HE tipo CRCV descritas en WO 2004/011651 podrían ser adecuadas como agentes que elevan una respuesta inmune contra CRCV. Relacionado con los coronavirus, como el coronavirus ovino y el coronavirus humano, y fragmentos inmunogénicos del mismo, 10 podrían ser adecuados como agentes que elevan la respuesta inmune contra CRCV.

Típicamente, un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra CPIV se compone de CHIV inactivo o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico.

15 Típicamente, un agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra CAV-2, se compone de CAV-2 atenuado o inactivo, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico.

20 El adenovirus canino tipo 1 causa hepatitis infecciosa; el adenovirus canino tipo 2 causa enfermedad respiratoria. Ello ha demostrado que CAV-1, proporciona una protección entrecruzada contra CAV-2 y viceversa. El agente que eleva una respuesta inmune en un perro contra CAV-2 podría contener o el CAV-1 o CAV-2, o un fragmento inmunogénico del mismo. Las vacunas descritas abajo contienen CAV-2 excepto EURICAN® DHPPI, el cual no es específico al tipo de virus usado.

Agentes adecuados que elevan la respuesta inmune en un perro contra CPIV y CAV-2 son conocidos para la persona especializada en la técnica. Por ejemplo, las siguientes vacunas son legales en GB.

25 KAVAK® DA<sub>2</sub>PI69 de Fort Dodge Animal Health es una vacuna viva seca fría que contiene cepas de virus de moquillo, adenovirus canino tipo 2, parainfluenza canina tipo 2 y parvovirus canino cultivados en tejido celular.

KAVAK® Parainfluenza de Fort Dodge Animal Health contiene una vacuna viva seca fría derivada de una cepa atenuada de virus parainfluenza canica tipo 2 cultivada en una línea celular homóloga establecida.

30 NOBIVAC® DHPPI de Intervet UK Limited es una viva atenuada seca-fría, vacuna de virus conteniendo el virus canino del moquillo, adenovirus canino tipo 2, parvovirus canino y virus parainfluenza cultivado en la línea de cultivo celular.

NOBIVAC® KC de Intervet UK Limited es una vacuna viva seca-fría que contiene Bordetella bronchiseptica cepa B-C2 y cepa de virus canino parainfluenza Cornell (esto es una vacuna intranasal). El número de autorización de gestión VM 06376/4026.

35 EURICAN® DHPPI de Merial Animal Health Ltd, es una vacuna combinada viva seca-fría contra el moquillo canino, hepatitis infecciosa canina, parvovirus canino y virus canino parainfluenza tipo 2.

VANGUARD® 7 de Pfizer Ltd, contiene el virus de moquillo canino vivo atenuado (cepa Snyder Hill), virus parainfluenza (cepa NL-CPI-5), parvovirus canino (NL-35-D) propagado en la línea celular establecida, y un cultivo inactivado de Leptospira canicola y Leptospira icterohaemorrhagiae.

40 QUANTUM® DOG 7 de Scherin-Plough Animal Health contiene el moquillo canino, adenovirus tipo 2, parvovirus, vacuna virus parainfluenza tipo 2(viviente) e Leptospira canicola inactivada y vacuna de Leptospira icterohaemorrhagiae.

CANIGEN DHPPI de Virbac Ltd, es una viva atenuada, seca-fría, vacuna de virus conteniendo el virus canino del moquillo, adenovirus canino (CAV-2), parvovirus canino y virus parainfluenza canino crecido en la línea celular del cultivo celular.

45 CANIGEN Ppi de Virbac Ltd es una viva atenuada, vacuna viral fría-seca conteniendo virus parvovirus canino y virus parainfluenza canino crecido en la línea celular del cultivo celular.

El agente capaz de elevar una respuesta inmune en el perro con el CHV se compone de CHV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunológico del mismo, o ácido nucleico que codifica una respuesta inmune.

50 Los agentes adecuados que elevan una respuesta inmune en un perro contra CHV son conocidos para una persona con conocimientos en la técnica. Por ejemplo, EURICAN Herpes 205 de Merial es una sub-unidad de vacuna purificada contra CHV la es indicada para la inmunización activa de perras preñadas para prevenir la mortalidad, signos clínicos y lesiones en cachorros resultante de infecciones CHV adquiridas en los primeros días de vida. Ello no está autorizado para una vacuna de perros adultos para la prevención de enfermedades respiratorias.



El agente capaz de elevar una respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* se compone de *B. bronchiseptica* activado o atenuado, o un fragmento inmunológico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunológico.

5 Agentes adecuados que elevan la respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* son conocidos por personas especializadas en la técnica. Por ejemplo, las vacunas siguientes en los perros son autorizadas para el uso.

10 COUGHGUARD-B® de Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.:189) contiene un cultivo inactivo de *B. bronchiseptica*. Esto es para la inmunización de la salud de los perros contra la enfermedad causada por *B. bronchiseptica*, en particular la tos de las perreras. COUGHGUARD-B® es preparada de una cepa fuertemente antigénica de *B. bronchiseptica* la cual ha sido inactivada y procesada para ser no tóxica cuando se le administra a los perros. En los métodos de producción se informa del abandono de propiedades inmunológicas de *B. bronchiseptica* se quedan intactas.

15 VANGUARD\*5/B de Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.:189) contiene cepas atenuadas de virus del moquillo canino (CDV), CAV-2, CPIV, y parvovirus canino (CPV) propagado en una línea celular establecida. El antígeno (CPV) fue atenuado por paso bajo en la línea celular canina y a ese nivel de paso tiene propiedades inmunológicas capaces de aumentar anticuerpos maternos. La vacuna es empaquetada en forma liofilizada con un gas inerte en lugar de vacío. El componente de la bacteria contiene cultivos enteros de *B. bronchiseptica* la cual se suministra como diluyente del componente de *B. bronchiseptica* en VANGUARD® 5/B y se prepara de una cepa altamente antigénica la cual ha sido inactivada y procesada para ser no tóxica cuando se administra en perros.

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

25 PROGARD®-KC de Intervet es una vacuna intranasal modificada que contiene virus atenuado parainfluenza canino y cultivo vivo avirulento de *Bordetella bronchiseptica*. PROGARD®-KC es presentado en forma disecada con un diluyente estéril proporcionado por reconstitución. PROGARD®-KC es para la vacunación de la salud, para cachorro y perros susceptibles para prevenir la traqueobronquitis infecciosa canina ("tos perruna") debido al virus parainfluenza canina y *B. bronchiseptica*.

30 PROGARD®-KC PLUS de Intervet contiene cultivo vivo de cepas avirulentas de *B. bronchiseptica*, adenovirus canino atenuado tipo 2 y virus parainfluenza para administración intranasal. La vacunación con PROGARD®-Kc Plus estimula rápido, inmunidad local en el tracto respiratorio, de ese modo, la inhibición de la infección en el puerto de entrada para prevenir síntomas clínicos. Además de la inmunidad local, esta también estimula a la inmunidad sistemática dentro de tres semanas de la administración intranasal. El pequeño volumen (0.4 ml) y la aplicación por el agujero de la nariz de PROGARD®-KC Plus, proporciona para cada vacunación, particularmente en pequeñas razas y jóvenes cachorros. PROGARD®-KC Plus es presentado en una forma disecada con un diluyente estéril para proporcionar la reconstitución. PROGARD®-KC Plus es para la vacunación de la salud de perros y cachorros de tres semanas de edad o mayores para prevenir la traqueobronquitis canina infecciosa ("tos perruna") debido a adenovirus canino tipo 2, virus parainfluenza y *B. bronchiseptica*.

Intrac de Intervet es una vacuna viva modificada fría-seca, conteniendo la cepa *B. bronchiseptica* S 55, por administración intranasal. El número de licencia del producto PL 0201/4011.

Nobivac® KC, descrita arriba, también contiene *B. bronchiseptica*.

40 En una fabricación preferida, la composición de la vacuna consta de:

- (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro;
- (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro; y
- (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro.

Donde cada uno de los agentes (a), (b), y (d) están definidos arriba.

45 En otra fabricación preferida, la composición de la vacuna consta de:

- (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; y
- (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro;
- (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro; y en cualquiera o más de:
- (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CPIV en un perro;
- 50 (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CAV-2 en un perro;
- (g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y
- (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *B. bronchiseptica* en un perro,

donde cada uno de los agentes de (a) a (b) están definidos arriba.

De esta manera se aprecia que los agentes (a), (b) y (d), la composición puede contener cualquier de los dos agentes, € (f), (g) y (h), o cualquier tres, o cuatro, o todos los cinco agentes, (e), (f), (g), y (h).

