

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 121**

51 Int. Cl.:
C07K 14/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08730629 .6**
96 Fecha de presentación: **25.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2134742**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas para el tratamiento y prevención de infecciones en animales**

30 Prioridad:
27.02.2007 US 903586 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC (100.0%)
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
GILL, MICHAEL, A.

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 389 121 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

Composiciones inmunogénicas para el tratamiento y prevención de infecciones en animales.

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a composiciones y a procedimientos que proporcionan tratamiento o protección
 10 contra infecciones virales y bacterianas en animales. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a
 composiciones de vacuna multivalentes para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en caninos
 producidas por, o asociadas con, una o más de virus del moquillo canino, adenovirus canino (de tipo 1 o de tipo 2),
 virus paragripal canino, parvovirus canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira*
grippotyphosa, *Leptospira pomona*, *Leptospira bratislava*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira autumnalis*, *Leptospira*
 15 *australis*, *Leptospira hebdomadis*, y *Bordetella bronchiseptica*. También pueden usarse composiciones de *Leptospira*
 para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en caninos, porcinos y bovinos.

Antecedentes

15 La leptospirosis es una enfermedad contagiosa que afecta tanto a animales como a seres humanos. La infección
 está producida por un patógeno bacteriano denominado *Leptospira*. Las bacterias del género *Leptospira* son
 espiroquetas, que pueden ser patógenas e incluyen diversas especies conocidas y un gran número de
 serovariedades. Las especies patógenas ejemplares incluyen *L. interrogans*, *L. inadai*, *L. borgpetersenii*, *L.*
santarosai, *L. kirschneri*, *L. weilii* o *L. noguchii*. Las serovariedades de *Leptospira* patógenas se producen de manera
 natural en una gran diversidad de animales de producción, animales de compañía, animales silvestres y seres
 humanos. El intervalo de hospedadores de las serovariedades de *Leptospira* es generalmente muy amplio, aunque
 20 dependiendo del hospedador infectado resultarán diferentes síntomas. Por ejemplo, la leptospirosis en perros puede
 dar como resultado enfermedades hepáticas y renales crónicas, y la muerte.

25 La evolución y la gravedad de la leptospirosis depende frecuentemente de la serovariedad responsable de la
 infección. Las serovariedades asociadas con infecciones hepáticas y con síntomas de decoloración de orina y/o
 coloración amarillenta (ictericia), enzimas hepáticas elevadas y síntomas gastrointestinales incluyen *L.*
icterohaemorrhagiae y *L. grippotyphosa*. La serovariedad *L. grippotyphosa* está también asociada con síntomas de
 fallo renal, al igual que la serovariedad *L. pomona*. Tan recientemente como en los años 80, se identificaron *L.*
icterohaemorrhagiae y *L. canicola* como las serovariedades más frecuentes causantes de leptospirosis en caninos.
 En los años 90, sin embargo, un aumento de frecuencia de *L. grippotyphosa* y *L. pomona* se observó junto con una
 30 reaparición de la enfermedad de leptospirosis lo que sugiere una tendencia cambiante en la epidemiología de esta
 enfermedad. Algunas serovariedades de leptospira patógenas adicionales comienzan a aparecer como
 médicamente relevantes tales como *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis*, y *L. hebdomadis*.

35 Las serovariedades de leptospira se clasifican basándose en los tipos de antígenos sobre su superficie (es decir,
 marcadores en la superficie celular que suscitan la producción de anticuerpos), pero estos antígenos de superficie
 celular proporcionan una escasa inmunidad cruzada entre las serovariedades. De esta manera, la vacunación contra
 determinadas serovariedades no consigue protección contra otras serovariedades. Además, las vacunas que
 combinan antígenos de diversas serovariedades o antígenos de otros organismos (por ejemplo, virus), pueden dar
 como resultado interferencia de antígenos, es decir, un fracaso de uno o más de los antígenos combinados para
 suscitar una respuesta inmunitaria debido al efecto "enmascarador" causado por otros antígenos en la composición.

40 Por lo tanto, existe una necesidad para el desarrollo de composiciones eficaces y procedimientos para tratar y
 prevenir las enfermedades o trastornos causados o asociados con la infección por *Leptospira*.

El documento WO 2006/038115 desvela vacunas caninas multivalentes contra *Leptospira bratislava* y otros
 patógenos.

Moore y col: "Emerging Infectious Diseases"; marzo de 2006; 12(3):501-3, se refiere a un estudio sobre "Canine
 leptospirosis, United States, 2002-2004".

45 Adin y col: "Journal of the American Veterinary Medical Association", volumen 216, nº 3, 1 de febrero de 2000,
 páginas 371-375, se refiere al "Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998)."

Un artículo publicado en internet firmado anónimamente encontrado en
http://www.wyethah.ca/article.asp?pageid=prlepto4_0505, se refiere a "Introduction of Leptovax 4 canine vaccine".

Sumario

50 La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un inmunógeno de la superficie
 celular de *Leptospira* o una preparación celular completa o parcial inactivada de *Leptospira bratislava*, *Leptospira*
autumnalis, *Leptospira australis* y *Leptospira hebdomadis*. En determinadas realizaciones las composiciones de la
 invención comprenden una o más proteínas capsulares de la membrana externa (OMC) derivadas de *Leptospira*
bratislava, *Leptospira autumnalis*, *Leptospira australis*, y/o *Leptospira hebdomadis*. La invención también
 55 proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un inmunógeno de superficie celular de *Leptospira* en
 una preparación celular completa o parcial inactivada de *Leptospira bratislava*, *Leptospira autumnalis*, *Leptospira*
australis y *Leptospira hebdomadis*, y adicionalmente comprende uno o más inmunógenos virales seleccionados del
 grupo que consiste en el virus del moquillo canino (CD), una cepa atenuada de adenovirus canino de tipo-2 (CAV-2),

una cepa atenuada del virus paragripal canino (CPI), una cepa atenuada del parvovirus canino (CPV), y una cepa inactivada del coronavirus canino (CCV). Las composiciones inmunogénicas de la presente invención, en determinadas realizaciones, también pueden comprender un inmunógeno de la superficie celular de *Leptospira* o una preparación celular completa o parcial inactivada derivada de una o más cepas de *Leptospira* seleccionadas del grupo que consiste en *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona* y *L. hardjo*. En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir al menos un inmunógeno de *Bordetella bronchiseptica* tal como, por ejemplo, la proteína de superficie de *Bordetella* p68.

Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas expuestas en el presente documento a continuación.

10 **Descripción detallada**

La presente divulgación proporciona una diversidad de composiciones inmunogénicas multivalentes para el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas o infecciones bacterianas y víricas. La presente divulgación, por lo tanto, se refiere en líneas generales al sorprendente descubrimiento de que una diferente combinación de inmunógenos de la superficie de la célula de *Leptospira* puede combinarse para crear una composición inmunogénica que no dé como resultado una interferencia antigénica. Es decir, cada inmunógeno individual de la composición es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria, particularmente una respuesta inmunoprotectora, viéndose esta actividad no afectada por la presencia de otros antígenos. Más específicamente, una realización de la composición inmunogénica comprende un inmunógeno de la superficie celular de *Leptospira* de *Leptospira bratislava*, *Leptospira autumnalis*, *Leptospira australis* y *Leptospira hebdomadis*. Además, estos inmunógenos de *Leptospira* son igual de inmunogénicos cuando se combinan con otros antígenos virales, incluyendo un antígeno del virus del moquillo canino (CD), un antígeno de adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), un antígeno del virus paragripal canino (CPI), un antígeno del parvovirus canino (CPV), un antígeno de coronavirus canino (CCV), y cualquier combinación de los mismos. Adicionalmente, también pueden añadirse un antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, tal como p68 (una proteína de superficie de *Bordetella*) a la composición inmunogénica. Estas composiciones inmunogénicas pueden usarse como una vacuna para tratar o mejorar o prevenir diversas infecciones causadas por *Leptospira* y diversas infecciones virales. A continuación se analizan con más detalle las composiciones inmunogénicas multivalentes adecuadas para su uso con la presente divulgación, así como usos terapéuticos o veterinarios representativos.

