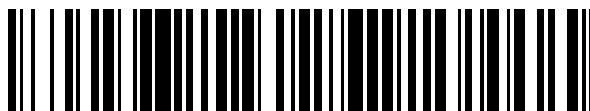


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 278**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/29** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05735365 .8**  
96 Fecha de presentación: **10.03.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1723170**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **VACUNA CANINA PARA LA PROTECCIÓN CONTRA LA ERLIQUIOSIS.**

30 Prioridad:  
**11.03.2004 US 552350 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.02.2012**

73 Titular/es:  
**WYETH LLC  
FIVE GIRALDA FARMS  
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:  
**HU, Liangbiao (George);  
HESS, Thomas, Jay;  
CHIANG, Yu-Wei y  
CHU, Hsien-Jue (Steve)**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 374 278 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

Vacuna canina para la protección contra la erliquiosis

### Antecedentes de la invención

5 La erliquiosis canina es una enfermedad letal producida por *Ehrlichia canis* (*E. canis*), un patógeno intracelular transmitido por la sangre y que infecta a todas las razas de perros en cualquier fase de crecimiento. La erliquiosis canina la transmite principalmente la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, que se cree que es el reservorio principal de la enfermedad. La erliquiosis canina es una enfermedad posiblemente letal que es endémica de los Estados Unidos y que aparece en todo el mundo. Los síntomas normalmente progresan desde una patología aguda a crónica dependiendo de la cepa del organismo y del estado inmune del huésped. En casos agudos, los  
10 síntomas incluyen secreción nasal y ocular mucopurulenta, deshidratación, hiperplasia retículoendotelial, fiebre, linfadenopatía generalizada, esplenomegalia y trombocitopenia. En casos crónicos, pueden producirse síntomas variables de anorexia, depresión, pérdida de estamina, rigidez y reticencia a caminar, edema en las extremidades o en el escroto, y tos o disnea.

15 Actualmente no existe ninguna vacuna disponible para el tratamiento o la prevención que sea eficaz contra la erliquiosis canina. El tratamiento habitual para todas las formas de erliquiosis es la administración de un antibiótico, tal como tetraciclina, durante un mínimo de 2 semanas para casos agudos, o de 1-2 meses en casos crónicos. En casos crónicos, las anomalías hematológicas pueden persistir durante 3-6 meses, o de por vida. Puede ser necesaria una terapia complementaria para combatir el desgaste y disfunción de órganos específicos. Claramente, se preferiría la prevención eficaz de la enfermedad en un régimen con antibióticos post-infección.

20 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de vacuna segura y eficaz, útil inducir inmunoprotección contra la erliquiosis canina en perros.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la prevención o mejora de la erliquiosis canina en perros.

25 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para inducir la erliquiosis canina en un animal de ensayo. Dicho procedimiento es útil para evaluar y estudiar las defensas del huésped y los mecanismos patógenos y para mejorar el desarrollo de vacunas contra la erliquiosis.

Es una característica de la presente invención que la composición de vacuna pueda proteger a los perros contra múltiples cepas de *E. canis* que se originan en una diversidad de regiones geográficas.

30 Es otra característica de la presente invención que la inmunoprotección eficaz contra la erliquiosis canina pueda impartirse a perros de cualquier edad.

Otros objetos y características de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que se expone a continuación en el presente documento.

### Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona una composición de vacuna segura y eficaz, que comprende: una cantidad inmunizante eficaz de dos cepas de una bacterina inactivada de *Ehrlichia canis* en la que dichas cepas de bacterina inactivadas comprenden *Ehrlichia canis ebony* y *Ehrlichia canis broadfoot* un excipiente farmacológicamente aceptable, y una cantidad inmunogénicamente estimulante de un sistema adyuvante que consiste esencialmente en un agente inductor de una respuesta de anticuerpos y un agente inductor de una respuesta inmune mediada por células (IMC).

40 La presente invención también proporciona un procedimiento para la prevención o mejora de erliquiosis canina en perros.

### Descripción detallada de la invención

45 El agente causante de la erliquiosis canina es *Ehrlichia canis* (*E. canis*), una bacteria gram-negativa del orden *Rickettsiales*, que aparece individualmente o en inclusiones compactas en leucocitos circulantes de mamíferos y que se trasmite por garrapatas. La erliquiosis canina es endémica en muchas partes de Estados Unidos y se sabe que aparece en todo el mundo. La erliquiosis canina aguda, de origen natural, simula la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas. Los casos más graves se producen en los meses más calientes, lo que coincide con la mayor actividad del vector de la garrapata. La erliquiosis canina puede ser una enfermedad letal. Muy a menudo es una enfermedad crónica que puede afectar a un perro de cualquier edad, produciendo síntomas variables, tales como anorexia, depresión, pérdida de estamina, rigidez y reticencia a caminar, edema de las extremidades o del escroto, tos o  
50 disnea. Hasta el momento, no se conocen tratamientos de vacunación o de inmunización eficaces disponibles contra la erliquiosis canina.

Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que una composición de vacuna, que comprende una cantidad inmunizante eficaz de dos cepas de una bacterina inactivada de *E. canis* en la que dichas cepas de bacterina

inactivadas comprenden *Ehrlichia canis ebony* y *Ehrlichia canis broadfoot*, un excipiente farmacológicamente aceptable, y una cantidad inmunogénicamente estimulante de un sistema adyuvante que consiste esencialmente en un agente inductor de una respuesta de anticuerpos y un agente inductor de una respuesta inmune mediada por células (IMC), puede administrarse a perros en cualquier etapa de crecimiento para prevenir o mejorar la erliquiosis canina, preferentemente a las 18 semanas de vida o más.

La bacterina de *E. canis* adecuada para su uso en la composición de vacuna de la presente invención puede ser de una o más cepas, tales como las denominadas cepa Ebony, Broadfoot, Florida, Israel 611, Kogashima 1, Louisiana, Oklahoma, Venezuela, la cepa Jake de la Universidad del Estado de Carolina del norte (NCSU), los aislados Demon, DJ y Fuzzy de la NCSU, líneas celulares infectadas por *E. canis* con cualquiera de las cepas designadas, líneas celulares DH82 infectadas por *E. canis* con cualquiera de las cepas designadas o las líneas celulares DH82 infectadas por *E. canis* depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD), y con el número de acceso CRL 10390 proporcionado, según se desvela en la patente de Estados Unidos número 5.192.679, o similar. Una bacterina de *E. canis* adecuada para su uso en la composición de vacuna de la presente invención puede ser preferentemente de dos cepas de *E. canis*, tales como Ebony y Broadfoot.

La cepa Ebony, por ejemplo, tiene una homología del 99,9 por ciento con la cepa Oklahoma basada en la secuencia de ADN recombinante (ADNr) 16S (es decir, una diferencia de un nucleótido) [Mathew JS y col., Attempted transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* after passage in cell culture, Am J Vet Res nov. 1998; 57 (11) :1594-8], y se ha demostrado que la garrapata marrón del perro, (*Rhipicephalus sanguineus*) (Mathew 1996), en estado ninfa y adulto, puede transmitirla a los perros.

Se ha desvelado que la cepa Florida, contiene un gen principal de proteína inmunorreactiva de 28 kDa conservado (Patente de Estados Unidos N° 8.458.942) y un gen p-30 que pertenece a la familia de genes múltiples omp-1 (Patente de Estados Unidos N° 6.432.649). Por otra parte, la Patente de Estados Unidos N° 6.043.085 desvela que la cepa Florida tiene una proteína antigénica inmunodominante de 120 kDa, que contiene 14 repeticiones con 36 aminoácidos cada una, que se supone que está expuesta en la superficie. Las unidades de repetición son hidrófilas y forman el núcleo de las regiones de la proteína expuestas a la superficie y son ricas en serina y en ácido glutámico. Cada serina y ácido glutámico comprenden el 19% de los aminoácidos de una unidad de repetición. Se cree que la cepa Florida es menos virulenta que la cepa Jake de la NCSU de *E. canis* [Breitschwerdt y col. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine Erliquiosis followed by challenge inoculation with two Ehrlichia canis strains, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, feb 1998; 42 (2) :362-68], mientras que la comparación serológica con la cepa Oklahoma reveló una especificidad del 100% y una sensibilidad del 87,5 % [Dawson JE y col. Serological comparison of human erliquiosis using two Ehrlichia canis isolates. J Infect Dis. mar 1991; 163 (3) :564-7].