5 La invención proporciona el uso de una composición de la vacuna como se detalla en el primer aspecto de la invención en la preparación del medicamento para la vacunación de ERIC, o el tratamiento de ERIC en un perro.

La composición de la vacuna del primer aspecto de la invención podría ser útil para combatir el ERIC profilácticamente o terapéuticamente.

Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de:

- 10 (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; y  
 (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro;

en la preparación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de ERIC en un perro,

donde los agentes (a) y (b) están definidos arriba. En la fabricación, el medicamento además consta de uno o más de uno de:

- 15 (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;  
 (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CPIV en un perro;  
 (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CAV-2 en un perro;  
 (g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y  
 (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *B. bronchiseptica* en un perro;

20 donde cada uno de los agentes de (d) a (h) son como se definen arriba. En esto y en todos los aspectos subsecuentes de la invención, las preferencias de (a), (b), (d), € (f), (g) y (h) están descritas respecto al primer aspecto de la invención.

Un tercer aspecto de la invención proporciona el uso de

- (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; y  
 (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro;  
 25 como se definió en el primer aspecto de la invención, en la preparación del medicamento para la estimulación de una respuesta inmune contra dicho *S. zooepidemicus* y *M. cynos* en un perro.

En una fabricación, el medicamento además consta de uno o más de uno de:

- (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;  
 (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CPIV en un perro;  
 30 (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CAV-2 en un perro;  
 (g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y  
 (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *B. bronchiseptica* en un perro,  
 como se definió arriba en el primer aspecto de la invención.

Un cuarto aspecto en la invención proporciona una composición que contiene:

- 35 (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro; y  
 (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro;

para usar como medicamento. Así, esta composición es empaquetada y presentada para su uso como un medicamento.

40 En una fabricación, la composición es para uso en medicina veterinaria. Así esta composición es empaquetada y presentada para uso como medicamento veterinario.

Típicamente, la composición para usarla en medicina veterinaria. Así la composición es empaquetada y presentada para el uso como un medicamento veterinario canino y es empaquetado y presentado para usarse en perros.

En una fabricación, la composición además consta de uno o más de:

- (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;
- (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CPIV en un perro;
- (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CAV-2 en un perro;
- (g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y
- 5 (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra B. bronchiseptica en un perro, como se definió arriba en el primer aspecto de la invención.

En una fabricación preferida de este aspecto, la composición consta de:

- (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra S. zooepidemicus en un perro; y
- (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra M. cynos en un perro; y
- 10 (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro, como se define arriba en el primer aspecto de la invención.

En otra fabricación preferida de este aspecto, la composición consta de

- (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra S. zooepidemicus en un perro; y
- (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra M. cynos en un perro; y
- 15 (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro; y uno o más de:
- (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CPIV en un perro;
- (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CAV-2 en un perro;
- (g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y
- (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra B. bronchiseptica en un perro,
- 20 como se define arriba en el primer aspecto de la invención.

Así se aprecia que los agentes (a), (b) y (d), la composición puede contener cualquiera de dos de los agentes (e), (f), (g) y (h), o cualquier de tres, o cuatro, de todos los cinco agentes (e), (f), (g), y (h).

Un quinto aspecto de la invención proporciona un kit de partes para la composición de la vacuna de este primer aspecto de la invención, que comprende

- 25 (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra S. zooepidemicus en un perro; y
- (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra M. cynos en un perro;
- como se define arriba,
- y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente o adyuvante.

En una fabricación, el kit contiene además uno o más de:

- 30 (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro;
- (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CPIV en un perro;
- (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CAV-2 en un perro;
- (g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y
- (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra B. bronchiseptica en un perro,
- 35 como se definió arriba en el primer aspecto de la invención.

En otra fabricación preferida de este aspecto, el kit contiene:

- (a) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra S. zooepidemicus en un perro; y
- (b) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra M. cynos en un perro; y
- (d) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CRCV en un perro; y uno o más de uno de:
- 40 (e) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CPIV en un perro;
- (f) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CAV-2 en un perro;

(g) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra CHV en un perro; y  
 (h) un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra B. bronchiseptica en un perro,  
 como se define arriba en el primer aspecto de la invención.

5 Ello se aprecia que estos agentes (a), (b) y (d), el kit podría contener cualquier de los dos agentes, (e), (f), (g) y (h), o cualquiera de los tres, o cuatro, o de todos los cinco de agentes, (e), (f), (g) y (h).

El listado o discusión de una primera publicación del documento en esta especificación no debería ser necesariamente tomado como un conocimiento en el que el documento es parte de la técnica o es de conocimiento general.

La invención ahora será descrita con más detalle con la ayuda de las siguientes figuras y ejemplos.

10 Figura 1: Aislamiento de S. canis y S. zooepidemicus de 229 perros de perrera con un resultado clínico respiratorio (n = total de números de perros en cada grupo). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%).

15 Figura 2: Porcentaje de perros con ERIC, S. canis o S. zooepidemicus con un tiempo en la perrera (n = total de números de perros en cada grupo de un total de 229 perros). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%).

Figura 3: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de M. cynos en niveles altos de severidad de ERIC.

Figura 4: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de M. cynos después de aumentar la longitud del tiempo en las perreras.

20 Figura 5: secuencia parcial nucleótido 218 (SEQ ID NO:1) de gen 23S ARNr de Chlamydomphila aislado de un perro con ERIC (DHB10).

Figura 6: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de Chlamydomphila en niveles crecientes de severidad de ERIC.

25 Figura 7: secuencias de ARNr 23S parcial (DHB) alineada con ARNr 23S de todas las especies conocidas de Chlamydia y Chlamydomphila (Cabor-C. Abortus, Cpsit-C.pittaci, Cfe.-C.felis, Ccavi-C. caviae, Cpne-C.pneumoniae, Cpec-C.pecorum, Csuis-C. suis, Ctrac-C. trachomatis, Wad-Wad-dlia, Sim- Simkania).

Figura 8: secuencias parciales de nucleotido 218 (SEQ ID Nos:2-8) del gen ARNr 23S de además de siete especies aisladas de Chlamydomphila aisladas de un perro con ERIC (DHB 2,4, 5, 6, 7, 8 y 9).

30 Figura 9: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de herpesvirus canino en niveles altos de la severidad de ERIC.

**Ejemplo 1: La asociación de Streptococcus equi sub species zooepidemicus con enfermedad respiratoria infecciosa canina.**

#### Resumen

35 La enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC) es una infección multifactorial que afecta a la mayoría de los perros de perrera a pesar de el amplio uso de la vacunación. Las actuales vacunas apuntan a proteger contra los agentes virales y un simple agente bacteriano, Bordetella bronchiseptica. Nosotros examinabamos el papel de las especies de estreptococos en ERIC. El aislamiento e identificación del estreptococo en el tracto respiratorio inferior de perros clínicamente sanos y aquéllos con ERIC eran usados para relacionar la presencia de especies específicas de estreptococos con la enfermedad respiratoria. Nosotros mostramos que la presencia de S. equi sub species zooepidemicus (S. zooepidemicus) está asociada al incremento de la severidad de la enfermedad en un población de perros de perrera con ERIC endémica.

#### Introducción

45 ERIC es una infección que afecta a los perros de todas las edades y comúnmente ocurre cuando un gran número de perros son caseros junto un cercano confinamiento. La enfermedad tiene una alta morbilidad con la tos seca áspera característica de laringitis en sus etapas tempranas, secreciones nasales y/o oculares, y anorexia y depresión variable, las cuales pueden evolucionar en traqueobronquitis, neumonía e incluso la muerte en la mayoría de los casos. La enfermedad ha sido históricamente considerada como una infección compleja en la que combinó un desafío secuencial con ambos virus (CPIV y CAV-2) y agentes bacterianos que producen un engrandecimiento sinérgico de los resultados clínicos (Appel y Binn, 1987). El agente bacteriano más común detectado durante la enfermedad es B. bronchiseptica (McCandliss et al, 1978), pero otras especies como Pasteurella sp, Micoplasma sp, y β-hemolítico estreptococo (βhS) han sido asociadas con esta enfermedad (McCandish et al, 1978; Rosendal, 1978; Thrusfield et al, 1991).