Antes de exponer la divulgación con más detalle, puede ser de ayuda para comprender la misma establecer definiciones de determinados términos a usar a continuación en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, debe entenderse que cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de proporción o intervalo de número entero incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo indicado y, cuando sea apropiado, fracciones de los mismos (tal como un décimo y una centésima de un número entero), a menos que se indique de otra manera. Como se usa en el presente documento, “aproximadamente” o “comprendiendo esencialmente” significa \pm el 15% del valor o intervalo indicado, a menos que se indique de otra manera. Debe entenderse que el uso de la alternativa (por ejemplo, “o”) se refiere a uno, dos o cualquier combinación de los mismos de las alternativas.

El término “inmunógeno” o “antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que reconoce el sistema inmunitario cuando se introduce en un sujeto y es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria generada es una respuesta inmunoprotectora. Los inmunógenos incluyen “antígenos de superficie” que se expresan naturalmente sobre la superficie de un microorganismo (por ejemplo, un patógeno), o la superficie de una célula infectada o la superficie de una célula tumoral.

Como se usa en el presente documento, la expresión “composición inmunogénica” significa dos o más inmunógenos (antígenos) que son capaces de inducir una respuesta inmunoprotectora en un sujeto a tratar, tal como un canino, porcino o bovino. Los efectos protectores de una composición inmunogénica contra uno o más patógenos normalmente se consiguen induciendo en el sujeto animal una respuesta inmunitaria, bien una respuesta inmunitaria mediada por células o una respuesta inmunitaria humoral o una combinación de ambas y preferentemente una respuesta inmunoprotectora.

La expresión “inmunógeno polipeptídico capsular de membrana externa” o “inmunógeno OMC” se refiere a una preparación de proteínas de membrana externa que está aislada o sustancialmente retirada de células de *Leptospira* intactas. Un procedimiento representativo para preparar inmunógenos OMC se proporciona, por ejemplo, en Yang y col., J. Am. Soc. Nephrol. 13:2037-2045 (2002).

La expresión “inmunoprotección” como se usa en el presente documento se refiere a una inmunidad adquirida contra un inmunógeno, cuando el sujeto se ha expuesto al inmunógeno, lo cual es una respuesta inmunitaria (bien activa/adquirida o pasiva/innata, o ambas) en el sujeto que conduce a la inactivación y/o reducción en cuanto a la cantidad de un patógeno y da como resultado una memoria inmunológica (por ejemplo, memoria de linfocitos T o B). La inmunidad protectora proporcionada por una vacuna puede ser en forma de inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) o inmunidad celular o ambas. Por ejemplo, la inmunidad protectora puede dar como resultado la reducción en la supresión viral o bacteriana, una disminución en cuanto a la frecuencia o duración de infecciones,

niveles de proteína en suero de fase aguda reducidos, temperaturas rectales reducidas o un aumento en la captación de alimento o crecimiento.

Como se usa en el presente documento, una “vacuna” es una composición que puede usarse para suscitar inmunoprotección en un receptor. Un sujeto que se ha vacunado con un inmunógeno desarrollará una respuesta inmunitaria que impide, retrasa o disminuye el desarrollo o gravedad de una enfermedad o trastorno en el sujeto expuesto al inmunógeno o un inmunógeno relacionado, en comparación con un sujeto no vacunado. La vacunación puede, por ejemplo, suscitar una respuesta inmunitaria que elimina o reduce el número de patógenos o células infectadas o puede producir cualquier otro alivio de una infección que puede medirse clínicamente.

Como se usa en el presente documento, “adyuvante” debe entenderse en su más amplio sentido e incluye cualquier compuesto inmunoestimulador. En determinadas realizaciones preferidas, el adyuvante es alumbre, un polímero soluble en agua de ácido acrílico reticulado con polialil sacarosa (por ejemplo, Carbopol®), bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) o cualquier combinación de los mismos. Cualquier adyuvante puede usarse junto con uno o más adyuvantes adicionales. Otros adyuvantes ejemplares incluyen emulsiones oleaginosas y adyuvantes basados en emulsionantes tales como emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, MF59 o SAF; geles minerales tales como hidróxido de aluminio (alumbre, por ejemplo, Al(OH)₃ reHydragel disponible de Reheis, Berkley Heights, NJ), sales de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio) o sales de calcio (por ejemplo, fosfato cálcico); adyuvantes derivados de microbios tal como la toxina del cólera (TC), toxina tosferínica, toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), toxinas mutantes (por ejemplo LTK63 o LTR72), bacilo de Calmette-Guerin (BCG), lipopolisacáridos (LPS), micobacterias, toxina tetánica, *Corynebacterium parvum*, motivos de CpG de ADN, muramil dipéptido, o monofosforil lípido A; adyuvantes de partículas tales como complejos inmunoestimuladores (ISCOM), liposomas, microesferas biodegradables o saponinas (por ejemplo, QS-21); citocinas tal como IFN- γ , IL-2, IL-12 o GM-CSF; adyuvantes sintéticos tales como copolímeros en bloque no iónicos o tensioactivos, análogos de muramil péptido (por ejemplo, *N*-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina [thr-MDP], *N*-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-[1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi]-etilamina), polifosfacenos, polinucleótidos sintéticos, ácido poliacrílico parcial esterificado con un peso molecular de 450.000 D (Carbopol 907 (PAA), Goodrich, Cleveland, Ohio, Estados Unidos; como se desvela en las Patentes de Estados Unidos N° 6.340.464 y 6.610.310) y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de hidrocarburos, o hemocianinas de lapa californiana (KLH). Los adyuvantes seleccionados incluyen CMC (carboxil metilcelulosa) y HPMC (hidroxipropil metilcelulosa).

Como se usa en el presente documento, los términos “serogrupo” y “serovariedad” se refieren a una clasificación de *Leptospira* que está basada en los datos de tipificación serológicos, en particular datos obtenidos usando ensayos de aglutinación, tal como ensayos de aglutinación microscópicos (MAT). Un MAT ejemplar se indica en el Ejemplo 1 del presente documento. Por ejemplo, “serogrupo” o “serovariedad” se refiere a un grupo de *Leptospira* cuyos miembros se aglutinan en cruzado con antígenos grupales compartidos, pero no se aglutinan en cruzado con miembros de otros grupos y, como consecuencia, los miembros de un serogrupo (serovariedad) tienen más o menos relaciones antigénicas estrechas con cualquier otro por simple aglutinación cruzada. Además, la *Leptospira* que pertenece a diferentes especies puede clasificarse en la misma serovariedad o serogrupo debido a que no pueden diferenciarse por determinación antigénica.

El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, pretende incluir fragmentos de los mismos que también son reactivos específicamente con una molécula que comprende, se asemeja a o reacciona en cruzado con un epítipo de linfocito B o linfocito T de una molécula de superficie o polipéptido de superficie u otra molécula producida por una serovariedad de *Leptospira*, *Bordetella bronchiseptica* o un virus. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden generarse tratando anticuerpos con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de una composición inmunogénica suficiente para suscitar una respuesta inmunoprotectora en el sujeto (por ejemplo, un perro o un cerdo o una vaca) al cual se administra. Como se observa en el presente documento, la respuesta inmunitaria puede dar como resultado una inducción de la inmunidad celular o humoral. La cantidad de una composición inmunogénica multivalente que es eficaz terapéuticamente puede variar dependiendo del antígeno particular usado en la composición, de la edad y del estado de sujeto que vaya a tratarse o del grado de infección, si lo hubiera.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

En un aspecto, la presente divulgación se refiere en líneas generales a composiciones que comprenden inmunógenos polipeptídicos capsulares de membrana externa (OMC) aislados derivados de *Leptospira* o preparaciones celulares completa o parcialmente inactivadas de *Leptospira*. Por consiguiente, una realización de la presente divulgación se refiere a una composición inmunogénica que comprende un inmunógeno de la superficie celular de *Leptospira* de *Leptospira bratislava*, *Leptospira autumnalis*, *Leptospira australis* y *Leptospira hebdomadis*. En otra realización, esta composición inmunogénica que tiene cuatro inmunógenos de superficie celular de *Leptospira*, comprende adicionalmente un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente un antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta

inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.