Además de ser cultivadas en una línea celular canina continua (por ejemplo, DH82) (Keysary A y col. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of Ehrlichia canis in Israel, Vet Parasitol abril 1996; 62 (3-4): 331-40.), la cepa Israel 611 se ha cultivado en una línea celular macrófaga continua de ratón (por ejemplo, J774.A1) (Keysary A y col. Cultivation of Ehrlichia canis in a continuous BALB/c mouse macrophage cell culture line, J Vet Diag Invest nov 2001; 13 (6): 521-3). La cepa Israel 611 tiene dos formas de morfología: (1) completamente empaquetada y (2) holgadamente empaquetada, y la secuencia de su gen de ARNr 16S tiene tres nucleótidos diferentes a los de la cepa Oklahoma y cuatro nucleótidos diferentes a los de la cepa Florida, con un hueco de un nucleótido en cada uno (Keysary, 1996). El grado de diferencia de homología de la cepa Oklahoma es del 0,54 por ciento, mientras que la diferencia de la cepa Florida es del 0,61 por ciento (Keysary, 1996).

Al igual que la cepa Florida, la cepa Louisiana tiene un gen principal de proteína inmunorreactiva de 28 kDa conservado (Patente de Estados Unidos N° 6.458.942), un gen p 30 que pertenecen a la familia de genes múltiples omp-1 (Patente de Estados Unidos N° 6.432.649), y como se desvela en la patente de Estados Unidos N° 6.043.085, una proteína antigénica inmunodominante de 120 kDa, que contiene 14 repeticiones con 36 aminoácidos cada una, que se supone que están expuestas en la superficie. Las unidades de repetición son hidrófilas que forman el núcleo de las regiones de la proteína expuestas a la superficie, y son ricas en serina y ácido glutámico. Cada serina y ácido glutámico comprenden el 19% de los aminoácidos de una unidad de repetición.

También de forma similar, la cepa Oklahoma tiene un gen principal de proteína inmunorreactiva de 28 kDa conservado (Patente de Estados Unidos N° 6.458.942), un gen p-30 que pertenece a la familia de genes múltiples omp-1 (Patente de Estados Unidos N° 6.432.649), y como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 6.043.085, una proteína antigénica inmunodominante de 120 kDa, que contiene 14 repeticiones con 36 aminoácidos cada una, que se supone que están expuestas en la superficie. Las unidades de repetición son hidrófilas que forman el núcleo de las regiones de la proteína expuestas a la superficie y son ricas en serina y ácido glutámico. Cada serina y ácido glutámico comprenden el 19% de los aminoácidos de una unidad de repetición. Adicionalmente, McBride JW y col. encontraron que la Oklahoma posee un gen de glucoproteína (2.064 pb) que codifica proteínas de 548 a 688 aminoácidos con supuestas masas moleculares de sólo 61 y 73 kDa, pero con movilidades electroforéticas de 140 kDa (P140), respectivamente. El gen de la proteína de 140 kDa tiene catorce (14) unidades de repetición, casi idénticas de 108 pb dispuestas en tándem. La región de 14 repeticiones (78%) del gen P140 (1.620 pb), se expresó en *Escherichia coli*. La proteína recombinante presentó masas moleculares que variaban de 1,6 a 2 veces más que las previstas por las secuencias de aminoácidos. Los anticuerpos contra las proteínas

recombinantes reaccionan con P140 de *E. canis*. Se detectaron hidratos de carbono en las proteínas recombinantes de *E. canis*. Un análisis de la composición de hidratos de carbono identificó glucosa, galactosa y xilosa en las proteínas recombinantes. La presencia de un solo sitio para la glucosilación unida a N (Asn-Xaa-Ser/Thr), una falta de efecto de N-glucosidasa, la presencia de 70 y 126 sitios de glucosilación Ser/Thr en las regiones de repetición P120 y P140, respectivamente, y una alta relación molar de hidratos de carbono frente a la proteína sugieren que los glucanos pueden unirse al O (McBride JW y col. Glycosilation of Homologous Immunodominant Proteins of Ehrlichia chaffeensis and Eherlichia canis. Infection and Immunity, enero de 2000, 68 (1 ):13-18). La Oklahoma puede cultivarse en la línea celular macrófaga canina DH82 en un medio esencial mínimo que contiene un 12,5% de suero bovino fetal y L-glutamina 200 mM (Bowie, MV y col. Potential value of major antigenic protin 2 for serological diagnosis of heartwater and related Ehrlichial infections, Clin Diagnostic Lab. Immun, Mar; 1999, 6 (2):209-15). Una comparación serológica con la cepa FL reveló una especificidad del 100% y una sensibilidad del 87,5% (Dawson 1991, mencionado anteriormente). Se ha encontrado una similitud del 99,9 por ciento, sobre la base de la secuencia de ADNr de 16S, con las cepas Ebony (Mathew 1996), Kagoshima 1 (Unver A y col. Analysis 16S rRNA gen sequences of Ehrlichia canis, Anaplasma platys, and Wolbachia species from canine blood in Japan, Ann NY Acad. Sci. 2003 Jun; 990:692-8) y Venezuela (Unver A y col. Molecular antigenic comparison of Ehrlichia canis isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela, J Clin Microbiol agosto 2001; 39 (8): 2788 -93).

Para los aislados Demon, DJ y Fuzzy de la NCSU y la cepa Jake, todos poseen un gen principal de proteína inmunorreactiva de 28 kDa conservado (Patente de Estados Unidos N° 6.458.942). Se ha desvelado que DJ, Fuzzy y Jake también tienen un gen p 30 que pertenece a la familia de genes múltiples omp-1 (Patente de Estados Unidos N° 6.432.649). Se cree que la cepa Jake es más virulenta que la Florida (Breitschwerdt 1998, mencionado anteriormente).

Se encontró que casi toda la secuencia de RNAr de 16S de Kagoshima 1 era más similar a las secuencias de las cepas Oklahoma y Venezuela de *E. canis* (un par de bases de diferencia entre 1.387) con un de 99,9 por ciento de identidad de secuencia (Unver de 2003, mencionado anteriormente). Además, y de manera similar, para su alta identidad de secuencia con respecto a la cepa Kagoshima 1, la cepa Venezuela tiene una similitud del 99,9 por ciento con respecto a la cepa Oklahoma en base a la secuencia de ADNr de 16S (Unver 2001).

En la realización práctica preferida, la bacterina de *E. canis* se cultiva en una línea celular canina macrófaga de monocitos, denominada a veces, células macrófagas caninas continuas o línea celular macrófaga canina, mantenida en un medio que contiene RPMI1640 complementado con suero bovino fetal, glucosa y glutamina. Preferentemente, las células se cultivan en un medio de mantenimiento que puede ser RPMI1640, OptiMEM, o AIM V, preferentemente RPMI1640, complementado con hasta el 10% de suero bovino fetal, hidrolizado de lactalbúmina al 0,5%, Polimixina B 30 µg/ml, piruvato de sodio 110 µg/ml, bicarbonato de sodio 2,5 mg/ml, glucosa 4 mg/ml, L-glutamina 6 mg/ml, sulfato de magnesio 0,55 mg/ml, y se cultivan durante hasta 95 días, preferentemente durante hasta 35 días, más preferentemente entre 5 y 10 días, para conseguir una dosificación  $DICT_{50} \geq 1 \times 10^4$  (Dosis Infeciosa de Cultivo de Tejido), y después el cultivo se recoge y se procesa para la inactivación.

Después, la bacterina *E. canis* obtenida de esta manera puede inactivarse por medios de inactivación convencionales. Por ejemplo, inactivación química usando agentes de inactivación químicos, tales como etilenimina binaria, beta-propiolactona, formalina, mertiolato, gluteraldehído, dodecil sulfato de sodio, o similares, o una mezcla de los mismos, siendo la formalina el agente de inactivación preferido. La bacterina también puede inactivarse por calor o con psoraleno en presencia de luz ultravioleta.