Muchos estudios involucrados en el aislamiento bacteriano del tracto respiratorio superior (oral y cavidad nasal) e inferior (tráquea y pulmones) de ambos perros enfermos y sanos mencionan la presencia de  $\beta$ hS (Smith, 1967; McCandlish et al, 1978; McKiernan et al, 1982; Azetaka y Konishi, 1988). Sin embargo, a pesar de la variedad de especies de  $\beta$ hS encontradas en el tracto respiratorio superior de los perros, sólo unas pocas investigaciones están orientadas a las especies de  $\beta$ hS involucradas en las enfermedades de las vías respiratorias inferiores (Garnett et al, 1982; Angus et al, 1997). Aunque especies de  $\beta$ hS en el tracto respiratorio canino fueron anotadas por Biberstein et al, (1980) este estudio descuidó la distinción entre el transporte en tracto respiratorio superior e inferior. Además, incluso aunque el aislamiento era de pacientes hospitalarios veterinarios, se omitió la razón para la derivación y por lo tanto un enlace a condiciones clínicas específicas. El más común  $\beta$ hS en perros, *S. canis*, un Grupo Lancefield G Streptococcus, es un normal comensal de la mucosa genital y respiratoria como en la piel (Timoney, 1987; Quinn et al, 1999). Streptococcus canis (*S. canis*) ha sido previamente aislado de las amígdalas de 60 a 73% de los perros sanos (Smith, 1967; Sadatsune and Moreno, 1975; Biberstein y Hirsh, 1999). *S. canis* causa una variedad de infecciones esporádicas y oportunistas en perros, incluyendo la neumonía, septicemia, flemas, otitis, mastitis, piometra, proctitis, síndrome de shock tóxico y fascitis necrotizante (Biberstein y Hirsh, 1999, Quinn et al, 1999).

Además de *S. canis*  $\beta$ hS de otros Grupo Lancefield, tales como A, C, y E, han sido aislados de perros (Biberstein et al, 1980). *S. zooepidemicus*, Grupo Lancefield C, se encuentra como un comensal de las mucosas del tracto respiratorio superior de los mamíferos (Timoney et al, 1988; Quinn et al, 1999). Ello está asociado con diversos síntomas de enfermedades incluyendo enfermedades respiratorias inferiores, neumonía de potrillo y cervicitis en caballos (Chanter, 1997; Biberstein y Hirsh, 1999), neumonía en llamas (Biberstein y Hirsh, 1999), septicemia y artritis en cerdos (Timoney, 1987), mastitis en vacas y cabras (Timoney et al, 1988), septicemia en aves de corral, pericarditis y neumonía en corderos (Timoney, 1987), linfadenitis en conejillos de indias (Quinn et al, 1999) y glomerulonefritis en humanos (Balter et al, 2000). En perros, *S. zooepidemicus* ha estado asociado con infecciones respiratorias, septicemia (Quinn et al, 1999) y neumonía hemorrágica necrótica aguda (Garnett et al, 1982). En este estudio, nosotros buscábamos establecer especies de  $\beta$ hS las cuales están presentes en el tracto respiratorio de los perros sanos y en perro con ERIC.

## **Materiales y Métodos**

### Estudio de población y muestreo.

El principal estudio de población (n=209, lavado alveolar bronquial, LAB) se compone de animales de bien establecidos recogidos de perreras (~600 perros) con una historia endémica de ERIC: en la entrada a la perrera, todos los perros fueron vacunados con KAVAK DA<sub>2</sub> PIP69 (Fort Dodge) una vacuna viva atenuada para el virus del moquillo, CAV-2, CPIV y parvovirus canino y KAVAK L contra Leptospirosis. La presencia de ambos coronavirus canino (CRCV) y *B. Bronchiseptica* ha sido demostrada en perros con ERIC en este centro (Chalker et al. 2003; Erles et al. 2003). Cada semana en esta perrera debía sacrificarse algunos perros por razones de bienestar y de esos perros 2-3 eran seleccionados arbitrariamente para el muestreo. Muestras de LAB fueron tomadas por el siguiente método de un total de 209 individuos perrunos en un periodo de 2 años de 1999 a 2001. Dentro de las 2 horas de eutanasia, la tráquea fue sujeta justo por encima de la bifurcación para prevenir cualquier contaminación traqueal del pulmón durante el muestreo. Usando un catéter estéril y en un tubo de 50 ml, la solución de Sal Equilibrada Hanks fue entonces emplazada en el lóbulo del pulmón izquierdo apical. Este lóbulo del pulmón fue masajeadado manualmente durante 30 segundos y el LAB retirado. La eutanasia en perros era graduada por la severidad de los resultados respiratorios clínicos en las siguientes características: (1) signos de no respiración, n=71 (2) Media tos, n=37 (3) Tos y segregación nasal, n=76 (4) Tos y segregación nasal con depresión y/o inapetencia n=9 (5) bronconeumonía supurativa, n=16.

Después del muestreo de LAB, una sección de tejido pulmonar del lóbulo derecho distal fue tomado por análisis histológico. Formalina fijaba (10% formalina salina) a los bloques de tejido que estaban incrustados en parafina, y hemotoxilina estándar y secciones de eosina teñidas, que eran vistas bajo la luz del microscopio (X40, X100, X400). La presencia o ausencia de neutrófilos intra-alveolar era anotada.

El número total de días en el que cada perro permaneció en la perrera era grabado y el tiempo en la perrera era calculado en semanas. La edad y condición clínica a la entrada de la perrera de cada animal era anotada y el resultado de la composición de la condición clínica se basaba en el estatus nutricional, pelo, comportamiento, apetito y examinación general clínica (temperatura, frecuencia cardiaca y pulmonar) era graduada como sigue: buena (1), pobre (2), muy pobre (3).

Una población adicional perruna fue incluida como un grupo de control que consistía en perros caseros con unos síntomas respiratorios clínicos referidos al diagnóstico bacteriológico de RVC por un periodo de 2 años (1998 a 2000) (n=71, LAB). Muestras del grupo de control fueron recogidas usando técnicas guías endoscópicamente como describió Cocoran (1998). Todas las muestras en el estudio fueron guardadas a 4°C hasta el test bacteriológico, y el estado fue desarrollado desde de 24 h del muestreo excepto el cálculo de CFU por ml que fue desarrollado en LAB helado.

### Aislamiento Bacteriano e Identificación.

Un volumen de 50  $\mu$ l de LAB fue recubierto en duplicado en Columbia Blood Agar (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) con 5% de sangre de oveja e incubadas ambas aeróbicamente y anaeróbicamente durante 24 hrs a 37°C. Las

colonias de  $\beta$ -hemolíticas fueron identificadas y purificadas en colonias individuales. Las bacterias gram-positiva catalasa-negativa fueron identificadas como streptococci por morfología celular y colonial, y entonces serogrupalizadas por aglutinación deslizando de cama de látex (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) en Grupo Lancefields. Las aisladas fueron identificadas en especies de nivel de utilización biomédica y acción enzimática usando el kit de identificación manual API20STREP (bioMérieux UK Ltd, Basingtoke, UK).

Con el fin de detectar infecciones mixtas, 3 colonias de los primeros 12 perros en el estudio fueron examinadas ambas por aglutinación deslizando de cama de látex y API20STREP. Las series de diluciones de LAB en sal buffer de fosfato (Sigma-Aldrich Co. Ltd, Dorset, UK) fueron emplacadas en triplicado, incubadas como se describe arriba y el UFC (unidad formadora de colonia) por ml de LAB calculado. Crecido el  $\beta$ hS era entonces graduado como sigue: ninguno (0), <100 UFC por ml (1), 100 a 1000 UFC por ml (2) y > 1000 UFC por ml (3).

#### Análisis Estadístico.

Un significativo nivel o probabilidad de un tipo de error 1 ( $\alpha$ ) de 0.05 fue asumido en todos los análisis. La presencia de *S. zooepidemicus* con edad, condición clínica a la entrada de la perrera, semanas en la perrera, la presencia de neutrofilos intra-alveolar y resultados respiratorios clínicos fueron analizados usando Prism (versión 3.0, GraphPad Software Inc, San Diego, USA) software de test estadístico de análisis  $X^2$ . La correlación del crecimiento de la bacteria y resultado respiratorio fue determinado por el uso de resultados principales combinados, analizados con Prism por una dirección ANOVA (no-paramétrico) test. La presencia de *S. canis*, *S. zooepidemicus* y enfermedad respiratoria en las muestras de perros de perrera en tiempo de semanas también fue calculada.