En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal de ganado o de compañía, tal como un cerdo, bovino, ovino, caprino, equino, ciervo, vicuña, canino o felino. En una realización preferida, la respuesta inmunitaria suscitada es una respuesta inmunoprotectora.

- 5 En otro aspecto de la presente divulgación, el componente inmunogénico de una composición eficaz puede adicionalmente comprender uno o más inmunógenos virales.

El inmunógeno viral puede ser un inmunógeno viral completo, atenuado que se ha sometido a pases o se ha tratado previamente para ser no infeccioso y predominantemente asintomático. Los inmunógenos que pueden emplearse en la generación de las composiciones, incluyendo las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento, pueden ser viriones vivos, atenuados (tales como CD, CAV-2, CPI y CPV) o destruidos (inactivados) (tales como CCV). Si son atenuados, entonces puede recomendarse someter a pases en serie el virus usando tecnología disponible para disminuir su virulencia, conservando al mismo tiempo su inmunogenicidad. Los viriones gripales completos o subunitarios pueden estar inactivados mediante medios convencionales tales como, por ejemplo, a través de inactivación química usando uno o más agentes de inactivación químicos incluyendo, pero sin limitación, uno o más de etilénimina binaria, beta-propiolactona, formalina, gluteraldehído y/o dodecil sulfato sódico. Los viriones también pueden inactivarse por calor o psoraleno en presencia de luz ultravioleta. Los procedimientos para atenuar cepas virulentas de estos virus y los procedimientos para fabricar una preparación viral inactivada se conocen en la técnica y se describen por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos N° 4.567.042 y 4.567.043. Los antígenos de estos patógenos para su uso en las composiciones de vacunas de la presente invención pueden estar en forma de una preparación viral viva modificada o una preparación viral inactivada.

En una realización, una composición inmunogénica de la presente divulgación incluye cepas atenuadas de un virus del moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus paragripal canino (CPI) y parvovirus canino (CPV); una preparación inactivada de coronavirus canino (CCV); y un inmunógeno de superficie celular de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadis*). En otra realización, esta composición inmunogénica comprende adicionalmente tres serovariedades de *Leptospira* (*L. canicola*, *L. grippotyphosa* y *L. icterohaemorrhagiae*). Aún en otra realización, esta composición inmunogénica que tiene cinco inmunógenos virales y siete inmunógenos de superficie celular de *Leptospira*, comprende adicionalmente un antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, las composiciones inmunogénicas son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas de un virus CD, CAV-2, virus CPI y CPV; y un inmunógeno de superficie celular de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadis*). En otra realización, esta composición inmunogénica comprende adicionalmente tres serovariedades de *Leptospira* adicionales (*L. canicola*, *L. grippotyphosa* y *L. icterohaemorrhagiae*). En otra realización más, esta composición inmunogénica que tiene cuatro inmunógenos virales y siete inmunógenos de superficie celular de *Leptospira*, comprende adicionalmente un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, las composiciones inmunogénicas son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.

En un aspecto adicional más de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas de un virus CD, CAV-2 y CPV; y un inmunógeno de superficie celular de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadis*). En otra realización, esta composición inmunogénica comprende adicionalmente tres serovariedades más de *Leptospira* (*L. canicola*, *L. grippotyphosa* y *L. icterohaemorrhagiae*). En otra realización más, esta composición inmunogénica que tiene tres inmunógenos virales y siete inmunógenos de superficie celular de *Leptospira*, comprende adicionalmente un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.

En un aspecto adicional aun de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye una cepa atenuada de un virus CPI; y un inmunógeno de superficie celular de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadis*). En otra realización, esta composición inmunogénica comprende adicionalmente tres serovariedades de *Leptospira* más (*L. canicola*, *L. grippotyphosa* y *L. icterohaemorrhagiae*). En otra realización más, esta composición inmunogénica que tiene un inmunógeno viral y siete inmunógenos de superficie celular de *Leptospira*, comprende adicionalmente un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, las composiciones inmunogénicas son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas

- de un virus CD, CAV-2, virus CPI y CPV; una preparación inactivada de CCV; y un inmunógeno de superficie celular de tres serovariedades de *Leptospira* (*L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadis*). En otra realización, esta composición inmunogénica comprende adicionalmente dos serovariedades adicionales de *Leptospira* (*L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*). En otra realización adicional, la composición inmunogénica que tiene cinco inmunógenos virales y cinco inmunógenos de superficie celular de *Leptospira* comprende adicionalmente un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.
- En realizaciones adicionales de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas de un virus CD, CAV-2, virus CPI y CPV; una preparación inactivada de CCV; y un inmunógeno de superficie celular de cinco serovariedades de *Leptospira* (*L. bratislava*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* y *L. pomona*). En otra realización, esta composición inmunogénica que tiene cinco inmunógenos virales y cinco inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* comprende adicionalmente un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un porcino o canino, tal como un cerdo o un perro, respectivamente, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.
- En otra realización adicional de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas de un virus CD, CAV-2, virus CPI y CPV; una preparación inactivada de CCV; y un inmunógeno de superficie celular de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* y *L. pomona*). En otra realización, esta composición inmunogénica que tiene cinco inmunógenos virales y cuatro inmunógenos de superficie celular de *Leptospira* comprende adicionalmente un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.
- En otro aspecto de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas de un virus CD, CAV-2, virus CPI, y CPV; una preparación inactivada de CCV; y un inmunógeno de superficie celular de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*L. bratislava*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* y *L. pomona*). En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, las composiciones inmunogénicas son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria en un porcino, tal como un cerdo, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.
- En otro aspecto adicional más de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas de un virus CD, CAV-2, virus CPI y CPV; una preparación inactivada de CCV; y un inmunógeno de superficie celular de cinco serovariedades de *Leptospira* (*L. canicola*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* y *L. pomona*). En determinadas realizaciones preferidas, los inmunógenos de la superficie celular de *Leptospira* son inmunógenos OMC. En otras realizaciones preferidas, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un bovino, tal como una vaca, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.
- En otras realizaciones de la presente divulgación, una composición inmunogénica incluye cepas atenuadas de un virus CD, CAV-2, virus CPI y CPV; una preparación inactivada de CCV; y un antígeno de *B. bronchiseptica*, preferentemente el antígeno p68. En otras realizaciones preferidas, la composición inmunogénica es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un canino, tal como un perro, y más preferentemente una respuesta inmunoprotectora.
- La presente divulgación también incluye cualquiera de las anteriores composiciones inmunogénicas, en las que un antígeno de *B. bronchiseptica* se excluye específicamente de las composiciones. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un inmunógeno viral de una cepa atenuada del virus del moquillo canino (CD), una cepa atenuada del adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), una cepa atenuada del virus paragripal canino (CPI), una cepa atenuada de parvovirus canino (CPV), una preparación celular inactivada o parcial de una cepa de coronavirus canino (CCV) y un antígeno de *L. bratislava* (por ejemplo, una proteína capsular de membrana externa (OMC) de *L. bratislava*), en la que la composición no incluye un antígeno de *B. bronchiseptica*.