La cantidad inmunizante eficaz de bacterina de *E. canis* inactivada puede variar dependiendo de la cepa o cepas seleccionadas y puede ser cualquier cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunoprotectora. Son adecuadas cantidades en las que la unidad de dosificación comprende al menos aproximadamente una  $DICT_{50}$  de  $1 \times 10^4$  de bacterina de *E. canis* inactivada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente inductor de una respuesta de anticuerpos" indica cualquier compuesto o combinación de compuestos, capaces de potenciar una respuesta inmune humoral. Son ejemplos típicos el copolímero de anhídrido maleico de etileno (EMA), emulsiones de látex de un copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y metacrílico, tales como Neocryl® A-640 (Avecia Neo Resius, Frankfort, IN), hidróxido de aluminio, o similares, o una mezcla de los mismos. El agente inductor de una respuesta de anticuerpos de la presente invención es preferentemente una mezcla de EMA y Neocryl®. Neocryl® es el nombre comercial registrado de Avecia BV, Sluisweg 12 P.O. Box 123 NL-5140 AC Waalwijk Países Bajos, para polímeros y copolímeros acrílicos de transmisión hídrica. El número A640 indica una calidad del mismo. Neocryl® A640 es un copolímero acrílico acuoso con estireno no combinado, que tiene un pH de 7,5, una viscosidad de 100 cps (25 °C Brookfield), un peso de 1,03 g/cm<sup>3</sup> que se suministra con un 40 por ciento en peso de sólidos, una gravedad específica de 1,30 mg/l, una temperatura de transición vítrea (Tg) de 44 °C, una temperatura mínima formadora de película (TMFP) de 40 °C y un índice de acidez (no volátil) de 50. Específicamente, Neocryl® A640 es un copolímero acrílico acuoso con estireno no combinado. Más específicamente, Neocryl® A640 es una emulsión de látex de un copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y metacrílico.

En la presente invención, son calidades útiles adecuadas del copolímero EMA los copolímeros lineales de etileno - anhídrido maleico, tales como EMA-31 (Monsanto Co., St. Louis, MO), que es un copolímero ácido funcional. Estos

copolímeros son solubles en agua, finos y blancos, sin polvos fluyendo que tienen las siguientes propiedades típicas: un punto de reblandecimiento de aproximadamente de 170 °C, una temperatura de descomposición de aproximadamente 247 °C, un pH de 2,3 (solución al 1%), y una viscosidad específica de 0,9-1,2 g/100 ml (solución en dimetilformamida al 1%).

- 5 La expresión "agente inductor de una respuesta inmune mediada por células (IMC)", como se usa en el presente documento, indica cualquier agente, o combinación de agentes, capaces de potenciar una respuesta inmune celular. Son ejemplos típicos agentes biológicos, tales como una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) (Calbiochem, La Jolla, CA) o similares, y las citocinas relacionadas con Th1, tales como interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18), interferón gamma o similares, preferentemente IL-12; o sustancias que son emulsiones de aceite en agua, tales como emulsión de aceite de parafina en agua como EMULSIGEN® SA (MVP Laboratories, Ralston, NE), aceite SP (una composición de escualeno, Pluronic® 121 L y Tween® 80 (el escualeno es de VWR / Kodak, Rochester, NY, y el Pluronic® L121 disponible de BASF, Mt. Olive, Nueva Jersey), SAF- 1 (Syntex adyuvante Formulación-1, una composición de análogo de treonilo de dipéptido muramílico con Tween 80, Pluronic® L121 y escualeno, descrita por Byars, NE y Allison, AC, Vaccine, 5(3):223-28) o similares, preferentemente, EMULSIGEN® SA y más preferentemente, una emulsión de aceite en agua. EMULSIGEN® es una marca registrada de Modern Veterinary Products, 5404 Miller Ave. Omaha, Nebraska 68127, EE.UU., para adyuvantes antigénicos veterinarios de una naturaleza de aceite en agua emulsionada. Las letras SA indican una calidad de la misma. EMULSIGEN® SA, una parafina emulsionada en una base oleosa adyuvante, es de color blanco lechoso cuando se mezcla con caldo de soja trípica (TSB) (concentración final al 20%), con una viscosidad de 25-50 cps (viscosímetro de Brookfield LV, huso nº 18, a 30 rpm), y comprende al menos un 80% de gotitas en fase oleosa menores o iguales a ocho (8) micrómetros. Pluronic® es una marca registrada de BASF Corporation para copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno y el número L121 indica una calidad del mismo.

- Las cantidades inmunogénicamente estimulantes del sistema adyuvante pueden variar de acuerdo con el agente inductor de una respuesta de anticuerpos, el agente inductor de IMC, el componente de bacterina *E. canis*, el grado de una posible exposición infecciosa, el procedimiento de administración de la composición de vacuna, la etapa de crecimiento y el tamaño del perro, o similares. Por otra parte, las cantidades inmunogénicamente estimulantes del sistema adyuvante son cantidades que son suficientes para potenciar una respuesta inmune frente al agente inmunizante - bacterina de *E. canis*. En general, son adecuadas cantidades de aproximadamente el 1% al 6% vol/vol, preferentemente de aproximadamente el 4% vol/vol del agente inductor de una respuesta de anticuerpos y de aproximadamente el 3% al 7% vol/vol, preferentemente del 5% vol/vol, del agente inductor de IMC.

- Los excipientes farmacológicamente aceptables adecuados para su uso en la composición de vacuna de la invención pueden ser cualquier excipiente líquido convencional adecuado para composiciones farmacéuticas veterinarias, y preferentemente es una solución salina equilibrada, de manera que sea adecuada para su uso en medios de cultivo de tejido.

- 35 Además de la bacterina inactivada de *E. canis* como principio activo, se contempla que la composición de vacuna de la invención también pueda contener otros componentes activos, tales como un componente antipatógeno dirigido contra el virus de la rabia, enfermedad de Lime (*Borrelia burgdorferi*), virus del moquillo canino, parvovirus canino, adenovirus canino, coronavirus canino, Giardia; *Leptospira interrogans* tales como las serovariedades *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *grippotyphosa* o *bratislava* o similares, o una combinación de los mismos.

- 40 En una realización de la invención, el componente inactivado de la bacterina de *E. canis* de la invención puede incorporarse en liposomas usando tecnología conocida tal y como se describe en Nature, 1974, 252, 252 a 254 o Journal of Immunology, 1978, 120, 1109-1113. En otra realización de la invención, el componente inactivado de la bacterina de *E. canis* de la invención puede conjugarse con compuestos biológicos adecuados tales como polisacáridos, péptidos, proteínas, o similares, o una combinación de los mismos.

- 45 En una realización preferida de la invención, la composición de vacuna de la invención puede formularse en una forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y garantizar uniformidad de la dosificación. En el presente documento, una unidad de dosificación en lo que respecta a la composición de vacuna se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la bacterina de *E. canis* calculada para producir el efecto inmunogénico deseado junto con el sistema adyuvante y excipiente o vehículo necesarios.

La composición de vacuna de la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica o similares, preferentemente, por vía subcutánea o por vía intradérmica, y más preferentemente, por vía subcutánea, o dicha composición puede administrarse por vía oral o por vía intranasal.

- 55 Por consiguiente, la presente invención también proporciona la composición como se describe en el presente documento para la prevención o la mejora de erliquiosis canina en perros

En la realización práctica preferida, la composición de vacuna de la invención se administra por vía parenteral, por vía oral, o por vía intranasal, preferentemente por vía parenteral, más preferentemente por vía subcutánea, en

cantidades efectivas de acuerdo a un programa determinado por el tiempo de posible exposición a un transmisor de la bacteria *E. canis*. De esta manera, el animal tratado puede tener tiempo para crear inmunidad antes de la exposición natural. Por ejemplo, un programa de tratamiento típico puede incluir la administración parenteral, preferentemente por inyección subcutánea, al menos 5 semanas antes de una posible exposición. Se prefieren al menos dos administraciones, por ejemplo, la primera a aproximadamente 5 semanas y una segunda a aproximadamente 2 semanas antes de una posible exposición de los animales tratados.

Los cultivos viables de cada una de *E. canis* Broadfoot (denominada a veces *E. canis* BF, o Broadfoot), y *E. canis* Ebony (denominada a veces Ebony) se han depositado (11 de febrero del 2004) en la ATCC (en los términos y requisitos del Tratado de Budapest en relación con el depósito de microorganismos para los fines de un procedimiento de patente), y se les ha otorgado, respectivamente, los números de referencia de la ATCC, PTA-5811 para la cepa Broadfoot y PTA-5812 para la cepa Ebony.