#### **Resultados.**

Streptococci  $\beta$ -hemolítica fueron aisladas de ambas poblaciones de objeto de estudio, y el aislamiento de LAB de mascotas caseras fue considerablemente diferente de los perros de perrera (1.4% perros casero, 23.9% perrera,  $X^2$  análisis \*\*\* $p=0.000$ ). Todas las hS aislados fueron encontrados de ser *S. canis* o *S. zooepidemicus*. Las infecciones mixtas con diferentes Grupos Lancefield o especies no fueron encontradas, además todas las placas individuales presentaron colonias de morfología uniforme. Ambas *S. canis* y *S. zooepidemicus* fueron aisladas de perros de perrera, mientras que una simple aislada de *S. zooepidemicus* y no *S. canis* fueron aisladas de mascotas caseras. *S. zooepidemicus* fue encontrada para ser la especie predominante hS en los perros de perrera (92%). El transporte de ambas *S. canis* y *S. zooepidemicus* fue examinado en los perros de perrera dentro de cada grado de resultado respiratorio clínico (figura 1). *S. canis* fue presentado en ambos perros con y sin resultados clínicos, y el aislamiento no incrementó la severidad de la enfermedad. En contraste, los perros sanos eran menos propensos a tener *S. zooepidemicus* en el tracto respiratorio inferior que los animales enfermos ( $X^2$  análisis, \*\* $p=0.004$ ) y el aislamiento de *S. zooepidemicus* incrementó dramáticamente con el incremento del resultado clínico respiratorio, de 9.7 % en perros sin síntomas a 87.5% en perros con bronconeumonía supurativa ( $X^2$  análisis, \*\*\* $p=0.000$ ). Los perros con resultados respiratorios superiores eran más propensos a tener un mayor resultado de crecimiento de *S. zooepidemicus* que los perros clínicamente sanos (análisis ANOVA simple \*\*\* $p=0.000$ . Rcuadrado= 0.194,  $F=22.265$ ). La edad y condición clínica del animal a la entrada de la perrera no tuvo efecto en el aislamiento de *S. zooepidemicus* ( $X^2$  análisis, edad  $p=0.341$ , condición clínica a la entrada  $p=0.295$ ).

El porcentaje de perros con ERIC en la perrera se incrementó dramáticamente de 21.1% en la semana 1 a 70.1% en la semana 2, y ERIC no decreció en la población hasta después de la cuarta semana (Figura 2). Aunque la diferencia no significativa fue detectada, el número de perros con *S. zooepidemicus* en el pulmón incrementó de 20.6% en el tiempo de la perrera desde 16.7% en la semana 1 al 34.4% en la semana 3 (Figura 2), mientras tanto la tendencia fue vista con *S. canis*.

Los análisis histológicos revelaron que los perros con *S. zooepidemicus* eran más probables a tener neutrofilia intra-alveolar que los que no tenían *S. zooepidemicus* ( $X^2$  análisis, \*\* $p=0.006$ ). En perros con altos resultados bacterianos, supuraciones agudas o neumonías necróticas con moderado a marcado agregación macrófaga era a menudo anotada, similar a los encontrados de Garnett et al, (1982) en perros con *S. zooepidemicus* que indujeron neumonía hemorrágica streptococcal (NHS). Las células no bacterianas eran aparentemente teñidas en secciones H y E.

#### **Discusión.**

En este estudio nosotros lo orientamos a las especies de  $\beta$ hs presentes en el tracto respiratorio inferior de los perros caseros y los perros de perrera, con y sin enfermedad respiratoria. Aunque *S. canis* es la predominante  $\beta$ hs del tracto respiratorio en perros (Biberstein et al, 1980) y fue aislado desde el tracto respiratorio inferior de algunos perros de perrera en este estudio, ello no fue asociado con ERIC en los perros de perrera. En contraste, un incremento del aislamiento de *S. zooepidemicus* fue asociado con el aumento de ERIC severo. Los perros con cualquier síntoma respiratorio eran más propensos a tener *S. zooepidemicus* en el tracto respiratorio inferior que los animales sanos en las perreras y *S. epidemicus* fue encontrado en una baja proporción de las mascotas de casa que en los perros de perrera.

*Streptococcus equi* sub especie *zooepidemicus* a sido previamente asociada con NHS en perros (Garnett et al, 1982). El síndrome de NHS era una severa infección en la colonia cercana de beagles, en las cuales de repente la muerte era seguida sin resultados clínicos primarios. En la necropsia se encontró abundantes exudaciones hemorrágicas dentro de la tráquea y las ramificaciones bronquiales, con pulmones enrojecidos oscuros difusivos.

Además, había hemorráneas equimóticas de un rango de otros tejidos. La enfermedad era reproducida por inoculación intra-traqueal con *S. zooepidemicus* en un perro. Lo interesante de este estudio, perros con altos resultados de crecimiento de *S. zooepidemicus* eran más probables a neutrofilia intra-alveolar y comparten las características histológicas de los pulmones descritos en Garnett et al, (1982) en NHS que aquellos perros con bajos resultados en crecimiento.

ERIC ha sido históricamente considerada como una enfermedad compleja, involucrando ambos agentes bacterianos y virales. De hecho, muchos otros agentes han sido descritos en esta población de perro de perrera, incluyendo CRCV. (Erles et al, 2003) y *B. bronchiseptica* (Chalker et al, 2003). Aunque el potencial patogénico de CRCV no ha sido clarificado todavía, dato de Erles et al (2003) muestra que CRCV predomina en aquellos perros con enfermedad respiratoria media (resultado 2) y similarmente a Chalker et al (2003) encontrado en perros con *B. bronchiseptica* predomina en aquellos perros con enfermedad moderada (resultado 3).

Nosotros encontramos que *Streptococcus zooepidemicus* está asociado más comúnmente con sólo los más severos casos de ERIC (resultado 4-5) indicando que podría actuar como un secundario invasor. De hecho, especies de  $\beta$ hs han sido previamente descritas como invasores secundarios en el complejo ERIC (McCandlish et al, 1978). Sin embargo, ello todavía no es conocido si *S. zooepidemicus* juega un papel importante en la enfermedad respiratoria en estos animales o simplemente invade el tracto respiratorio provocando daño por otros patógenos. Las pruebas epidemiológicas sugieren que en los caballos, *S. zooepidemicus* podría ser un patógeno primario en la enfermedad respiratoria (Word et al, 1993; Cjanter, 1997) pero puede ser considerada para ser un agente oportunístico (Walker y Timoney 1998; Anzai et al, 2000). Incluso si *S. zooepidemicus* no es una causa primaria de ERIC en estos perros, el rango de gran aislamiento de perros con bronconeumonía supurativa (87.5%) apoya la hipótesis que *S. zooepidemicus* es responsable de la mayoría de los signos clínicos que se ven en esta perrera. El bajo aislamiento de mascotas caseras (1.4%) con enfermedad respiratoria, indica que este agente podría estar en común con una infección respiratoria y podría ser un problema particular para esta perrera. Aunque y previamente la perrera no fue tomada en consideración es más probable que algunos perros domésticos en este estudio han estado en la perrera alguna vez. El papel jugado por *S. zooepidemicus* en otros casos de ERIC en perros de perrera, no ha sido establecido.

El aislamiento de *S. zooepidemicus* de estos perros se incrementa con el tiempo en la perrera, indicando que los pulmones de estos perros llegan a estar infectados con estas bacterias. Tal infección podría ocurrir de infecciones subclínicas del tracto respiratorio superior o de una cepa simple patogénica. Un sistema de tipificación PCR para el gen de la proteína SzP variable tipo M, permite la separación de 15 conocidos sero-tipos de *S. zooepidemicus* en cinco grupos definidos, HV1-5 (Walter y Timoney, 1998). Análisis con estos sistemas de mecanografiado de Anzai et al, (2000) encontró que las variantes clonales simples de *S. zooepidemicus* fueron encontradas en el pulmón de neumonía de caballo mientras que los diferentes tipos se encuentran en amígdalas de los caballos sanos. Sería interesante para los sub-tipos de *S. zooepidemicus* aislar los iniciadores involucrados de ERIC para determinar si una variante simple clonal está presente en la población enferma, y también para examinar la relación, si la hay, que los aislados de *S. zooepidemicus* canina tienen que causar la enfermedad respiratoria en caballos o en otros animales. La neumonía asociada de *S. zooepidemicus* se da en caballos de todas las edades y la neumonía acusada hemorrágica en caballos viejos, que son estresados por el transporte (Anzai et al, 2000). En este brote de ERIC en perros jóvenes y las condiciones clínicas pobres a la entrada de la perrera eran susceptibles a la infección con *S. zooepidemicus* como en los perros viejos y estos estaban sanos a la entrada.

En esta perrera, la terapia antibiótica es dada para un rango de infecciones, y el tratamiento no es rutinariamente dada a perros con ERIC excepto en casos de bronconeumonía severa. Es posible que el tratamiento pudiera estar influenciado por el espectro de la bacteria anotado en este estudio. Sin embargo la examinación de brotes naturales de enfermedades respiratorias puede proporcionar información valiosa que no es obtenida de otras maneras.

ERIC es conocida para ser una enfermedad multi-factorial que incluye a diversos agentes como CAV-2, CPIV, *B. bronchiseptica* y *Mycoplasma* spp. En esta perrera en la cual un gran número de perros de diversas localidades son traídos juntos y domesticados, muchos patógenos están presentes y la severidad de esta enfermedad podría reflejar esto.