También se proporcionan composiciones inmunogénicas ejemplares en la Tabla 1:

Tabla 1 Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
virus CD [†]		X					X	X	X	X							X
CAV-2 [‡]			X				X				X	X	X				X
CPV [‡]				X				X			X			X	X		X
virus CPI [‡]					X				X			X		X		X	
CCV [‡]						X				X			X		X		
<i>L. bratislava</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. australis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. hebdomadis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. canicola</i> [*]																	
<i>L. grippotyphosa</i> [*]																	
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]																	
<i>L. pomona</i> [*]																	
<i>L. hardjo</i> [*]																	
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]																	
cepas atenuadas																	

[‡]virus inactivado

^{*}inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[¶]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
virus CD [†]	X	X	X	X	X			X	X		X	X		X			
CAV-2 [†]	X	X				X	X	X		X	X	X			X		
CPV [†]			X	X		X	X	X	X	X		X				X	
virus CPI [†]	X		X		X	X		X	X	X	X	X					X
CCV [‡]		X		X	X		X		X	X	X	X					
<i>L. bratislava</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. australis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. hebdomadis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. canicola</i> [*]																	
<i>L. grippotyphosa</i> [*]																	
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]																	
<i>L. pomona</i> [*]																	
<i>L. hardjo</i> [*]																	
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]													X	X	X	X	X
† cepas atenuadas																	

[‡]virus inactivado

^{*}inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[¶]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
virus CD [†]		X	X	X								X	X	X	X	X	X
CAV-2 [†]		X				X	X					X	X	X			
CPV [†]			X			X			X	X		X			X	X	
virus CPI [†]				X			X		X		X		X		X		X
CCV [‡]	X				X			X		X	X			X		X	X
<i>L. bratislava</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. australis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. hebdomadis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. canicola</i> [*]																	
<i>L. grippotyphosa</i> [*]																	
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]																	
<i>L. pomona</i> [*]																	
<i>L. hardjo</i> [*]																	
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
† cepas atenuadas																	

[‡]virus inactivado

^{*}inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[¶]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
virus CD [†]			X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CAV-2 [†]		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CPV [†]	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
virus CPI [†]	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CCV [‡]		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
<i>L. bratislava</i> [*]	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. australis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. hebdomadis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. canicola</i> [*]								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. grippotyphosa</i> [*]								X	X		X	X				X	X
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]								X			X						X
<i>L. pomona</i> [*]																	
<i>L. hardjo</i> [*]																	
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]	X	X	X	X	X	X	X				X						
cepas atenuadas						X	X										

[†]virus inactivado

^{*}inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[¶]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	60	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
virus CD [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CAV-2 [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CPV [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
virus CPI [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CCV [†]																	
<i>L. bratislava</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. australis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. hebdomadis</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. canicola</i> [*]		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. grippotyphosa</i> [*]			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]				X				X				X				X	
<i>L. pomona</i> [*]																	
<i>L. hardjo</i> [*]																	
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
† cepas atenuadas									X	X	X	X	X	X	X	X	X

† virus inactivado

* inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

¶ antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invencción

	Combinación																
	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
virus CD†				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CAV-2†				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CPV†				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
virus CPI†	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CCV‡				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. bratislava</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. australis</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. hebdomadis</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. canicola</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. grippotyphosa</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. pomona</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. hardjo</i> *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>B. bronchiseptica</i> †	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

† cepas atenuadas

‡ virus inactivado

* inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

† antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																		
	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119		
virus CD [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
CAV-2 [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
CPV [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
virus CPI [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
CCV [‡]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>L. bratislava</i> *			X	X				X											
<i>L. autumnalis</i> *										X									
<i>L. australis</i> *											X								
<i>L. hebdomadis</i> *												X							
<i>L. canicola</i> *	X	X			X	X							X						
<i>L. grippotyphosa</i> *	X	X	X	X	X	X		X						X					
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> *	X	X	X	X	X	X									X				
<i>L. pomona</i> *	X	X	X	X	X	X												X	
<i>L. hardjo</i> *					X	X													
<i>B. bronchiseptica</i> [†]		X		X		X	X	X											

[†] cepas atenuadas

[‡] virus inactivado

*inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[†]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
virus CD [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X
CAV-2 [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X				X
CPV [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X			
virus CPI [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X		
CCV [‡]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X	
<i>L. bratislava</i> *			X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> *			X														
<i>L. australis</i> *				X													
<i>L. hebdomadis</i> *					X												
<i>L. canicola</i> *						X											
<i>L. grippotyphosa</i> *							X										
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> *								X									
<i>L. pomona</i> *									X								
<i>L. hardjo</i> *										X							
<i>B. bronchiseptica</i> [†]	X	X															X

[†] cepas atenuadas

[‡] virus inactivado

*inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[†]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
virus CD [†]	X	X	X								X	X	X	X	X		
CAV-2 [†]				X	X	X	X				X	X	X			X	X
CPV [†]	X				X			X	X		X			X	X	X	X
virus CPI [†]		X				X		X		X		X		X		X	
CCV [‡]			X				X		X	X			X		X		X
<i>L. bratislava</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> [*]																	
<i>L. australis</i> [*]																	
<i>L. hebdomadis</i> [*]																	
<i>L. canicola</i> [*]																	
<i>L. grippotyphosa</i> [*]																	
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]																	
<i>L. pomona</i> [*]																	
<i>L. hardjo</i> [*]																	
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]																	
cepas atenuadas																	

[†]virus inactivado

^{*}inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[¶]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación																
	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
virus CD [†]			X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X
CAV-2 [†]	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
CPV [†]		X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X
virus CPI [†]	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CCV [‡]	X	X				X	X	X		X		X	X	X	X	X	X
<i>L. bratislava</i> [*]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. autumnalis</i> [*]																X	X
<i>L. australis</i> [*]																X	X
<i>L. hebdomadis</i> [*]																	
<i>L. canicola</i> [*]																	
<i>L. grippotyphosa</i> [*]																	
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]																	
<i>L. pomona</i> [*]																	
<i>L. hardjo</i> [*]																	
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]																	
cepas atenuadas																	

[†]virus inactivado

^{*}inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

[¶]antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Tabla 1 (continuación): Composiciones Inmunogénicas Ejemplares de la Invención

	Combinación													
	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182		
virus CD [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
CAV-2 [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
CPV [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
virus CPI [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
CCV [‡]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
<i>L. bratislava</i> [*]														
<i>L. autumnalis</i> [*]	X	X	X	X	X	X								
<i>L. australis</i> [*]							X	X	X	X	X	X		
<i>L. hebdomadis</i> [*]							X							
<i>L. canicola</i> [*]	X							X						
<i>L. grippotyphosa</i> [*]		X							X					
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> [*]			X							X				
<i>L. pomona</i> [*]				X							X			
<i>L. hardjo</i> [*]					X									
<i>B. bronchiseptica</i> [¶]						X							X	
† cepas atenuadas														

‡ virus inactivado

* inmunógeno de superficie celular de serovariedad de *Leptospira*

¶ antígeno de *B. bronchiseptica* (por ejemplo, antígeno p68)

Las combinaciones ejemplares expuestas en la Tabla 1 anterior pretenden ser no limitantes. Por ejemplo, se pretende que la Combinación 1 expuesta en la Tabla 1 incluya composiciones inmunogénicas que contienen antígenos de *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadís*, así como otros componentes inmunogénicos no explícitamente enumerados en la tabla. Además, la Combinación 1 también pretende indicar una composición inmunogénica que contiene antígenos de *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadís* y específicamente no incluye ninguno de uno o más de los componentes inmunogénicos indicados en la Tabla 1 que no están marcados con una 'x' en la Combinación 1.

A la vista de las enseñanzas expuestas en el presente documento, pueden realizarse combinaciones adicionales fácilmente y someterse a ensayo por expertos habituales en la materia.

Cualquiera de las realizaciones de composición inmunogénica descritas en la presente divulgación puede tener adicionalmente uno o más transportadores o diluyentes farmacéutica o veterinariamente aceptables. En otras realizaciones, las composiciones inmunogénicas pueden comprender adicionalmente un adyuvante o al menos un conservante o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, las composiciones inmunogénicas de acuerdo con estas realizaciones son una preparación de vacuna. En determinadas realizaciones, las composiciones incluyen una respuesta inmune humoral contra una o más serovariedades de *Leptospira*, uno o más inmunógenos virales de un antígeno de *B. bronchiseptica* cuando se administra a un ser humano o a un sujeto animal, preferentemente a un canino, porcino o bovino.