Para una comprensión más clara de la invención, a continuación se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son meramente ilustrativos y se entiende que no limitan el alcance ni los principios subyacentes de la invención de ninguna manera. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de los ejemplos que se exponen a continuación en el presente documento y len a descripción anterior. Dichas modificaciones también pretenden incluirse dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Al menos que se indique lo contrario, todas las partes son partes en peso.

## EJEMPLO 1

### Evaluación de un modelo de exposición virulento de *E. canis*

#### A. Preparación de la reserva de exposición

Se realizaron pases repetidos de la bacteria viva *E. canis* cepa Ebony en perros. Las muestras de sangre completa de los perros infectados se centrifugaron a 2500 x g durante 15 minutos. La capa leucocitaria se recogió y se diluyó con solución tamponada con fosfato (PBS), después se estratificó sobre Histopaque® 1077 y el material estratificado se centrifugó a 400 x g durante 45 minutos. Se recogieron las CMSP y se lavaron con PBS. Las CMSP lavadas se mezclaron con suero bovino fetal al 20% y dimetilsulfóxido al 10% y se congelaron en nitrógeno líquido. Antes de su uso, la reserva de exposición se diluyó con solución salina tamponada hasta una dilución final de 1:3 o 1:4 de reserva de exposición: solución salina tamponada.

#### B. Procedimiento de exposición

En esta evaluación, se distribuyeron, de forma aleatoria en dos grupos, 20 perros de edades comprendidas entre 8 a 12 meses de vida. Los perros se expusieron mediante la vía subcutánea con 1 ml de la reserva de exposición. Un grupo se expuso con una dilución 1:3 de reserva de exposición y el resto del grupo se expuso con una dilución 1:4 de reserva de exposición. Después de la exposición, se observó a los perros y se extrajeron muestras de sangre 3 x por semana para controlar los síntomas clínicos de la enfermedad, incluyendo trombocitopenia, durante un total de 56 días.

#### C. Observaciones

Los síntomas clínicos observados incluyeron secreciones nasales y oculares mucopurulentas, depresión, deshidratación, linfadenopatía y edema corneal. Las secreciones oculares mucopurulentas y la deshidratación fueron los síntomas observados con más frecuencia. Las secreciones oculares mucopurulentas y la deshidratación son específicas del progreso de la enfermedad y reflejan indirectamente la gravedad de la enfermedad. Para cada síntoma clínico se registró una incidencia por punto de tiempo de observación y se comparó la incidencia total entre los grupos. De los puntos de tiempo observados, el 53% (dilución 1:3) y el 35% (dilución 1:4) tuvieron secreción ocular mucopurulenta y el 44% (dilución 1:3) y el 30% (dilución 1:4) tuvieron deshidratación.

En esta evaluación también se observó una tasa de mortalidad significativamente elevada. La inducción de mortalidad es el indicador más llamativo de la fuerte patogénesis de la bacterina de *E. canis* usada en la reserva de exposición. Para el tratamiento de dilución 1:3, el 100% de los perros cumplieron la definición del evento de erliquiosis y para el tratamiento de dilución 1:4, el 80% cumplieron la definición del evento de erliquiosis. Los datos se muestran en la Tabla I.

Se registraron las temperaturas rectales como un indicador de infección por *Ehrlichia*. La mayoría de los perros infectados tuvieron alguna incidencia de temperatura rectal elevada. Los datos se muestran en la Tabla II.

Se observó trombocitopenia (recuento de plaquetas en sangre por debajo de 200.000 / $\mu$ l) comenzando aproximadamente a los 12 días después de la exposición (DPC) y durante el resto del período observado. Los datos se muestran en la Tabla III.

### Conclusiones

5 El modelo de exposición descrito anteriormente en el presente documento produjo graves síntomas clínicos de erliquiosis canina en perros y proporcionó una definición de evento de enfermedad de erliquiosis para su uso en estudios posteriores y evaluación de tratamientos para esta. La definición de evento clínico de erliquiosis canina se definirá por mortalidad, al menos tres días de observación consecutivos de secreción ocular mucopurulenta y/o al menos tres días de observación consecutivos de deshidratación.

**TABLA I**

Dilución	Síntomas clínicos	Número de animales con síntomas durante 3 días consecutivos	% de animales con síntomas durante 3 días consecutivos	Duración media de síntomas clínicos	Incidencia total de síntomas clínicos clasificados
1:3	Secreción nasal mucopurulenta	1/10	10%	0,5 días	5
1:3	Secreción ocular mucopurulenta*	7/10	70%	4,8 días	48
1:3	Depresión	2/10	20%	1,1 días	11
1:3	Deshidratación*	6/10	60%	4,0 días	40
1:3	Linfadenopatía	0	0	0	0
1:3	Edema corneal	1/10	10%	1,2 días	12
1:3	Muerte*	9/10	90%		
1:4	Secreción nasal mucopurulenta	0	0	0,1 días	1
1:4	Secreción ocular mucopurulenta	7/10	70%	3,8 días	40
1:4	Depresión	0	0	0,7 días	7
1:4	Deshidratación*	5/10	50%	3,4 días	34
1:4	Linfadenopatía	0	0	0	0
1:4	Edema corneal	1/10	10%	0,5 días	5
1:4	Muerte*	4/10	40%		ND

\* Los síntomas se incluyen en la definición del evento de erliquiosis.

TABLA II

## Temperatura rectal en °C - Post-exposición

Dilución	12 días	14 días	28 días	42 días	56 días
1:3	40,39	40,94	ND	ND	ND
1:3	39,50	39,56	39,22	37,33	ND
1:3	39,00	39,44	39,72	ND	ND
1:3	39,39	39,39	39,00	32,28	ND
1:3	39,00	39,28	39,78	38,94	ND
1:3	39,17	39,44	40,28	38,61	ND
1:3	40,22	40,06	40,44	39,33	38,83
1:3	39,56	39,44	40,06	38,33	ND
1:3	39,22	39,22	40,56	38,39	ND
1:3	39,72	29,28	39,22	39,61	38,83
1:4	39,06	38,78	40,61	38,94	ND
1:4	39,39	39,39	40,00	32,89	ND
1:4	38,94	39,11	40,50	38,61	38,61
1:4	39,39	38,94	39,83	38,89	38,72
1:4	39,22	39,17	40,67	39,22	38,78
1:4	38,89	39,00	39,94	39,44	38,33
1:4	39,72	40,11	39,94	38,67	ND
1:4	39,39	39,50	38,44	39,17	38,39
1:4	38,78	38,89	40,78	39,44	38,44
1:4	39,61	38,89	39,83	ND	ND



**TABLA III**  
**Recuento de plaquetas en sangre 10<sup>3</sup>/μl - Post-exposición**

Dilución	0 Días	12 Días	14 Días	19 Días	21 Días	26 Días	28 Días	33 Días	39 Días	56 Días
1:3	407	155/185	101/91,4	1,42/2,95	599/1,24	ND	ND	ND	ND	ND
1:3	301	269	164/126	3,3/1,16	4,76/4,9	48,7/50,5	55,5	78,3	4	ND
1:3	497	321	135/164	57,7/41,6	53,8/56,2	107/105	120,0	163	54,3	ND
1:3	534	458	293	2,03/1,29	0,426/1,87	14,6/31,6	8,06	4	5,78	ND
1:3	308	260	205	33,2/20,1	9,59/7,31	6,13/1,89	5,9	52	38,6	ND
1:3	300	374	329	79,2/83	3,47/2,84	0/0,698	2,99	0,788	0,55	ND
1:3	398	360	221	51,4/41,1	50,3/49,6	4,42/6,21	54,6	87,1	62	33,8
1:3	464	413	306	39,2/38	6,38/6,56	55,3/39,3	58,3	97	3,17	ND
1:3	281	225	139/143	1,9/1,41	0/0	5,5/3,55	7,3	2,61	4,2	ND
1:3	263	400	161/162	0,446/0,388	0,612/1,741	7,41/9,23	7,31	8,89	4,82	86,4
1:4	343	342	378	287	139/130	2,7/1/4,11	1,58	44,9	59,9	ND
1:4	411	343	246	1,61/2,19	1,74/1,795	8,58/19,8	6,37	2	,887	ND
1:4	329	434	452	172/193	109/122	5,45/3,08	3,5	2,47	1,99	0,0
1:4	283	289	156/152	98,1/106	50,4/61,6	6,25/3,84	13,2	56,7	57,1	50,8
1:4	286	269	207	63,9/63	13,6/11,3	104/97,2	18,1	55,9	56,4	68,7
1:4	445	609	490	165/190	89,3/84,6	43,1/42,3	3,32	1,84	1,89	51,3
1:4	306	284	146/141	73,8/54,2	30,2/21,2	8,62/5,07	12,2	9,8	3,73	ND
1:4	315	231	204	38,9/9,96	4,73/2,34	3,17/4,86	10,7	5,37	1,08	81,1
1:4	296	249	380	296	228	55,1/51,1	42,6	82,9	59	93,1
1:4	317	281	153/182	2,07/689	4,5/5,78	8,58/8,37	8,18	46,1	ND	ND