#### **Ejemplo 2: La asociación de *Mycoplasma cynos* con la enfermedad infecciosa respiratoria canina.**

La presencia de *M. cynos* fue investigada por el cultivo del organismo e identificación por análisis PCR. En una encuesta de 184 perros de perrera, nosotros encontramos que el porcentaje de perros con *M. cynos* en la traquea o pulmón se incrementa con signos de enfermedad respiratoria de 10% en perros sanos a 31% en perros enfermos (figura 3).

Nosotros también anotamos que la enfermedad respiratoria se incrementa con el tiempo en la perrera y durante la primera semana en los perros de perrera no se detectó *M. cynos* en la traquea, mientras que en la segunda semana 24% de 184 perros de la población estaba siendo infectada con esta bacteria. Un pequeño pero similar aumento fue también visto por la colonización del pulmón (de 15% a 23%) (vea figura 4).

#### **Ejemplo 3: La asociación de *Chlamydia* con la enfermedad infecciosa canina respiratoria.**

Nosotros reconocimos 210 perros por análisis PCR para la presencia de *Chlamydia*.

Un fragmento de par de bases (pb) 218 del gen 23S ARNr fue amplificado des la Chlamydofilia por el siguiente PCR. Las condiciones de reacción, 95°C 5min (x 1 ciclo), 95°C 30 segundos, 50°C 30 segundos, 72°C 1 minuto (x 40 ciclos) y 72°C 5 min. La reacción de PCR mezcla 50 µl del total incluido 5.0 µl 10x buffer libre de magnesio (Promega), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.5 µl (0.5 unidades) Taq ADN polimerasa (Promega), 0.2 mM nucleótido PCR mezcla (Promega), 0.025 µg seguido del iniciador C1 (5'-GATGCCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAG GA-3', SEC ID NO: 9) y el iniciador contrario C2 (5'-TGGCTCATCATGCAAAGGCA- 3', SEC ID NO: 10), 40 µl agua y 2 µl de tejido de muestra de ADN.

Un producto PCR obtenido de 8 perros fue confirmado como una Chlamydofilia por análisis de secuencia y comparación del producto PCR para todas las posibles secuencias en Genbank por análisis Fasta. La secuencia parcial de gen 23S ARNr de tal secuencia (DHBC10) es mostrada en la figura 5 (SEC ID NO: 1). Esta secuencia pb 218 es 99.08% idéntica que la misma región en Chlamydofilia abortus y 98.6% idéntica a Chlamydofilia psittaci y 96.3% idéntica a Chlamydofilia felis y en los análisis filogenéticos preeliminarios (método clustal con Megalign) la mayoría de las secuencias del grupo en un clade distinto (figura 7). Las secuencias parciales 23S ARNr de otras siete aisladas Chlamydofilia son mostradas en la figura 8 (SEC ID Nos: 2-8).

En esta estadística nosotros encontramos un incremento en la detección de Chlamydofilia con un incremento en la severidad de la enfermedad respiratoria en la tráquea y pulmón. Un ligero incremento de la detección de 10% fue encontrado en las muestras de tráqueas (de 25% a 34%). Una diferencia más dramática fue encontrada en la detección de Chlamydofilia en el pulmón, con un incremento de 0% en perros sanos a 37.5% en perros con ERIC (figura 6). Además, un incremento en el número total de perros examinados positivos por PCR para Chlamydofilia desde 25% en perros sanos a 50% en perros con enfermedad severa fue anotada (Figura 6).

#### **Ejemplo 4: La asociación de herpesvirus canino con enfermedad respiratoria infecciosa canina.**

Nosotros encontramos un incremento en la prevalencia de herpesvirus canino en perros con síntomas severos respiratorios (figura 9). Cuando el anticuerpo monitorizado responde a CHV mas de un periodo de un año, los perros de las perreras con frecuentes brotes de enfermedad respiratoria mostraron seroconversiones de CHV más frecuentemente (58.3%) que los perros de perreras similares sin los brotes (8.3%).

#### **Referencias**

Angus, J.C., Jang, S.S., Hirsh, D.C., (1997). Estudio Microbiológico de aspiraciones transtraqueales de perros con enfermedad respiratoria del tracto inferior conjeturado: 264 casos (1989-1995). J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 55-58.

Anzai, T., Walker, J.A., Blair, M.B., Chambers, T.M., Timoney, J.F., (2000). Comparación de fenotipos de Streptococcus zooepidemicus aislados de amígdalas de caballos sanos y especímenes obtenidos de potrillos y burros con neumonía Am. J. Vet. Res. 61, 162-166.

Appel MJ, Percy DH. virus de parainfluenza tipo SV-5 en perros, (1970) J Am Vet Med Assoc. 1970 Jun 15; 156(12):1778-81.

Appel, M., Binn, L.N., 1987. Traqueobronquitis Canina Infecciosa, artículo de revista: Tos Perruna. In: Appel M. (Ed.), Virus Infections of Carnivores. Elsevier. Oxford. pp.201-211.

Arizmendi F, Grimes JE, Relford RL. (1992). Aislamiento de Chlamydia psittaci de la efusión pleural en un perro. J Vet Diagn Invest. 4(4): 460-3.

Azetaka, M., Konishi, S., (1988). Tos perruna compleja: confirmación y análisis del brote en Japón. Jap. J. Vet. Sci. 50, 851-858.

Balter, S., Benin, A., Pinto, S.W.L., Teixeira, L.M., Alvim, G.G., Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliot, Alvim, G.G., Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliot. Nefritis Epidemica in Nova Serrana, Brazil. Lancet. 355, 1776-1780.

Barile, M. F. (1985) Inmunización contra infecciones de micoplasma p 451-452. In S. Razin and M.F. Barile (Ed.). Las Mycoplasmas, vol 4. Patogeneidad de Mycoplasma. Academic Press, Inc, Orlando, Florida.

Barile M. F. et al., (1985). Actual estatus en los controles de enfermedades mycoplasmáticas en el hombre, animales, plantas e insectos. Bull. Inst. Pasteur. 83: 339-373.

Bemis, D.A., Carmichael, L.E., and Appel, M.J. (1977a). Enfermedad respiratoria desarrollada de forma natural en la perrera causada por Bordetella bronchiseptica. Cornell Vet 67, 282-93.

Bemis DA, Greisen HA, and Appel MJ. (1977b). Patogénesis de bordetellosis canina. J Infect Dis 135:753-762.

Biberstein, E.L., Brown, C., Smith, T., (1980). Serogrupos y Biostipos entre beta-hemolítico streptococci de origen canino, J. Clin. Microbiol. 11, 558-561.