En otra combinación preferida más la vacuna incluye una cepa atenuada del virus CD, una cepa atenuada del CAV-2, una cepa atenuada del virus CPI, una cepa atenuada de CPV y un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* recombinante.

FORMULACIONES Y USOS

Como se expone en el presente documento, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica adecuada para la administración a un sujeto, tal como a un canino, porcino o bovino, para suscitar una respuesta inmunitaria. La composición inmunogénica de la presente divulgación puede incluir adicionalmente un antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, tal como p68 o p68 recombinante, cuya composición puede inducir una respuesta inmunitaria por ejemplo en, un canino, porcino u ovino. Otra realización de la presente divulgación incluye una composición que comprende dos o más antígenos de patógenos caninos capaces de inducir una respuesta inmunitaria en perros contra enfermedades producidas por tal patógeno (o patógenos).

Las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se contemplan adicionalmente para demostrar un excelente actividad terapéutica, por ejemplo, en la prevención de infección por uno o más patógenos de *Leptospira*, uno o más patógenos virales o *Bordetella bronchiseptica*. Preferentemente, la composición inmunogénica multivalente es eficaz mediando una respuesta inmunoprotectora cuando se administra a un animal, tal como un ser humano o ganado o un animal de compañía tal como un porcino, bovino, ovino, caprino, equino, ciervo, vicuña, canino, felino o similar.

La composición puede administrarse de una manera conveniente tal como por las vías oral, intravenosa (soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o por supositorio o por implante (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta). Dependiendo de la vía de administración, puede ser necesario que los inmunógenos contenidos en su interior se revistan con un material para protegerlos de la acción de las enzimas, ácidos u otras condiciones naturales que de otra manera podrían inactivar los inmunógenos. Para administrar la composición mediante administración que no sea parenteral, esta se revestirá, o se administrará, con un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el inmunógeno puede administrarse con un adyuvante, coadministrarse con inhibidores enzimáticos, o en liposomas.

La composición de la presente invención también puede administrarse por vía parenteral o por vía intraperitoneal. También pueden prepararse dispersiones del componente inmunogénico en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos, tal como gentamicina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo y/o diluyente farmacéutica o veterinariamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios, tales como antimicrobianos.

El transportador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, usando un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en caso de dispersión o usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede efectuarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables

puede llevarse a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las composiciones inmunogénicas multivalentes de la presente divulgación en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversos de otros ingredientes indicados en el presente documento, según se requiera, seguido de termoesterilización, irradiación u otro medio de esterilización adecuado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico y los otros principios requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la técnica de liofilización, que produce un polvo del principio activo más cualquier principio activo adicional deseado a partir de la solución previamente esterilizada por filtración de la misma.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y conseguir uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente separadas diseñadas como dosificaciones unitarias para el sujeto mamífero a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador requerido farmacéutica o veterinariamente aceptable.

La presente divulgación también proporciona procedimientos de protección de un sujeto, tal como un canino, porcino o bovino, contra infecciones bacterianas o virales administrando una composición inmunogénica multivalente como se describe en el presente documento.

En una realización adicional, la divulgación proporciona una composición inmunogénica, como se describe en el presente documento, que adicionalmente contiene un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*, que es adecuado para administración a, por ejemplo, perros, y que es capaz de proteger a perros contra enfermedades producidas por *Bordetella bronchiseptica*, por ejemplo, infecciones de traqueobronquitis ("tos de las perreras").

De acuerdo con la presente invención, los antígenos p68 adecuados para su uso en la presente invención incluyen tanto proteínas p68 naturales (es decir proteínas p68 de origen natural purificadas de *Bordetella bronchiseptica*) como proteínas p68 producidas de manera recombinante. La purificación de p68 natural de *Bordetella bronchiseptica* se conoce en la técnica (véase, por ejemplo Montaraz y col., Infect. Immun. 47: 744-751, 1985, y la Patente de Estados Unidos Publicada N° 2004/0185062). La producción de p68 recombinante puede conseguirse usando cualquiera de una de las técnicas de expresión molecular de clonación y recombinante conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica p68 puede introducirse en una célula huésped apropiada tal como una bacteria, una célula de levadura (por ejemplo, una célula de *Pichia*), una célula de insecto o una célula de mamífero (por ejemplo, una célula CHO).

Preferentemente, las composiciones inmunogénicas se formulan para administrarse por inyección a un volumen de dosificación unitario de aproximadamente 0,1 a 5 ml, preferentemente a un volumen de dosificación unitario de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5 ml, o incluso más preferentemente a un volumen de dosificación unitario de aproximadamente 1 ml. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención deben prepararse de manera estéril por procedimientos bien conocidos.

La cantidad de antígeno de *B. bronchiseptica* en las composiciones inmunogénicas debe ser eficaz provocando una respuesta inmunitaria y se proporciona generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1000 µg por dosis. Preferentemente, la cantidad de antígeno p68 se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 260 µg por dosis. Más preferentemente, la cantidad de antígeno p68 se encuentra en el intervalo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg por dosis. Incluso más preferentemente, la cantidad de antígeno p68 se encuentra aproximadamente de 15 a aproximadamente 25 µg por dosis.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los inmunógenos de la divulgación pueden prepararse mediante procedimientos de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de una manera convencional usando uno o más transportadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que faciliten la formulación de los derivados lipopeptídicos antimicrobianos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las composiciones inmunogénicas multivalentes pueden combinarse con uno o más agentes biológicamente activos y pueden formularse con un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para generar composiciones farmacéuticas o veterinarias de la presente divulgación.

Los transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica y se describen en el presente documento y por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro, ed., 18ª Edición, 1990) y en CRC Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients, CRC Press LLC (S.C. Smolinski, ed., 1992). En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas pueden formularse con un transportador, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable tal como agua o una solución de manitol (por ejemplo, aproximadamente del 1% a

aproximadamente el 20%), hidrófoba (por ejemplo, aceite o lípido), o una combinación de los mismos (por ejemplo, emulsiones de aceite y agua). En determinadas realizaciones, cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento tienen un conservante o estabilizante (por ejemplo, un antibiótico) o son estériles.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden formularse para permitir que los inmunógenos contenidos en su interior sean biodisponibles tras la administración de la composición en un sujeto. El nivel de inmunógeno en suero y otros tejidos después de la administración puede controlarse mediante diversas técnicas bien establecidas, tales como cromatografía o ensayos basados en anticuerpos (por ejemplo, ELISA). En otras realizaciones, las composiciones inmunogénicas se formulan para administración parenteral a un sujeto que lo necesite (por ejemplo, que tiene una infección bacteriana Gram positiva), tal como un animal o un ser humano. Las vías de administración preferidas incluyen las administraciones subcutánea e intramuscular.

10 La formulación correcta depende de la vía de administración seleccionada, como se sabe en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones sistémicas son una realización que incluye aquellas diseñadas para la administración por inyección, por ejemplo inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas diseñadas para administración transdérmica, transmucosa, oral, intranasal o pulmonar. En una realización, la formulación sistémica es estéril. En realizaciones para inyección, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en soluciones fisiológicamente compatibles o tampones tal como solución de Hank, solución de Ringer, soluciones de manitol o tampón de solución salina fisiológica. En determinadas realizaciones, cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden contener agentes formuladores, tales como agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. Como alternativa, las composiciones inmunogénicas pueden estar en forma sólida (por ejemplo, polvo) para la construcción con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua apirogna estéril) antes del uso. En realizaciones para la administración transmucosa, en la formulación pueden usarse penetrantes, solubilizantes o emolientes apropiados para atravesar la barrera. Por ejemplo, puede usarse 1-dodecilhexahidro-2H-azepin-2-ona (Azone®), ácido oleico, propilenglicol, mentol, dietilenglicol etoxiglicol monoetil éter (Transcutol®), monolaurato de polisorbato de polietilensorbitán (Tween®-20) y el fármaco 7-cloro-1-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-2-ona (Diazepam), miristato de isopropilo y otros de estos penetrantes, solubilizantes o emolientes generalmente conocidos en la técnica en cualquiera de las composiciones de la presente divulgación. La administración puede conseguirse usando una combinación de vías, por ejemplo, administrando primero usando una vía parenteral y posteriormente una administración usando una vía mucosa.