## Ejemplo 2

Evaluación de la eficacia inducida por la bacterina de *E. canis* con adyuvante de BCG

5 El BCG, una preparación en autoclave de *Mycobacterium bovis* atenuada, se reconoce como un potente inductor de inmunidad mediada por células (IMC). Para determinar los efectos sinérgicos de la IMC, la bacterina de *E. canis* se mezcló con adyuvante de BCG a diferentes niveles de concentración. Estudios previos demostraron que la bacterina de *E. canis* mezclada únicamente con adyuvantes caninos convencionales (que inducen respuestas a anticuerpos) (tales como EMA y Neocryl®) sólo fueron capaces de inducir una fuerte inmunoprotección secundaria.

## A. Materiales y Procedimientos

10 Se usaron tres grupos de vacunación de 7 perros cada uno y un grupo de control de 6 perros. La vacuna contenía 5 log de DICT<sub>50</sub> (dosificación pre-inactivada) de la bacterina de la cepa Ebony de *E. canis* mezclada con adyuvantes con las siguientes combinaciones de adyuvantes. La vacuna A contenía la bacterina de *borrelia burgdoferi* (BBB) y EMA/Neocryl®. La vacuna B contenía la bacterina *borrelia burgdoferi* (BBB), EMA®/Neocryl y 100 µg/dosis de BCG. La Vacuna C contenía la bacterina de *borrelia burgdoferi* (BBB), EMA/Neocryl® y 1,0 mg/dosis de BCG. Los otros componentes de las tres vacunas eran idénticos. El grupo de control de perros no se vacunó.

15 Los 27 perros se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos. Los primeros tres grupos de 7 perros cada uno, se vacunaron dos veces con la vacuna A, B o C por vía subcutánea en un intervalo de 21 días. El cuarto grupo de 6 perros sirvió como control y no recibió vacunación. Dieciséis días después de la segunda vacunación, todos los perros se expusieron con *E. canis* virulenta y se observaron durante un total de 56 días para detectar síntomas clínicos, tomar las temperaturas rectales y detectar cambios de recuentos de plaquetas en sangre.

## B. Resultados y Discusión

20 Los resultados se resumen en la Tabla IV. Cincuenta y seis días después de la exposición a *E. canis* virulenta, cuatro de los siete perros (57%), del grupo inoculado con la Vacuna A, mostraron trombocitopenia y temperaturas rectales elevadas. En el grupo inoculado con la vacuna B se observaron los mismos resultados. En los perros del grupo inoculado con la vacuna C, sólo dos de los 7 (28,5%) perros vacunados mostraron trombocitopenia y temperaturas rectales elevadas durante el estudio. Cinco de los seis de los perros de control (83%) mostraron trombocitopenia y temperaturas rectales elevadas. Los síntomas clínicos de cada grupo se mezclaron y no hubo diferencias entre los grupos. Los cambios de temperatura corporal y recuentos de trombocitos fueron síntomas típicos de infección por *E. canis* y erliquiosis.

TABLA IV

Grupo	Componentes de la vacuna	Cantidad de perros con trombocitopenia	Cantidad de perros con fiebre
Vacuna A	bacterina de <i>E. canis</i> + BBB <sup>1</sup> + EMA <sup>2</sup> /Neocryl® A640 <sup>3</sup>	4 de los 7 perros (57%)	4 de los 7 perros (57%)
Vacuna B	bacterina de <i>E. canis</i> + BBB + EMA/ Neocryl® A640 + 100 µg/dosis de BCG <sup>4</sup>	4 de los 7 perros (57%)	4 de los 7 perros (57%)
Vacuna C	bacterina de <i>E. canis</i> + BBB + EMA/ Neocryl® A640 + 1,0 mg/dosis de BCG	2 de los 7 perros (28.5%)	2 de los 7 perros (28.5%)
Control	Ninguno	5 de los 6 perros (83%)	5 de los 6 perros (83%)

<sup>1</sup> BBB = bacterina de *borrelia burgdoferi* procedente de las series de producción de Fort Dodge Animal Health.  
<sup>2</sup> Fabricada por Monsanto Co., St. Louis, MO.  
<sup>3</sup> Fabricada por AVECIA Neo Resius, Frankfort, IN  
<sup>4</sup> BCG = Bacilo de Calmette-Guerin, que es *mycobacterium bovis* atenuada, procedente de Calbiochem, La Jolla, CA.

30 Los resultados de este estudio mostraron claramente que la vacuna mezclada únicamente con adyuvante convencional (que inducen respuestas a anticuerpos) (EMA + Neocryl®) no fue protectora. Lo mismo ocurrió cuando se usó la vacuna mezclada con adyuvante con menor dosis de BCG, tal como, 100 µg/dosis. Sin embargo, la vacuna se volvió protectora cuando se mezcló con adyuvante BCG a 1 mg/dosis. Por lo tanto, la inmunoprotección inducida por un inductor de IMC, BCG, a una concentración suficiente para potenciar la respuesta inmune, da como resultado

35

una vacuna de bacterina de *E. Canis* eficaz.

### C. Conclusión

La IMC es necesaria para proteger a los perros de infección por *E. canis*. La bacterina de *E. canis* mezclada solo con un adyuvante canino convencional, no es eficaz induciendo inmunoprotección *in vivo*.

## 5 EJEMPLO 3

### Preparación de una composición de vacuna de *E. canis* inactivada

Se cultivaron dos cepas de bacterina de *E. canis*, Ebony y Broadfoot, cada una en células DH82 mantenidas en un medio que contenía RPMI1640 complementado suero bovino fetal del 5% al 7%, glucosa al 2% y glutamina 2 moles durante 5 a 14 días. Los cultivos resultantes se recogieron a una dosificación  $DICT_{50} \geq 1 \times 10^4$ . Los cultivos recogidos son ajustaron, se lisaron y después se inactivaron por adición de una solución de formalina al 0,1%, se incubaron a  $36 \pm 2$  °C durante un período de 24-48 horas, se añadió otra parte de formalina al 0,1% y se incubó una segunda vez a  $36 \pm 2$  °C durante 24-48 horas. Las dos cepas inactivadas de *E. canis* se mezclaron entre sí a una misma dosis  $DICT_{50}$  de  $1 \times 10^{4,5}$  con el sistema adyuvante descrito a continuación para proporcionar la composición de vacuna A.

#### Composición de vacuna A

Descripción del principio	Cantidad por ml
Ebony de <i>E. canis</i> inactivada	$DICT_{50}$ de $1 \times 10^{4,5}$
Broadfoot de <i>E. canis</i> inactivada	$DICT_{50}$ de $1 \times 10^{4,5}$
EMA <sup>1</sup> -31	1% vol/vol
NEOCRIL <sup>2</sup> A-640	3% vol/vol
Emulsigen <sup>3</sup> SA	5% vol/vol
MEM <sup>4</sup>	C.S. hasta el 100%

<sup>1</sup> Fabricado por Monsanto Co., St. Louis, MO.