- Biberstein, E.L., Hirsh, D.C., (1999). Streptococci en: Hirsh, D.C., Zee, Y.C., (Eds.) Microbiología Veterinaria. Blackwell Science. Oxford. pp 120-126.
- 5 Binn, L. N., Eddy, G. A., Lazar, E. C., Helms, J., and Murnane, T. (1967). Virus recuperados del laboratorio de perros con enfermedad respiratoria. Proc Soc Exp Biol Med 126, 140-5, Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J, Rycroft AN. Enfermedad respiratoria en perros de perrera: Respuesta serológica a la Bordetella bronchiseptica Lipopolisacarida no correlacionada con aislamiento bacterial o síntomas respiratorios clínicos. Clin Diagn Lab Immunol. 10 (3): 352-6. 2003,
- 10 Chanter, N., (1997) Streptococci y enterococci como animales patógenos. J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 83,100S-109S.
- Cocoran, B. (1998). Técnicas de colección citológicas en: Luis Fuentes, V. Swift, S., (Eds.), Manual de medicina y cirugía cardiorespiratoria de pequeños animales. British Small Anim. Vet. Assoc. Cheltenham. pp. 75-79.
- Ditchfield, J., Macpherson, L. W., and Zbitnew, A. (1962). Asociación de adenovirus canina (Toronto A 26/61) con un brote de laringotraqueitis ("tos de perrera"). Can. Vet. Jour. 3, 23 8-247
- 15 Ellis JA, Haines DM, West KH, Burr JH, Dayton A, Townsend HG, Kanara EW, Konoby C, Crichlow A, Martin K, Headrick G. (2001) Efecto de vacunación en infección experimental con Bordetella bronchiseptica in dogs. J Am Vet Med Assoc. 218(3): 367-75.2001
- Erles, K., Toomey, C., Brooks, H.W., Brownlie, J. (2003). Detección de un grupo 2 de coronavirus en perros con enfermedad respiratoria infecciosa canina. Virology. In press.
- 20 Farrow JA, et al. (1984). "Estudios Taxonomicos de Streptococci de grupos serologicos C, G and L y Posiblemente relacionado con taxa". Syst. Appl. Microbiol. 5: 483-493.
- Fraser G, Norval J, Withers AR, Gregor WW. (1985) Un caso de historia de psittacosis en el perro. Vet Rec. 1969 85(3): 54-8.
- Fukushi H, Ogawa H, Minamoto N, Hashimoto A, Yagami K, Tamura H, Shimakura S, Hirai K. (1985) Vigilancia Seroepidemiologica de Chlamydia psittaci en gatos y perro en Japón. Vet Rec. 117(19): 503-4.
- 25 Garnett, N.L., Eydeloth, R.S., Swindle, M.M., Vonderfecht, S.L., Strandberg, J.D., Luzarraga, M.B., (1982). Neumonía Hemorrágica streptococcal en los actuales procedimientos de búseuda en perros. J. Am. Vet. Med Assoc. 181, 1371-1374.
- Gresham AC, Dixon CE, Bevan BJ. (1996) Brote Domiciliario de psittacosis en perros con potencial infección zoonítica. Vet Rec. 138(25):622-3.
- 30 Jang SS, Ling GV, Yamamoto R, Wolf AM. (1984) Mycoplasma como causa de infección del tracto urinario canino. J Am Vet Med Assoc 185(1):45-7
- Karpas, A., King, N.W., Garcia, F.G., Calvo, F., and Cross, R.E. (1968a). traqueobronquitis canina: aislamiento y caracterización de agente con reproducción experimental de la enfermedad. Proc Soc Exp Biol Med,127, 45-52.
- 35 Karpas A, Garcia FG, Calvo F, Cross RE. (1968b) Producción Experimental de traqueobronquitis canina (tos perruna) con herpesvirus canino aislado en perros. Am J Vet Res.29(6):1251-7.
- Keil, D.J., and Fenwick, B. (1998). Papel de Bordetella bronchiseptica en traqueobronquitis infecciosa en perros. J Am Vet Med Assoc. 15, 200-7.
- Lambrechts N, Picard J, Tustin RC. (1999) Chlamydia-inducida septica polyartritis en un perro. J. S Afr Vet Assoc. 70(1):40-2).
- 40 Lou, T.Y., and Wenner, H.A. (1963). Infección Natural y experiemtal de perros con reovirus, tipo1: patogenicidad de la cepa de otros animales. Am.J.Hyg. 77,293-304.
- McCandlish, I.A.P., Thompson, H., Cornwell, H.J.C.,Wright, N.G., 1978. Un studio de perros con tos de las perreras. Vet. Rec.102, 298-301.
- 45 McKiernan, B.C., Smith, A.R., Kissil, M., 1982. Bacterias aisladas de la traquea inferior de los perros clinicamente sanos. J. Am. Anim. Hospl. Assoc. 20, 139-142.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R., (Eds.), 1999. Microbiología Clínica Veterinaria. Mosby. pp.129-130.

- Randolph JF, Moise NS, Scarlett JM, Shin SJ, Blue JT, Bookbinder PR. (1993). Prevalencia de recuperación micoplasmal y ureaplasmal recuperados de lavavos traqueobronquiales y prevalencia de recuperación micoplasmal de frotis faringuela de especimenes en perros con o sin enfermedad pulmnar. *Am J Vet Res.* Mar;\_54 (3):387-91.
- Rosendal, S. (1972). *Acta Vet. Scand.* 13: 137.
- 5 Rosendal & Vinther (1977). Experimental neumonía micoplasmal en perros: microscopía electrónica de tejido infectado. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 85B. (6):462-5.
- Rosendal, S. (1978). *Mycoplasmas Caninos: Patogenecidad de micoplasmas asociados con neumonía de moquillo.* *J. Infect. Dis.* 138(2), 203-210.
- 10 Sadatsune, T., Moreno, G., 1975. Contribución al studio de b-\_hemolitica streptococci aislada de perros. *Arq. Inst. Biol. Sao. Paulo.* 42, 257-264.
- Sako T, Takahashi T, Takehana K, Uchida E, Nakade T, Umemura T, Taniyama H. (2002) Infección Chlamydial en lesiones arterosclerosis en canes. *Artereosclerosis.* 162(2):253-9.
- Smith J.E., 1967. La bacteria aerobica de la nariz y amigdalas en perros sanos. *J. Comp. Path.* 71,428-433.
- Storz, J. (1988) *Microbiologia de Chlamydia.* p. 168 Ed A. L. Barron, Boca Raton, CRC Press.
- 15 Swango LJ, Wooding WL Jr, Binn LN. 1970. Una comparación de la patogénesis y antigenecidad del virus de hepatitis infecciosa caninas y la cepa de virus A26-61 (Toronto). *J Am Vet Med Assoc.* 1970 Jun 15; 156(12):1687-96.
- Thompson H, McCandlish IAP, Wright NG: (1976). Enfermedad respiratoria experimental en perros debido a *Bordetella bronchiseptica.* *Res Vet Sci* 20:\_16-23.
- 20 Thrusfield, M.V., Aitken, C.G.G., Murihead, RH., (1991). Un campo de investigación de tos de perrera, periodo de incubación y signos clínicos. *J. Small Anim. Pract.* 32,215-220.
- Timoney, J.F. (1987). *The Streptococci.* In: Gyles, C.L., Thoen C.O., (Eds.) *Patogenesis de infecciones bacterial en animales.* Iowa State University Press. pp. 12-13.
- 25 Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., Barlough, J.E., (Eds), 1988. El gen *Streptococcus.* en: *Microbiologia y enfermedades infecciosa de animales domésticos de Hagan y Bruner.* Comstock Publishing Associates, London. pp. 181-187.
- Ural O, Tuncer I, Dikici N, & Aridogan B. (2003). Meningitis de *Streptococcus zooepidemicus* y bacteremia. *Scand J Infect Dis.* 35(3): 206-207.
- 30 Walker, J.A., Timoney, J.F., (1998). Bases Moleculares de variación en proteínas Szp en protección de *Streptococcus zooepidemicus.* *Am. J. Vet. Res.* 59, 1129-1133.
- Walker RL & Runyan CA (2003). Identificación de variaciones de proteínas de Szp de Identification of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* y la relación entre las proteínas variantes y los signos de infección en caballos. *Am J Vet Res.* 64(8): 976-81.
- 35 Werth D, Schmeer N, Muller HP, Karo M, Krauss H. (1987). Demostración de anticuerpos contra of *Chlamydia psittaci* y *Coxiella burnetii* en perros y gatos: comparación de la enzima inmunoensayo, técnica immunoperoxidas, test de fijación de complemento y test de precipitación de gel agar Zentralbl Veterinarmed B. 34(3): 165-76.
- Wood, J.L.N., Burrell, M.H., Roberts, C.A., Chanter, N., Shaw, Y., (1993). *Streptococci y Pasteurella spp.* Asociada con la enfermeda de tracto respiratorio inferior equino. *Equine Vet. J.* 25, 314-318.
- 40 Young S, Storz J, Maierhofer CA. (1972) Características patogénicas de infección experiemtal inducida chlamydial en perros. *Am J Vet Res.* 33(2): 377-83.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna para la vacunación de perros que comprende:
  - un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *Streptococcus equi* sub species *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) en un perro, donde dicho agente se compone de *S. zooepidemicus* inactivado o atenuado o un fragmento inmunológico de *S. zooepidemicus*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento; y
  - 5 un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) en un perro, donde dicho agente se compone de *M. cynos* atenuado o inactivado, o un fragmento inmunológico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento.
2. Una composición de vacuna según la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente o adyuvante.
- 10 3. Una composición de vacuna según la reivindicación 1 o 2 que comprende además un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra coronavirus respiratoria canina (CRCV), donde dicho agente se compone de CRCV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunológico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunológico.
- 15 4. Una composición de vacuna según la reivindicación 3, donde el fragmento inmunológico de CRCV se compone de la proteína Spike o la proteína hemaglutinina-esterasa (HE), o una porción inmunogénica de la proteína Spike o HE.
- 20 5. Una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además un agente capaz de elevar la respuesta inmune de un perro contra el virus de parainfluenza canino (CPIV), donde dicho agente se compone de CPIV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunológico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunológico.
- 25 6. Una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra adenovirus tipo 2 canino (CAV-2), donde dicho agente se compone de CAV-2 atenuado o inactivado, o un fragmento inmunológico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunológico.
- 30 7. Una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra herpesvirus canino (CHV), donde dicho agente se compone de CHV atenuado o inactivado, o un fragmento inmunológico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunológico.
- 35 8. Una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*), donde dicho agente se compone de *B. bronchiseptica* atenuada o inactivada, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico.
- 40 9. El uso de un agente capaz de elevar la respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro y un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro, como se definió en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC) en un perro.
10. El uso de un agente capaz de elevar la respuesta inmune contra *S. epidemicus* en un perro y un agente capaz de elevar la respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro, como se definió en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* y dicho *M. cynos* en un perro.
11. El uso según a las reivindicaciones 9 o 10 donde el medicamento además comprende uno o más cualesquiera de:
  - un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CRCV;
  - un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CPIV;
  - 45 un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CAV-2;
  - un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CHV;
  - un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra *B. bronchiseptica* como se definió en la cualquiera de las reivindicaciones 3-8.
- 50 12. Una composición que contiene un agente capaz de elevar la respuesta inmune contra *S. zooepidemicus* en un perro y un agente capaz de elevar una respuesta inmune contra *M. cynos* en un perro, como se definió en la reivindicación 1, para el uso como medicamento.
13. Una composición según la reivindicación 12 para su uso como un medicamento veterinario.