20 En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de protección de un sujeto contra infecciones bacterianas o virales, como se describe en el presente documento. De acuerdo con la presente divulgación, la composición inmunogénica proporciona inmunidad a perros a largo plazo durante al menos aproximadamente 4 meses, preferentemente durante al menos aproximadamente 6 meses o incluso más preferentemente durante aproximadamente un año.

25 La composición inmunogénica de la presente invención puede administrarse a perros que son menores de 6 semanas de edad, preferentemente al menos 7 semanas de edad y más preferentemente al menos de 8 o 9 semanas de edad. Los perros pueden vacunarse con una dosis o con más de una dosis de una composición inmunogénica. Preferentemente, se administran dos dosis de una composición inmunogénica a perros con un intervalo de aproximadamente 2-4 semanas, preferentemente aproximadamente 3 semanas, entre las dos administraciones. Si los perros se vacunan antes de la edad de 4 meses, se recomienda que se vuelvan a vacunar con una sola dosis después de alcanzar 4 meses de edad, porque los anticuerpos maternos pueden interferir con el desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada en cachorros menores de 4 meses de edad. Los perros también pueden volver a vacunarse anualmente con una sola dosis. Cuando la exposición a *B. bronchiseptica* es probable, tal como en situaciones de cría, residencia y demostración, puede proporcionarse un refuerzo adicional al año o preferentemente a los 6 meses de la aparición de estos sucesos.

30 De acuerdo con la presente divulgación, las composiciones inmunogénicas generalmente incluyen un transportador aceptable desde el punto de vista veterinario. Como se describe en el presente documento, un transportador aceptable desde el punto de vista veterinario incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen entre otros albúmina.

35 Preferentemente, las composiciones inmunogénicas se formulan de tal manera que puedan administrarse a un sujeto, tal como a un perro, por inyección en una dosis de aproximadamente 0,1 a 5 ml, o preferentemente de aproximadamente 0,5 a 2,5 ml, o incluso más preferentemente, en una dosis de aproximadamente 1 ml.

40 Las composiciones inmunogénicas pueden prepararse rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación realizada por otros procedimientos tales como secado por pulverización o deshidratación) y preparaciones virales con una preparación líquida, cuya preparación líquida está compuesta por antígenos leptospirales, disueltos en solución salina estéril y complementada con adyuvante. Tales composiciones

inmunogénicas también pueden prepararse rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas y la preparación viral de *Leptospira* (o una preparación realizada por otros procedimientos tales como secado por pulverización o deshidratación) con una solución estéril o rehidratando la preparación liofilizada con CCV más diluyente.

5 De acuerdo con la presente invención, las composiciones inmunogénicas pueden administrarse a un perro de al menos 6 semanas de edad, preferentemente al menos 7 semanas de edad y más preferentemente de al menos de 8 o 9 semanas de edad. Las vacunas de combinación pueden administrarse en 2 a 4 dosis, preferentemente en 2 a 3 dosis. Las dosis pueden administrarse con 2 a 6 semanas entre cada dosis, preferentemente con 2 a 4 semanas entre cada dosis.

10 Los virus CD atenuados deben estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ (efecto citopático de dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%) por dosis, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10^4 a 10^6 TCID₅₀ por dosis. El CAV-2 atenuado debe estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 TCID₅₀ a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ por dosis, preferentemente en el intervalo de 10^4 a aproximadamente 10^6 TCID₅₀ por dosis. El virus CPI atenuado debe estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 TCID₅₀ a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ por dosis, y preferentemente en el intervalo de 10^6 a 10^8 TCID₅₀ por dosis. El CPV atenuado debe estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 TCID₅₀ a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ por dosis, preferentemente, en una cantidad en el intervalo de 10^7 a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ por dosis. La cantidad de CCV en una preparación viral inactivada debe ser al menos de aproximadamente 100 unidades relativas por dosis y preferentemente en el intervalo de 1000-4500 unidades relativas por dosis. Cada especie de *Leptospira* en la vacuna debe estar en el intervalo de aproximadamente 100-3500 UN (unidades nefelométricas) por dosis de vacuna, y preferentemente en el intervalo de 200-2000 UN por dosis. En determinadas realizaciones, las unidades de dosificación comprenden al menos aproximadamente 1×10^6 TCID₅₀ o al menos aproximadamente 1×10^7 TCID₅₀ o al menos aproximadamente 5×10^7 TCID₅₀ de virión subunitario o completo destruido o inactivado o parte del mismo. En determinados aspectos de estas realizaciones las unidades de dosificación pueden comprender como mucho 1×10^9 TCID₅₀ o más de virión subunitario o completo destruido o inactivado o parte del mismo. Por lo tanto, un intervalo adecuado de virión subunitario o completo destruido o inactivado o parte del mismo se encuentra entre aproximadamente 1×10^4 TCID₅₀ y aproximadamente 1×10^9 TCID₅₀.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit de partes farmacéutico que comprende una composición inmunogénica como se define en el presente documento. El kit también puede comprender adicionalmente instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad canina, porcina o bovina (tal como leptospirosis, como se describe en el presente documento). Los agentes activos de la composición inmunogénica pueden envasarse conjuntamente en forma de dosificación unitaria.

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar diversos aspectos de la presente divulgación.

Ejemplos

35 Ejemplo 1

INMUNOGENICIDAD/EFICACIA DE *LEPTOSPIRA BRATISLAVA* EN UNA VACUNA DE COMBINACIÓN

INTRODUCCIÓN

Este ejemplo ilustra la inmunogenicidad de *L. bratislava* y carece de antígeno de bloqueo cuando *L. bratislava* se añade a una vacuna de combinación.

40 DA₂PP/CvK/LCIGP es la designación proporcionada a un producto de vacuna de combinación que contiene el virus del moquillo canino atenuado (virus CD), el adenovirus canino de tipo 2 atenuado (CAV-2), coronavirus canino inactivado (CCV), el virus paragripal canino atenuado (virus CPI) y parvovirus canino atenuado (CPV). La proteína capsular de membrana externa (OMC) de *L. bratislava* se añade a DA₂PP/CvK/LCIGP para producir un nuevo producto de combinación denominado DA₂PP/CvK/LCIGPB.

45 Como se muestra en este ejemplo, la proteína OMC de *L. bratislava*, cuando se mezcla con DA₂PP/CvK/LCIGP, fue eficaz induciendo inmunidad protectora en cachorros contra una exposición virulenta a *L. bratislava*.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

SELECCIÓN DE ANIMALES

ANIMALES DE ENSAYO

50 Se utilizaron un total de 34 beagles (22 vacunados y 12 controles), de seis semanas a seis semanas y 6 días de edad, en este estudio. Todos los cachorros se compraron en Harlan Sprague Dawley (Indianápolis, IN) y se sometieron a ensayo negativo para las fracciones en la vacuna de combinación. Basándose en el intervalo de edad, los 34 cachorros se dividieron en dos lotes para vacunación. Los cachorros de cada lote se aleatorizaron en grupos de vacunados y control usando el generador de números aleatorios de Microsoft Excel. Todos los vacunados se

vacunaron dos veces con un intervalo de 21 días. Para garantizar que todos los cachorros estaban expuestos simultáneamente, los cachorros del primer lote se expusieron a 28 días de vacunación post-secundaria (DPV2) mientras que el segundo lote de cachorros se expuso a DPV2 21.

ALOJAMIENTO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES

- 5 Los animales se alojaron en jaulas hasta la finalización del estudio. El espacio de las jaulas cumplía la regulación aplicable del bienestar animal.