<sup>2</sup> Fabricado por AVECIA Neo Resius, Frankfort, IN

<sup>3</sup> Fabricado por MVP Laboratories, Inc., Ralston, NE

<sup>4</sup> Medio Esencial Mínimo (MEM) fabricado por LTI, Grand Island, NY

## 15 EJEMPLO 4

### Evaluación de inmunidad, de doce meses de duración, inducida por la composición de vacuna A contra *E. canis*

En esta evaluación, perros de raza *beagle* de 15 a 16 semanas de vida, se dividieron en 2 grupos, un grupo de control de 15 perros (no vacunados) y un grupo de 27 perros vacunados. El grupo de perros vacunados recibió dos dosis de 1 ml de la composición de vacuna A, descrita en el Ejemplo 3, a un intervalo de 21 días. Doce meses después de la vacunación, todos los animales de ensayo se expusieron, por vía subcutánea, con una dilución 1:3 de un grupo de exposición congelado establecido de células mononucleares de sangre periférica (cmSP) infectadas por *E. canis*, como describe en el ejemplo 1. Los animales de ensayo se observaron 3 x por semana comenzando a los 12 días después de la exposición (DPC). De conformidad con el bienestar animal y con las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), cualquier animal de ensayo que estuviera moribundo o en un mal estado de salud se examinó de cerca por veterinarios con licencia estatal.

Las muestras de suero se evaluaron para determinar anticuerpos de *E. canis* usando un K-ELISA para cuantificar la respuesta inmune después de la vacunación. Las muestras de suero se añadieron por duplicado a los pocillos revestidos con proteínas de extracto de células enteras de *E. canis*. Después, a cada pocillo se le añadió inmunoglobulina (IgG) anticarina de cabra conjugada con peroxidasa y las placas se incubaron a  $36 \pm 2$  °C durante 30 minutos. Después de la retirada del conjugado no unido, las placas se revelaron usando un sistema substitutivo de ATBS. Las placas se leyeron a 405-490 µm durante 20 minutos a intervalos de 35 segundos usando un modo cinético. Los resultados serológicos se muestran en la Tabla V en la que DPV1 indica los días después de la primera dosis de vacuna; DPV2 indica los días después de la segunda dosis de vacuna; MPV2 indica los meses después de la segunda dosis de vacuna, y DPC indica los días después de la exposición.

**Observaciones**

5 Como puede observarse a partir de los datos serológicos de la Tabla V, el grupo vacunado mostró un aumento significativo de anticuerpos sobre el grupo de control (no vacunados). También se observó, después de la exposición, una diferencia significativa en anticuerpos entre los grupos de control y los vacunados. Además de los datos serológicos, se registraron valores de hematocrito, recuentos de plaquetas, temperaturas rectales y pesos corporales semanales. El porcentaje de hematocrito fue significativamente menos bajo en el grupo vacunado, en comparación con el grupo de control. Los recuentos de plaquetas fueron significativamente menos bajos en el grupo de los vacunados, en comparación con el grupo de control a los 44 días después de la exposición. La pérdida de peso fue significativamente menor en los vacunados en comparación con el grupo de control. En el grupo de control, el 87 por ciento cumplía con la definición de evento de erliquiosis canina, incluida la mortalidad. En el grupo de vacunados, el 44 por ciento cumplía con la definición de evento de erliquiosis canina durante los 56 días del periodo de observación clínico.

**Conclusiones**

15 La composición de vacuna contra *E. canis* del Ejemplo 3 redujo significativamente la erliquiosis clínica canina en perros. La administración de dos dosis de 1 ml de dicha vacuna indujo inmunidad durante un periodo de al menos 12 meses. Se obtuvo un aumento significativo de anticuerpos contra *E. canis* en perros mediante la administración de la composición de vacuna del Ejemplo 3.

**TABLA V**

Respuesta de anticuerpos a la vacuna de <i>E.canis</i> inactivada								
Grupo de tratamiento	0 DPV1	0 DPV2	14DPV2	3 MPV2	5 MPV2	9 MPV2	0 DPC	14 DPC
Control	0,000	0,000	0,000	0,072	0,054	0,052	0,030	1,024
Control	0,036	0,006	0,003	0,006	0,003	0,000	0,007	0,773
Control	0,036	0,007	0,005	0,000	0,006	0,000	0,004	0,899
Control	0,000	0,000	0,018	0,000	0,003	0,000	0,000	0,800
Control	0,112	0,027	0,000	0,002	0,005	0,000	0,000	0,916
Control	0,089	0,011	0,023	0,000	0,000	0,005	0,003	0,426
Control	0,006	0,001	0,002	0,002	0,000	0,001	0,002	0,186
Control	0,188	0,065	0,044	0,027	0,020	0,019	0,015	0,426
Control	0,054	0,028	0,021	0,000	0,003	0,002	0,000	0,915
Control	0,008	0,000	0,000	0,006	0,000	0,002	0,000	0,442
Control	0,072	0,011	0,000	0,004	0,004	0,005	0,000	0,364
Control	0,014	0,004	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,536
Control	0,223	0,098	0,057	0,008	0,009	0,006	0,022	0,675
Control	0,064	0,057	0,033	0,002	0,001	0,001	0,003	0,168
Control	0,034	0,014	0,004	0,002	0,001	0,001	0,000	0,068
Media	0,062	0,022	0,014	0,009	0,007	0,006	0,006	0,574
Vacunados	0,022	0,825	0,976	0,503	0,422	0,349	0,294	1,016
Vacunados	0,028	0,533	0,951	0,245	0,113	0,118	0,121	0,859
Vacunados	0,074	0,810	0,966	0,361	0,216	0,236	0,159	0,964

(continuación)

Respuesta de anticuerpos a la vacuna de <i>E.canis</i> inactivada								
Grupo de tratamiento	0 DPV1	0 DPV2	14DPV2	3 MPV2	5 MPV2	9 MPV2	0 DPC	14 DPC
Vacunados	0,035	0,307	0,924	0,246	0,146	0,137	0,091	0,947
Vacunados	0,052	0,377	0,636	0,070	0,034	0,034	0,036	0,663
Vacunados	0,000	0,303	0,889	0,143	0,107	0,067	0,077	0,768
Vacunados	0,061	0,335	0,740	0,097	0,122	0,084	0,061	0,831
Vacunados	0,005	0,403	0,949	0,224	0,191	0,227	0,172	0,772
Vacunados	0,038	0,477	0,885	0,122	0,097	0,158	0,124	0,599
Vacunados	0,020	0,407	0,816	0,075	0,059	0,079	0,045	0,633
Vacunados	0,042	0,463	0,853	0,167	0,101	0,050	0,061	0,886
Vacunados	0,032	0,648	0,945	0,278	0,187	0,185	0,177	1,002
Vacunados	0,050	0,150	0,745	0,196	0,127	0,103	0,071	0,593
Vacunados	0,135	0,652	0,856	0,139	0,080	0,054	0,062	0,866
Vacunados	0,061	0,268	0,900	0,231	0,133	0,089	0,075	0,711
Vacunados	0,119	0,606	0,893	0,243	0,184	0,125	0,101	0,761
Vacunados	0,039	0,335	0,888	0,113	0,062	0,056	0,047	0,734
Vacunados	0,015	0,231	0,911	0,120	0,068	0,051	0,061	0,743
Vacunados	0,030	0,390	0,957	0,108	0,085	0,094	0,048	0,773
Vacunados	0,008	0,295	0,879	0,290	0,209	0,121	0,196	0,828
Vacunados	0,055	0,262	0,737	0,105	0,065	0,076	0,060	0,531
Vacunados	0,041	0,297	0,989	0,306	0,089	0,052	0,145	0,873
Vacunados	0,013	0,226	0,826	0,167	0,090	0,066	0,051	0,706
Vacunados	0,058	0,180	0,518	0,193	0,146	0,093	0,113	0,881
Vacunados	0,065	0,103	0,386	0,050	0,036	0,013	0,000	0,518
Vacunados	0,030	0,159	0,543	0,154	0,168	0,102	0,056	0,416
Vacunados	0,105	0,222	0,364	0,122	0,084	0,039	0,041	0,268
Media	0,046	0,380	0,812	0,188	0,127	0,106	0,094	0,746

**EJEMPLO 5****Evaluación de la inmunidad mediada por células en respuesta a la vacuna de *E. canis* inactivada**

- 5 Se usaron ensayos ELISPOT para IL-12 e IFN- $\gamma$  canino para evaluar los niveles de IL-12 e IFN- $\gamma$  en perros vacunados con la bacterina de *Ehrlichia canis* (*E. canis*). En comparación con los perros de control, la mayor cantidad de manchas de IL-12 e IFN- $\gamma$  producidas por las células mononucleares de sangre periférica aisladas de perros vacunados indicó que una respuesta IMC pudo desempeñar un papel en la protección contra la infección por *E. canis*.
- 10 **A. Materiales y procedimientos**

En este estudio se usaron dos grupos de perros: vacunados que recibieron la bacterina de *E. canis* y controles que no recibieron la bacterina. Se extrajo sangre completa de los perros vacunados y de los de control después de la primera vacunación con la bacterina de *E. canis*. Las muestras de sangre completa de los perros vacunados y de control se recogieron mediante punción venosa estéril en tubos con EDTA 10 ml. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por centrifugación en un gradiente Percoll. Después el aislamiento, para cada muestra, se realizó el recuento de las CMSP y se determinó la concentración celular. Después, las CMSP aisladas se usaron inmediatamente para un ensayo Elispot.