14. Una composición según la reivindicación 13 para su uso como un medicamento veterinario canino.

15. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 12-14 que comprende además una cualquiera o más de:

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CRCV;

5 un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CPIV;

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CHV;

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra B. bronchiseptica, como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 3-8.

10 16. Un kit de partes para una composición de vacunas, comprendiendo:

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra S. zooepidemicus como se definió en la reivindicación 1; y

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra M. cynos como se definió e la reivindicación 1, y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente o adyuvante.

15 17. El kit según la reivindicación 16, que comprende además una cualquiera o más de:

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CRCV;

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CPIV;

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CAV-2;

un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra CHV; y

20 un agente capaz de elevar la respuesta inmune en un perro contra B. bronchiseptica, como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 3-8.

FIGURA 1

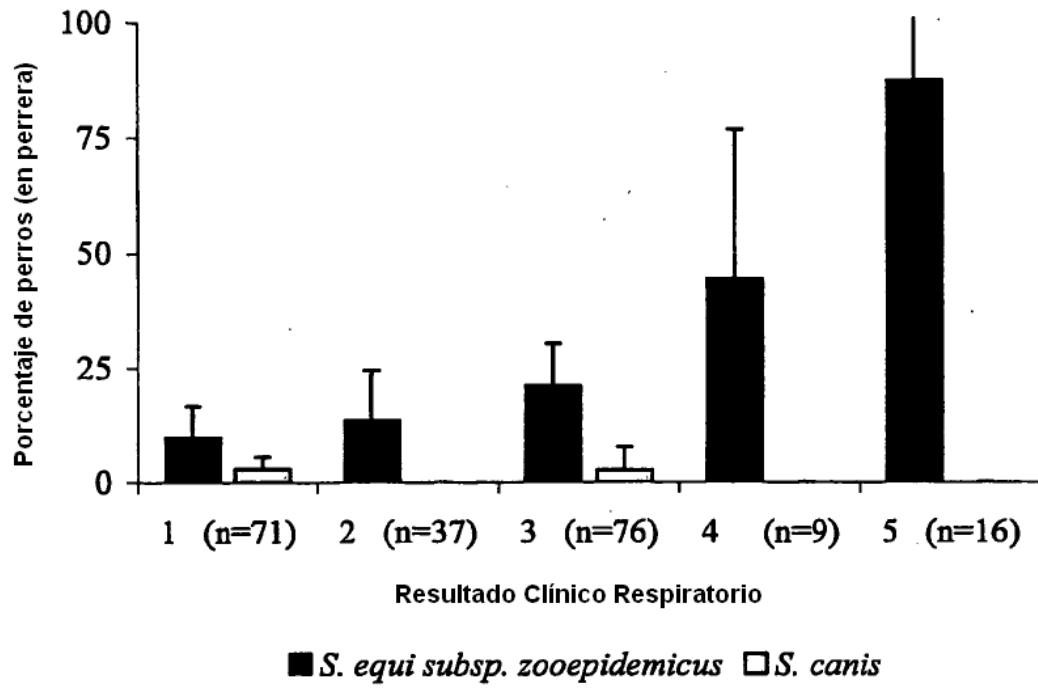


FIGURA 2

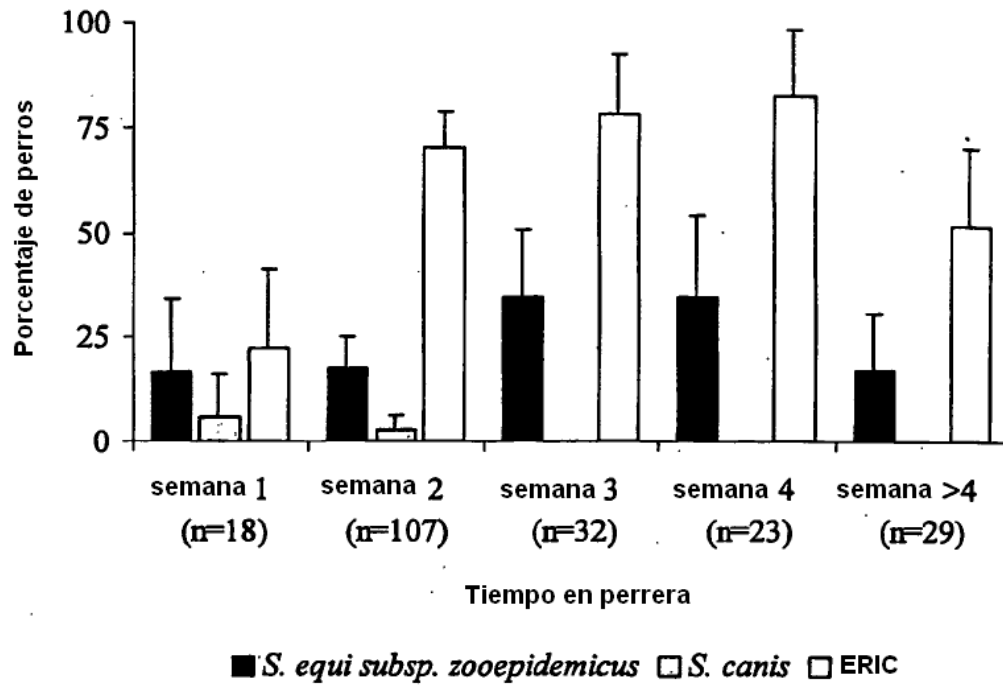


FIGURA 3

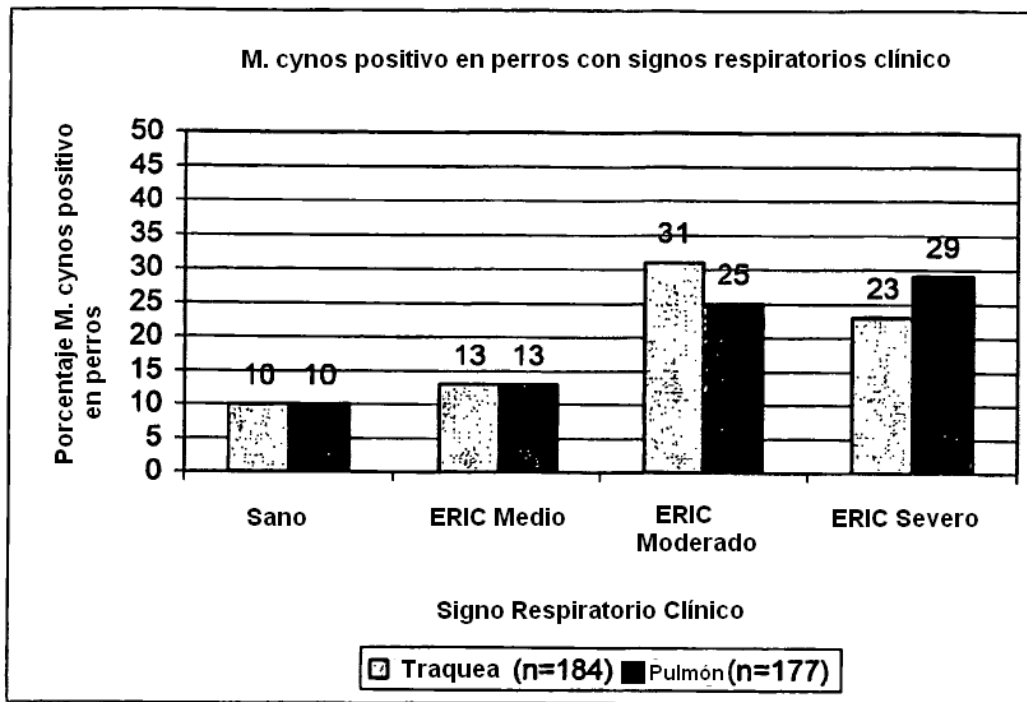


FIGURA 4

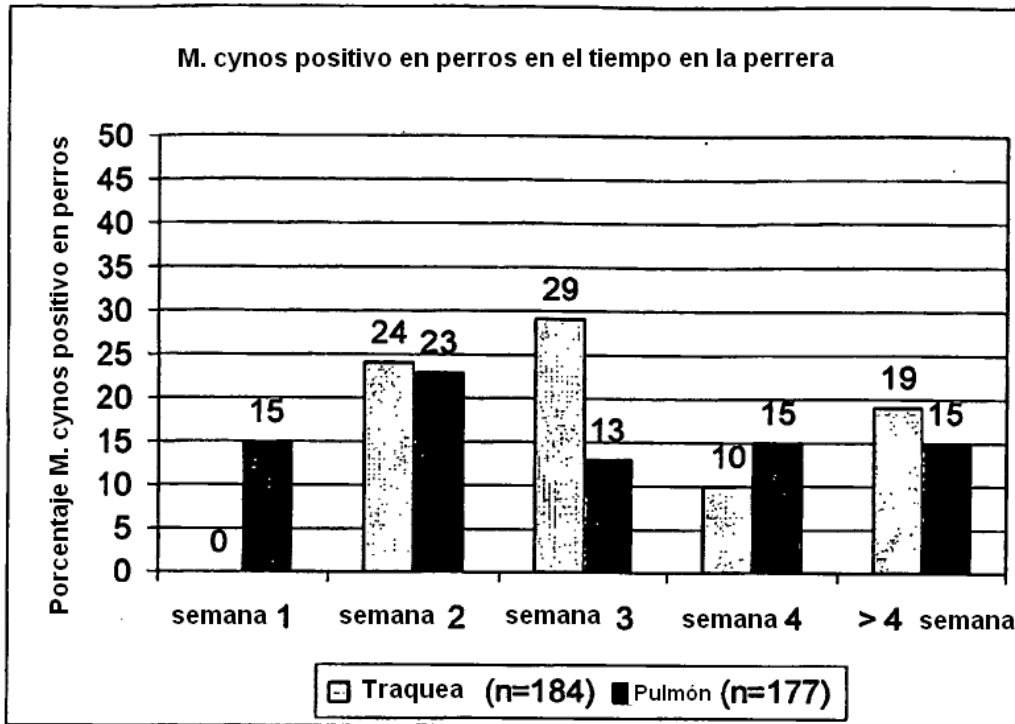


FIGURA 5

AGTGGTCTCC CCAGATTCAG ACTAGGTTTC ACGTGCCTAG CCCTACTCAG  
 GTATCGAATA GAGTCTCTTG TTTTTTCGTC TACGGGACTA TCACCCTGTA  
 TCGTTCTACT TTCCAGAAGT ATTCGACTAA AACTTAAGAT CCCATGTTAT  
 CGACCCTACA ACCCCACATT AAAAATGTGG TTTGGTCTTC TCCCCTTTCG  
 CTCGCCGCTA CACAGGGA (SEC ID NO: 1)



FIGURA 6

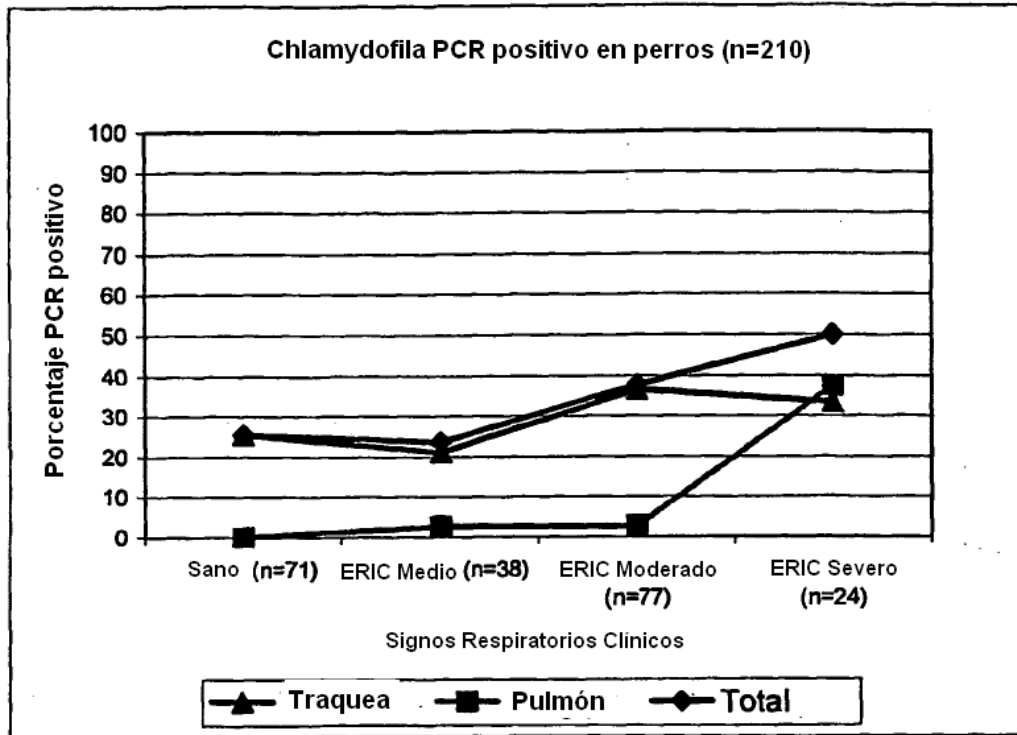


FIGURA 8

**DHBC2**

GACAGTGGTC TCCCCAGATT CAVACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT  
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTWC GTCTACGGGA CTATCACCCCT  