VACUNA DE ENSAYO

COMPOSICIÓN DE LA VACUNA

- 10 Se añadió la proteína OMC de *L. bratislava* al producto de combinación denominado CvK/LCIGP (que contenía coronavirus canino (inactivado), *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippityphosa* y *Leptospira Pomona*) para producir un nuevo producto de combinación denominado CvK/LCIGPB. La torta, DA2PP que contenía virus de moquillo canino, adenovirus canino de tipo 2, virus paragripal canino y parvovirus canino se combinó con CvK/LCIGPB para producir un nuevo producto envasado de combinación denominado DA2PP/CvK/LCIGPB. La concentración de proteína OMC de *L. bratislava* en el producto de combinación final fue de
15 50 µg/1 ml de dosis.

ALMACENAMIENTO

Las vacunas se almacenaron entre 2 °C y 7 °C.

DISEÑO EXPERIMENTAL

- 20 Los cachorros de cada camada se aleatorizaron, de acuerdo con la camada en dos grupos como se muestra en la Tabla 2 a continuación usando el generador numérico al azar Microsoft Excel, y después se clasificaron en orden ascendente.

TABLA 2: Diseño Experimental

Grupo	Vacuna	Vía de Exposición con <i>L. bratislava</i>	Número de Animales
Principal	DA ₂ PP/CvK/LCIGPB	Intraperitoneal	22
Controles	Ninguno	Intraperitoneal	12

VACUNACIÓN

- 25 A cada animal en el grupo principal se le proporcionaron dos dosis (1 ml/dosis) de la vacuna asignada subcutáneamente en lados opuestos del cuello con una diferencia de tres semanas.

Las vacunas codificadas y las muestras se usaron para garantizar el estudio con ocultación.

EXPOSICIÓN EXPERIMENTAL

- 30 La cepa de exposición de *L. bratislava* fue la cepa B26 P2 (proporcionada por el Center Veterinary Biologics Laboratory, Ames, IA). Para obtener una cantidad suficiente y una buena disponibilidad, los organismos de exposición se cultivaron en medio T-80 (Sulzer y Jones, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Publ. No. (CDC) 76-8275, páginas 12-15, Center for Disease Control, Atlanta, GA) a 28 (±2) °C. Inmediatamente antes de la exposición, se contaron los organismos móviles y el número de organismos ajustados a 1 x 10¹⁰ organismos por
35 dosis para exposición. Los cachorros en los grupos principales y de control se expusieron mediante vía intraperitoneal (IP), con *L. bratislava* virulenta. El volumen de material de exposición se ajustó a una dosis de exposición de 2,0 ml.

OBSERVACIONES Y RECOGIDA DE LA MUESTRA

OBSERVACIÓN PREVIA A LA EXPOSICIÓN

- 40 Las temperaturas rectales y síntomas clínicos se controlaron y se registraron durante tres días consecutivos antes de la exposición para garantizar el buen estado.

OBSERVACION DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN

Después de la exposición, las temperaturas rectales de los animales se controlaron diariamente y se observaron para cualquier posible síntoma clínico asociado con infección por *L. bratislava* durante dos semanas y se registraron

los resultados.

Los cachorros se sacrificaron cuando terminó el estudio y el hígado y los riñones se examinaron para detectar graves lesiones asociadas con infección por *L. bratislava*.

PERFIL HEMATOLÓGICO

- 5 Después de la exposición, se recogieron muestras de sangre anti coagulada (2 ml) diariamente de cada cachorro controlando el recuento leucocitario total hasta 15 DPC, excepto 13 y 14 DPC cuando el Cell-Dyne (contador de sangre) no estaba disponible.

Los trombocitos y leucocitos diferenciales se contaron usando el contador de sangre Cell-Dyne de Abbott o un contador de células automático.

10 AISLAMIENTO DE *L. BRATISLAVA* DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Se usaron muestras de sangre para inocular medio de cultivo de *Leptospira* semisólido T-80. Los tubos inoculados se incubaron a 28(±2) °C durante un periodo de cuatro semanas. Todos los cultivos negativos se subcultivaron en medio reciente y se incubaron durante un periodo adicional de dos semanas más antes de descartarlo como negativo. Todos los cultivos se examinaron semanalmente usando un microscopio de campo oscuro para detectar la presencia de Leptospiras y se registraron los resultados.

- 15

ENSAYOS DE MICROAGLUTINACIÓN (MAT)

Los anticuerpos aglutinantes en suero contra el antígeno celular completo de *Leptospira* se midieron usando el ensayo de microaglutinación. En resumen, se prepararon diluciones de sueros en serie en número de dos en placas de microtitulación de fondo plano. A cada suero diluido, se añadió un volumen igual (0,05 ml) de suspensión de *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippotophysa*, *L. bratislava* o *L. pomona* viva (equivalente a un lector de nefelómetro de 20). Se incluyeron controles adecuados en cada placa. Las placas se agitaron durante 30 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas antes de registrar los resultados. La titulación de cada suero se definió como la dilución recíproca más alta de suero que produjo al menos una aglutinación del 50 por ciento.

- 20

25 ANÁLISIS DE LOS DATOS

La unidad experimental fue el animal individual. Los resultados primarios fueron espiroquetemia y titulaciones de anticuerpos. Se calcularon los porcentajes de espiroquetemia y titulaciones de anticuerpos para los animales en cada grupo se calcularon.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

30 NIVEL ANTIGÉNICO DE *L. BRATISLAVA*

Cincuenta microgramos (50 µg) por dosis de proteína capsular de membrana externa (OMC) de *L. bratislava* se cargó en la vacuna de inmunogenicidad.

RESPUESTAS SEROLÓGICAS

- 35 Las titulaciones de anticuerpos de cachorros individuales se registraron y se analizaron. En 0DPV1, todos los cachorros fueron negativos con titulaciones de anticuerpos menores de 2. Con la excepción de un cachorro vacunado, el resto de los vacunados fueron seropositivos a *L. bratislava* por 0DPV2 con una titulación media geométrica (GMT) de 17. Al igual que otras serovariedades de *Leptospira*, la GMT aumentó a 741 a 7DPV2, la titulación máxima después de dos vacunaciones, y después gradualmente disminuyó a 405 y 222 a 14 y 21 DPV2, respectivamente. Las titulaciones de anticuerpo aumentaron sustancialmente a 7 DPC en ambos grupos de control y vacunados. Estos resultados indican un fuerte efecto de refuerzo en los vacunados y una respuesta inmunitaria de los controles. Los 12 controles permanecieron negativos hasta 21 DPV2, el día de la exposición. Estos datos muestran que la fracción de *L. bratislava* en el producto de combinación, DA₂PP/CvK/LCIGPB es altamente inmunogénico induciendo respuestas inmunológicas serológicas *in vivo*.

- 40

OBSERVACIONES CLÍNICAS

- 45 En todos los cachorros se valoraron las temperaturas rectales, síntomas clínicos, recuentos de leucocitos y recuentos plaquetarios. Un cachorro tuvo un día secreción ocular. Otro cachorro tuvo un día depresión/letargo. Otros dos cachorros tuvieron un día diarrea, y un cachorro tuvo un día conjuntivitis. Los otros cachorros permanecieron clínicamente normales después de la exposición virulenta. Ninguno de los cachorros tuvo temperaturas rectales, recuentos leucocitarios o recuentos plaquetarios elevados o disminuidos durante el estudio. Al igual que otras leptospiras caninas, tal como la *Leptospira canicola*, *pomona* y *L. icterohaemorrhagiae*, canina etc., *L. bratislava* en solitario produce una enfermedad clínica mínima en perros sin patógenos específicos demostrado por espiroquetemia. Sin embargo, cuando esta se complica con otros patógenos, estrés, condiciones

- 50

inmunocomprometidas y/o poco entorno de campo, es probable que cause impactos más significativos o incluso letales sobre la salud canina como es el caso con las serovariedades de leptospirosis caninas más reconocidas. No hubo lesiones graves observadas en el riñón e hígado después de la conclusión del estudio.