El medio de cultivo completo usado para cultivar las CMPS caninas consistió en idénticos volúmenes de Aim V (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat. N° 12055-083.) y ExCell (JRH Biosciences, Lenexa, KS; Cat. N° 141610 - 500M), suero equino al 10% inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT; Cat. N° SH30074.03) y gentamicina 10 µg/ml.

## Ensayo ELISPOT

### Preparación de placas Elispot

#### Placas de IL-12

Con metanol al 70%, placas Immobilon P (Millipore, Burlington, MA) se humedecieron previamente, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (DPBS) Dulbecco-Vogt, se revistieron con 100 µl/pocillo de anticuerpo anti IL-12 humana de ratón (10 µl/ml; Mabtech, Suecia), se diluyeron en tampón carbonato, pH 9,6, y se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 ± 2 %, durante 2 horas. Después las placas se lavaron con DPBS + Tween 20 al 0,1% y se bloquearon con medio completo Aim V/ExCell a 36 °C, CO<sub>2</sub> al 5 ± 2 %, durante un mínimo de 2 horas.

#### Placas de IFN-γ

Se prepararon placas Elispot para la detección de IFN-γ canina de manera similar a las placas de IL-12 canina, usando un anticuerpo específico para IFN-γ canina. Las placas usadas en este estudio se adquirieron de R & D Systems (Minneapolis, MN, Cat. N° EL781) y se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas placas se revistieron previamente con anticuerpos policlonales anti- IFN-γ caninos.

### Preparación de antígenos

Como antígenos para estimular la producción de IL-12 y de IFN-γ se usaron inicialmente seis preparaciones celulares diferentes. Estas incluían:

1. Células DH82 vivas infectadas por *E. canis*.
2. Lisado de células DH82 infectadas por *E. canis* (las células se lisaron por homogeneización).
3. Lisado de células DH82 infectadas por *E. canis* inactivadas por tratamiento con formalina
4. Solo células DH82 vivas no infectadas.
5. Lisado de células DH82 no infectadas.
6. Lisado de células DH82 no infectadas inactivadas por tratamiento con formalina.

Las tres primeras preparaciones se usaron para estimular la producción de IL-12 y de IFN-γ. Las tres preparaciones restantes se usaron como controles negativos en el ensayo. El día del ensayo, se recogieron células DH82 vivas infectadas y no infectadas por *E. canis*, se contaron y se determinó la concentración celular. La cantidad deseada de células vivas y de células equivalentes del lisado de células (tratadas con o sin formalina) se resuspendió en el medio de cultivo completo AimV/Excell y se aplicaron al ensayo. En el medio de cultivo completo se prepararon los mitógenos Concanavalina A (Con A) Sigma Cat N° C0412 y Lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) Sigma Cat. N° L-4144 y se usó como controles positivos para el ensayo.

### Incubación de *E. canis* y de CMPS

Las placas revestidas con anticuerpos, después las 2 horas de bloqueo con medio, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) + Tween 20 al 0,1%. A los pocillos revestidos con anticuerpos, se añadieron las células DH82 vivas infectadas y no infectadas por *E. canis*, los lisados de células, el medio y el control positivo, a una dilución apropiada en volúmenes de 150 µl por pocillo. En los pocillos apropiados se añadieron las CMPS que se habían diluido hasta una concentración de células deseada en el medio de cultivo completo y 50 µl/pocillo de cultivo de células. Después se incubaron las placas a 36 °C ± 2 °C, CO<sub>2</sub> al 5 ± 2% de 20 a 50 horas dependiendo del ensayo que se estuviera realizando.

### Revelado de las placas

#### Placas de IL-12

Después de la incubación, las células se retiraron lavando con DPBS + Tween 20 al 0,1%. Antes de su uso, el anticuerpo de detección biotinilado (Mabtech, Suecia, Cat. N° 3450-6) se diluyó en DPBS + albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% a 1,0 µg/ml y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm. A los pocillos apropiados se

añadieron 100 µl de anticuerpos de detección. Después las placas se incubaron a 36 °C ± 2 °C, CO<sub>2</sub> al 5 ± 2% durante tres horas. Se retiró el anticuerpo de detección y las placas se lavaron con DPBS + Tween 20 al 0,1 %. Las placas se incubaron con estreptavidina conjugada con HRP 100 µl/pocillo (KPL, Gaithersburg, MD; Cat. N° 14-30-00) diluida a 1:1000 en DPBS + Tween 20 al 0,1 % a 36 °C, CO<sub>2</sub> al 5 ± 2% durante 1 hora.

- 5 Durante la incubación, se preparó una solución sustrato. En un matraz de vidrio Erlenmeyer, se disolvió un comprimido de 20 mg de AEC (3-amino-9-etil-carbazol, Sigma, St. Louis, MO; Cat. N° D4254) en N, N-dimetilformamida (DNF) 2 ml. Una vez disuelto, a la solución sustrato se le añadieron 58 ml de acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) y 30 µl de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que después se filtró a través de un filtro de 0,45 µm antes de su uso.
- 10 Para retirar el detergente residual, las placas se lavaron con DPBS + Tween 20 al 0,1 %, seguido de un lavado solo con DPBS. Se añadieron cien µl de solución sustrato a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante un máximo de 20 minutos. La reacción se detuvo retirando la solución sustrato y aclarando con agua destilada. Las placas se secaron a temperatura ambiente y las unidades productoras de manchas (SPC) se evaluaron para determinar la cantidad, área e intensidad usando un lector Zeiss Elispot (Carl Zeiss Vision, Oberkochen, Alemania)
- 15 con un programa informático KS ELISPOT 4,4.

#### Placas de IFN-γ

- Después de la incubación, las células se retiraron lavando con tampón de lavado (R&D Systems, Minneapolis, MN). El anticuerpo de detección biotinilado se diluyó en un tampón de dilución 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y antes de su uso se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm. A
- 20 los pocillos apropiados, se añadieron cien µl de anticuerpos de detección. Las placas se incubaron después a 36 °C ± 2 °C, CO<sub>2</sub> al 5 ± 2% durante tres horas. El anticuerpo de detección se retiró y las placas se lavaron con tampón de lavado. Las placas se incubaron con estreptavidina-AP 100 µl/pocillo diluida de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R & D System, Minneapolis, MN) a 36 °C ± 2 °C, CO<sub>2</sub> al 5 ± 2% durante 1 hora.

- 25 Después de la incubación con estreptavidina-AP, las placas se lavaron con tampón de lavado y se incubaron con BCIP/NBT (R&D System, Minneapolis, MN) 100 µl por pocillo a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción se detuvo retirando la solución sustrato y aclarando la placa con agua destilada. Después, las placas se secaron a temperatura ambiente y las unidades productoras de manchas (SPC) se evaluaron para determinar la cantidad, área e intensidad usando un lector Zeiss Elispot (Carl Zeiss Vision, Oberkochen, Alemania) con un programa informático KS ELISPOT 4,4.

#### 30 **Análisis de Datos**

- Los resultados se leyeron como células formadoras de manchas (SFC) y, dependiendo de la naturaleza de los experimentos, se expresaron de diferente manera. Hubo tres posibles formas de presentar los datos: la cantidad de manchas originales en cada pocillo, la cantidad promedio de manchas para cada tratamiento por cada muestra y el índice de estímulo. El índice de estímulo se calculó dividiendo la cantidad promedio de manchas en pocillos no
- 35 estimulados (solo células + medio de cultivo) entre la cantidad promedio de manchas en pocillos estimulados.