 GTATCGTTCT ACTTTCCAGA AGTATTCGAC TAAAACTTAA GATCCCATGT  
 TATCGACCCCT ACAACCCAC ATTA AAAATG TGGTTGGTC TTCTCCCCTT  
 TCGCTCGCCG CTACACAGGG A (SEC ID NO : 2)

**DHBC4**

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TTTCACGTGT CTAGCCCTAC  
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTTT CGTCTACGGG ACTAACACCC  
 TGTATCGTTC TACTTTCCAG AAGTATTCGA CTAAAACTTA AGATCCCATG  
 TTATCGACCC TACAACCCCA CATTAAAAAT GTGGTTTGGT CTTCTCCCCT  
 TTTGCTCGK CCGYTATCA X CAGGG (SEC ID NO : 3)

**DHBC5**

GADAGTGGTC TCCCCAGATT CADA CTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT  
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTTC GTCTACGGGA CTATCACCCCT  
 GTATCGTTCT ACTTTYCAGA AGTATTCGAC TAAWWCTTAA GATCCCATGT  
 TATCGACCCCT ACAACCCAC ATTWWWWATG TGGTTGGTC TTCTCCCCTT  
 TYGCTCGCCG CTACACAGGG A (SEC ID NO : 4)

**DHBC6**

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TKtCACGTGT CTAGCCCTAC  
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTKT CGTCTACGGG ACTATCACCC  
 TGTATCGTTC TACTTTCCCA GAAGTATTCG ACTAAA AHCT TAAGATcCCC  
 ATGTTATCGA CCCTACAACc CCCACATDAA AAATGTGGTT TGGTCTTCTC  
 CCCTTTGCT CGCCGCT (SEC ID NO : 5)

**DHBC7**

GABAGTGGTC TCCCCAGATT CAGACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT  
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTTC GTCTACGGGA CTATCACCCCT  
 GTATCGTTCT ACTTTCCAGA AGTATTCGAC TAAAACTTAA GATCCCATGT  
 TATCGACCCCT ACAACCCAC ATTA AAAATG TGGTTGGTC TTCTCCCCTT  
 TCGCTCGCCG CTACTCAGGG A (SEC ID NO : 6)

**DHBC8**

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGTCAAAA TATCACGTGT TCCGACCTAC  
 TCAGGATACT ATTAGTATTA TTGAGAAIBT TAATTACAGG AGTATCACCT  
 TCTATGCTCT AGTTTCCAAC TAATTCATCT ATTCTCTTTA ATTACACATT  
 ATAGTCCTAC AAcCCCCMAA TGCAAGCATT GGGTTTGTC TAATCCCAGT  
 TCGCTCGCCG CTACACAGGG (SEC ID NO : 7)

**DHBC9**

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TTTCACGTGT CTAGCCCTAC  
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTTT TGTCTACGGG ACTATCACCC  
 TGTATCGTTC TACTTTCCAG AAGTATTCGA CTAAAACTTA AGATCCCATG  
 TTATCGACCC TACAACCCCA CATXAAAAT GTGGTTTGGT CTTCTCCCCT  
 TTCGCTCGCC GCTACACAGG (SEC ID NO : 8)

FIGURA 9