AISLAMIENTO DE *L. BRATISLAVA*

5 La espiroquetemia después de la exposición a *L. bratislava* virulenta se midió mediante cultivo de sangre completa en medio T80. Salvo un cachorro, todos los cachorros control (11 de 12 cachorros o el 92% de los cachorros de control) fueron positivos para *L. bratislava*. Por otro lado, solo un cachorro en el grupo vacunado fue positivo con espiroquetemia. En otras palabras, aproximadamente el 95% (21 de 22 cachorros) de los vacunados permanecieron sin espiroquetemia después de exposición virulenta de *L. bratislava*. Estos datos demuestran que la vacuna es inmunológicamente potente induciendo inmunidad protectora y protegiendo los cachorros de la replicación de *L. bratislava* virulenta después de la exposición. Los resultados demuestran claramente que el antígeno de membrana externa de *L. bratislava* es eficaz cuando se mezcla con otras fracciones.

CONCLUSIONES

15 Recientes publicaciones demuestran una frecuencia aumentada de resultados de ensayo positivos a anticuerpos entre los perros estudiados con respecto a exposición de *L. bratislava*. Estudios de casos posteriores apoyan una asociación entre *L. bratislava* y enfermedades renales y hepáticas en perros en el campo. Para la mayoría de las serovariedades leptospirales tradicionalmente asociadas con enfermedad renal y hepática, la clave para la protección ha sido la prevención de espiroquetemia. El presente estudio demuestra que puede esperarse que la vacunación de *L. bratislava* dé como resultado similares beneficios a la salud canina.

20 Los resultados del presente estudio demuestran que la proteína de membrana externa de *L. bratislava*, cuando se mezcla con las fracciones de DA₂PP/CvK/LCIGP (para formar DA₂PP/CvK/LCIGPB), es potente y eficaz en cachorros de seis semanas de edad. La carga antigénica mínima (50 µg/dosis) fue suficiente para inducir protección de vacunados de espiroquetemia debido a la exposición virulenta de *L. bratislava*. La eficacia de *L. bratislava* en el producto de combinación de D₂APP/CvK/LCIGPB se demostró por seroconversión de 100% de vacunados y ninguno de los controles y libertad de espiroquetemia después de exposición virulenta en el 95% de los vacunados y solamente el 8% de los controles. La reducción en sangre de espiroquetemia acoplada con la seroconversión en los vacunados se comparó con los controles indicando que las otras 9 fracciones, tanto antígenos destruidos como vivos modificados, no interfirieron con la eficacia de la bacterina destruida de *L. bratislava* en DA₂PP/CvK/LCIGPB.

Ejemplo 2

30 **VACUNA QUE COMPRENDE LEPTOSPIRA BRATISLAVA, LEPTOSPIRA AUTUMNALIS, LEPTOSPIRA AUSTRALIS Y LEPTOSPIRA HEBDOMADIS**

35 En este ejemplo, se preparó una vacuna de combinación obteniendo en primer lugar polipéptidos capsulares de membrana externa (OMC) aislados de cada una de *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* y *L. hebdomadis* usando procedimientos convencionales disponibles en la técnica. Los polipéptidos OMC se combinaron después en presencia de un diluyente aceptable desde el punto de vista veterinario a una concentración final de aproximadamente 50 µg de cada preparación polipeptídica OMC por 1 ml de dosis.

A 40 cachorros beagle en un Grupo Experimental se les administraron dos dosis de la vacuna de combinación mediante vía intraperitoneal el día 0 y el día 21 mientras que a 40 cachorros beagle en un Grupo de Control se les administró solo diluyente en los mismos momentos.

40 Veintiún días después de la segunda vacunación, los cachorros del Grupo Experimental y el Grupo de Control se subdividieron en cuatro Subgrupos de 10 cachorros cada uno. Los Subgrupos se denominaron A, B, C o D. los cachorros en cada Subgrupo se expusieron a cepas virulentas de *Leptospira* como se muestra en la siguiente tabla a continuación:

Exposición:	Experimental				Control			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>L. bratislava</i>	x			x	x			
<i>L. autumnalis</i>		x				x		
<i>L. australis</i>			x				x	
<i>L. hebdomadis</i>				x				x

45 Después de la exposición, los cachorros de ambos grupos se controlaron diariamente para determinar las temperaturas rectales y cualquier posible síntoma clínico asociado con infección por *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L.*

australis o *L. hebdomadis*. Además, se extrajeron muestras de sangre diariamente de cada cachorro de ambos grupos durante 21 días después de la exposición. Las muestras de sangre se evaluaron para detectar células bacterianas (*L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* o *L. hebdomadis*) y para la aglutinación de suero de anticuerpos contra antígeno celular completo de *Leptospira* usando el ensayo de microaglutinación.

- 5 Una vacuna de combinación eficaz de acuerdo con este Ejemplo producirá uno o más de los siguientes efectos: (a) la presencia de anticuerpos contra al menos una de *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* o *L. hebdomadis*, con titulaciones de anticuerpos de al menos entre 10 a 500 a 0 y 21 días después de la segunda vacunación (antes de la exposición); (b) síntomas clínicos disminuidos de *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* o *L. hebdomadis* después de exposición con la cepa (o cepas) virulentas respectivas, en comparación con los síntomas clínicos observados en los cachorros de control que no recibieron la vacuna de combinación; y/o (c) aislamiento reducido de células vivas de *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. australis* o *L. hebdomadis* de la sangre de los cachorros expuestos en comparación con la cantidad de células vivas aisladas de la sangre de los cachorros de control.

REFERENCIAS

- 15 1. Rentko VT, Clark N, Ross LA, y col. Canine leptospirosis: a retrospective study of 17 cases. J. Vet Intern Med 1992; 6:235-244.
2. Nielsen JN, Cochran GK, Cassels JA, y col. *Leptospira interrogans* serovar bratislava infection in two dogs. J Am Vet Med Assoc 1991; 3:351-352.
3. Harkin KR, Gartrell CL. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). J Am Anim Hosp Assoc 1996; 32:495-501.
- 20 4. Adin CA and Cowgill LD. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). J Am Vet Med Assoc 2000; 216: 371-375.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a la cual pertenece la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende una proteína capsular de membrana externa (OMC) de *Leptospira bratislava*, y adicionalmente comprende un producto de vacuna de combinación que contiene
 - (i) un inmunógeno viral de una cepa atenuada del virus del moquillo canino (CD),
 - (ii) una cepa atenuada del adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2),
 - 5 (iii) una preparación de célula completa o parcial inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV),
 - (iv) una cepa atenuada de virus paragripal canino (CPI), y
 - (v) una cepa atenuada de parvovirus canino (CPV).
2. La composición según la reivindicación 1 que adicionalmente comprende una proteína OMC de *Leptospira autumnalis*, *Leptospira australis* y *Leptospira hebdomadis*.
- 10 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende adicionalmente un OMC de *Leptospira conicola*, *Leptospira grippotyphosa* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, que comprende adicionalmente un antígeno de *Bordetella bronchiseptica*.
5. La composición según la reivindicación 4, en la que el antígeno de *B. bronchiseptica* es el antígeno p68.
- 15 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición puede suscitar una respuesta inmunoprotectora contra infección por *L. bratislava* en un hospedador.
7. La composición según la reivindicación 6, en la que el hospedador es un canino, porcino o bovino.
8. La composición según la reivindicación 7, en la que el hospedador es un canino.
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que adicionalmente comprende un transportador, excipiente o diluyente farmacéutica o veterinariamente aceptable.
- 20 10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que adicionalmente comprende un conservante.
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que adicionalmente comprende un adyuvante.
- 25 12. La composición según la reivindicación 11, en el que el conservante es un antibiótico.
13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como vacuna en un animal.
14. La composición según la reivindicación 13 para su uso definido en dicha reivindicación, en el que el animal es un canino.