#### **B. Resultados e interpretación**

Esta evaluación se realizó para evaluar la cantidad de células secretoras de IL-12 e IFN-γ en CMPS aisladas de perros vacunados contra *E. canis*.

- 40 En este experimento, se usó un perro de control y tres vacunados. Los resultados del experimento se presentan en las tablas VI y VII. En la Tabla VI, los datos indican que sólo las células DH82 vivas infectadas por *E. canis* estimulan la producción de IL-12 en CMPS en los tres perros vacunados en comparación con la no producción en CMPS del perro de control. La estimulación también depende de la dosis después de infectar células DH82 con *E. canis*, teniendo la dilución 1:10 de la reserva de *E. canis* (equivalente a 1x10<sup>4</sup> células/pocillo) mayor cantidad de manchas que la dilución 1:1000. El lisado de células DH82 infectadas por *E. canis* con o sin tratamiento con formalina, las
- 45 células DH82 vivas no infectadas, el lisado de células DH82 no infectadas y las células DH82 lisadas tratadas con formalina, no produjeron ninguna respuesta detectable a IL-12. Dos de los perros vacunados reaccionaron a un grado más alto que el tercero vacunado. El perro de control no mostró ninguna respuesta a ningún estímulo a excepción de una leve respuesta a mitógeno positivo (PHA).

- 50 La Tabla VII muestra los resultados de los Elispots de IFN-γ de los mismos cuatro perros. De manera similar que IL-12, las células DH82 vivas infectadas por *E. canis* vivas mostraron la mayor inducción de manchas de IFN-γ en los tres perros vacunados. La inducción también depende de la cantidad de células infectadas por *E. canis*, presentándose el nivel más alto en la dilución 1:10 y el nivel más bajo en la dilución 1:1000. El lisado de células DH82 infectadas por *E. canis* produjo una menor cantidad de manchas para los perros vacunados. El lisado tratado con formalina produjo un fondo en la dilución 1:1000, pero no produjo manchas en las diluciones 1:10 o 1:100. Esto
- 55 pudo deberse al efecto inhibitorio de la formalina residual sobre la actividad de las células mononucleares. Las células DH82 no infectadas en las tres preparaciones sólo produjeron manchas de fondo en comparación con las células

DH82 vivas infectadas por *E-canis*. La respuesta individual de los perros fue similar a la observada en el Elispot de IL-12. Los mismos dos perros vacunados mostraron una mayor respuesta que el tercero y el perro de control mostró una menor respuesta a la estimulación solo con mitógeno (Con A).

5 Los resultados de este experimento demostraron que sólo las células DH82 vivas infectadas por *E. canis* pueden inducir la producción de IL-12 y de IFN- $\gamma$  por las CMPS. Ni el lisado de células DH82 infectadas por *E. canis* ni el lisado tratado con formalina pudieron usarse debido al bajo efecto de estimulación sobre linfocitos T o monocitos sobre la actividad celular.

**C. Resumen**

10 Los datos mostrados en las Tablas VI y VII a continuación en el presente documento demuestran que la IMC puede desempeñar una función en la protección de perros vacunados con la bacterina de *E. canis*. La cantidad aumentada de manchas de IL-12 e IFN- $\gamma$  para los perros vacunados representa la activación de linfocitos T y de monocitos.

**TABLA VI**  
**Respuesta Elispot para IL-12 en perros inducida por la bacterina de *E.canis***

	Dilución del antígeno											
	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
Lisado de células DH82 infectadas por <i>E-canis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lisado de células DH82 inactivadas infectadas por <i>E.canis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Lisado de células DH82 no infectadas	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Lisado de células DH82 inactivadas, no infectadas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células DH82 vivas infectadas por <i>E.canis</i>	0	0	0	88	23	2	76	24	3	10	7	1
Células DH82 vivas no infectadas	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
no estimuladas	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0
Control positivo	3	4	3	81	92	66	130	120	113	44	33	31



**TABLA VII**  
**Respuesta Elispot de IFN- $\gamma$  en perros inducida por la bacterina de *E.canis***

	Dilución del antígeno											
	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
Lisado de células DH82 infectadas por <i>E.canis</i>	0	0	0	181	216	104	82	88	75	3	1	1
Lisado de células DH82 inactivadas infectadas por <i>E.canis</i>	0	0	0	0	0	116	0	0	76	1	7	3
Lisado de células DH82 no infectadas	0	0	0	96	155	106	37	87	87	3	3	2
Lisado de células DH82 inactivadas no infectadas	0	0	0	0	1	109	0	0	95	0	4	4
Células DH82 vivas infectadas por <i>E.canis</i>	16	6	0	450	295	183	430	230	72	77	33	4
Células DH82 vivas no infectadas	2	6	0	52	109	117	33	45	106	1	5	1
no estimuladas	0	0	0	77	52	64	90	76	68	3	1	1
Control positivo	33	44	61	270	305	262	210	187	186	281	303	255

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende: una cantidad inmunizante eficaz de dos cepas de una bacterina inactivada de *Ehrlichia canis*, en la que dichas cepas de bacterina inactivada comprenden *Ehrlichia canis* Ebony y *Ehrlichia canis* Broadfoot, un excipiente farmacológicamente aceptable, y una cantidad inmunogénicamente estimulante de un sistema adyuvante que consiste esencialmente en un agente inductor de una respuesta de anticuerpos y un agente inductor de una respuesta inmune mediada por células
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha bacterina inactivada se combina con una o más cepas de *E. canis* denominadas Florida, Israel 611, Kogashima 1, Louisiana, Oklahoma, Venezuela, la cepa Jake de la Universidad del Estado de Carolina del Norte (NCSU), los aislados Demon, DJ y Fuzzy de la NCSU, líneas celulares infectadas por *E. canis* con cualquiera de las cepas indicadas, y una línea celular DH82 infectada por *E. canis* con cualquiera de las cepas indicadas.
- 15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente inductor de una respuesta de anticuerpos se selecciona entre el grupo que consiste en anhídrido maleico de etileno, emulsiones de látex de un copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y metacrílico, copolímero acrílico de estireno, hidróxido de aluminio o similar, y una mezcla de los mismos.
- 20 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente inductor de una respuesta inmunitaria mediada por células se selecciona del grupo que consiste en una emulsión de aceite en agua, una composición de escualano con Tween® 80 y copolímeros de bloque de óxido de etileno y de óxido de propileno, una composición del análogo de treonilo del dipéptido muramílico con Tween® 80 y copolímeros de escualano y copolímeros de bloque de óxido de etileno y de óxido de propileno, una *Mycobacterium bovis* atenuada, el bacilo de Calmette-Guerin, citocinas relacionadas con Th1, interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18), interferón gamma, y una mezcla de los mismos.
- 25 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha bacterina inactivada está presente en una cantidad suficiente para proporcionar al menos  $1 \times 10^4$  de DICT<sub>50</sub> por dosis unitaria.
- 30 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el agente inductor de una respuesta de anticuerpos es una mezcla de anhídrido maleico de etileno y de un copolímero acrílico de estireno que está presente en la cantidad de aproximadamente 1% vol/vol de anhídrido maleico de etileno y aproximadamente 3% vol/vol de copolímero acrílico de estireno.
- 35 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha emulsión de aceite en agua se selecciona del grupo que consiste en una emulsión de aceite de parafina en agua, una emulsión que comprende escualano y un copolímero de bloque de óxido de etileno y de óxido de propileno, una emulsión que comprende escualano y un copolímero de bloque de óxido de etileno y de óxido de propileno con el análogo de treonilo del dipéptido muramílico, y una mezcla de los mismos.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que adicionalmente comprende una bacterina de *Borrelia burgdoferi*.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho agente de respuesta inmunitaria mediada por células es una emulsión de aceite en agua y está presente en un intervalo de aproximadamente el 3% al 7% vol/vol.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho agente de respuesta inmunitaria mediada por células es una emulsión de aceite en agua y está presente en una cantidad de aproximadamente el 5% vol/vol.
- 40 11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la prevención o mejora de erliquiosis canina en un perro.