

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 842**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2008 PCT/IL2008/001216**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2009 WO09034575**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08789876 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2187958**

54 Título: **Vacuna atenuada para la erliquiosis**

30 Prioridad:

11.09.2007 US 971271 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.06.2017

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
(100.0%)
HI-TECH PARK, EDMOND J. SAFRA CAMPUS
GIVAT RAM PO BOX 39135
91390 JERUSALEM, IL**

72 Inventor/es:

**HARRUS, SHIMON y
BANETH, GAD**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 618 842 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).

Vacuna atenuada para la erliquiosis**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una cepa atenuada de *Ehrlichia canis* y a una vacuna que comprende dicha cepa atenuada para la protección de los mamíferos contra la erliquiosis.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La erliquiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad rickettsia transmitida por garrapatas, que afecta a los perros y otras especies caninas de todo el mundo. El agente causal es *Ehrlichia canis*, que infecta a los linfocitos circulantes y se transmite transtadialmente por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*. La EMC se produce en las fases aguda y subclínica, y en algunos casos progresa a una fase crónica. La fase aguda se caracteriza por fiebre, anorexia, depresión, linfadenopatía y trombocitopenia leve. Los perros se recuperan de la enfermedad aguda, pero se convierten en portadores con infección persistente del organismo sin signos clínicos de la enfermedad durante meses o incluso años. Cuando se desarrolla, la fase crónica se caracteriza por los signos clínicos, incluyendo trombocitopenia, hiperglobulinemia, anorexia, emaciación y hemorragia, en particular epistaxis, petequias y equimosis, y puede dar lugar a la muerte. La pancitopenia caracteriza a la fase crónica de la enfermedad y puede persistir durante un período de meses, o durante la vida restante del perro. La terapia de soporte suele ser necesaria para combatir la pérdida de masa muscular y la disfunción de órganos específicos.

La erliquiosis monocítica humana (EMH) está causada por el organismo relacionado *E. chaffeensis* y se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza, mialgia y leucopenia. Además, se ha determinado que una enfermedad similar denominada erliquiosis venezolana humana (EVH) está causada por una cepa de *E. canis* designada VHE AF373612 (Perez et al. (2006) Ann N Y Acad Sci. 1078:110–7). La terapia con antibióticos, en particular con doxiciclina o tetraciclina, se utiliza para el tratamiento de la EMC, EMH y EVH, y es sobre todo eficaz si se inicia en una etapa temprana de la enfermedad. No hay ninguna vacuna comercial para ninguna de las enfermedades mencionadas anteriormente, y el control de garrapatas sigue siendo el método profiláctico recomendado.

Un número de vacunas propuestas contra *E. canis* y métodos de protección contra la infección por *E. canis* se conocen en la técnica anterior.

Las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.º de publicación 2005/0202046 and 2006/0188524 revelan una composición de vacuna que comprende una vacuna inactivada de bacterina de *E. canis*, un vehículo y un sistema adyuvante; y un método para la prevención o mejora de la erliquiosis canina en un perro mediante la administración de dicha vacuna. El sistema adyuvante divulgado contiene tanto un agente inductor de respuesta de anticuerpos, por ejemplo, EMA/Neocryl® como un agente inductor de respuesta de inmunidad mediada por células, por ejemplo, bacilo de Calmette-Guerin (BCG) o Emulsigen®. Aunque estas publicaciones alegan que la invención induce eficazmente la inmunidad, las vacunas divulgadas son, de hecho, deficientes, puesto que se informó de una proporción significativa de los perros inmunizados con las vacunas desarrollan erliquiosis canina. Además, la preparación de tales vacunas es costosa, debido a la inclusión de múltiples adyuvantes, y el requisito para la inactivación de las cepas de *E. canis*. La inactivación, de acuerdo con estas divulgaciones, se lleva a cabo por medios convencionales, incluyendo el uso de agentes inactivadores químicos, tales como etilenimina binaria, beta-propiolactona, formalina, mertiolato, glutaraldehído, dodecilsulfato de sodio, o mezclas de los mismos; calor o psoraleno en presencia de luz ultravioleta.

Otras divulgaciones de la técnica anterior se refieren a vacunas que comprenden antígenos aislados de *E. canis* antígenos o combinaciones de los mismos, por ejemplo como se divulga en la solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de publicación 2006/0234322. las patentes de Estados Unidos n.º 6.458.942 y 6.392.023 divulgan formas recombinantes de proteínas inmunorreactivas de 28 kDa homólogas de *E. canis* y un método de inhibición de la infección por *E. canis* mediante la administración de una composición que comprende dichos antígenos. La solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de publicación 2004/0170972 da a conocer las proteínas recombinantes de *E. canis*, ProA, ProB, mmpA y un homólogo de la citocromo oxidasa, y el uso de las mismas para una vacuna recombinante. La solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de publicación 2004/0126871 divulga una vacuna de ADN que comprende el gen de la proteína antigénica mayor 1 (MAP-1) y/o MAP-2 de *Rickettsia rickettsii*, y un método para proteger a un huésped contra la enfermedad o la muerte causada por un patógeno de rickettsia, incluyendo *E. canis*, mediante la administración de dicha vacuna La solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de publicación 2004/0121433 da a conocer una vacuna contra la erliquiosis canina, que comprende la proteína de superficie inmunorreactiva de *E. canis* p153 o la proteína de la superficie inmunorreactiva de *E. chaffeensis* p156. La patente de Estados Unidos n.º 6.306.394 da a conocer una vacuna que comprende una proteína de *Ehrlichia* granulocítica o un fragmento de la misma, y un método para prevenir la erliquiosis en un animal mediante la administración de dicha vacuna. Las vacunas y los métodos mencionados anteriormente no están dirigidos al complemento completo de los antígenos de la superficie celular de *E. canis* y, en consecuencia, pueden no ser completamente eficaces en la prevención de la erliquiosis en huéspedes expuestos, ya que ofrecen la

posibilidad de evasión de la respuesta inmune por el agente infeccioso, incluso en los huéspedes vacunados.

5 El documento WO 03/038061 describe una vacuna contra *Ehrlichia canis* que comprende una cantidad inmunizante eficaz de una cepa atenuada de *E. canis*, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La cepa fue atenuada por la inactivación del gen Dsb.

En consecuencia, sigue existiendo una necesidad no satisfecha en la técnica de una vacuna eficaz contra *E. canis*.

10 La cepa de *E. canis* Israel 611 se ha propagado *in vitro* en una línea celular continua de macrófagos DH82 (Keysary et al. (1996) Vet Parasitol 62:331-40). De forma alternativa, la misma cepa se ha propagado en una línea celular continua de macrófagos de ratón, J774.A1 (Keysary et al. (2001) J Vet Diagn Invest 13(6):521-3). La patente de Estados Unidos n.º 5.192.679 da a conocer un método para el cultivo continuo de un patógeno bacteriano que comprende infectar DH82 con *E. canis* y cultivar las células infectadas en un medio de cultivo adecuado. La técnica anterior no enseña ni sugiere una cepa atenuada de *E. canis* adecuada para su uso como una vacuna contra la enfermedad causada por cepas patógenas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

20 La presente invención proporciona una vacuna de *E. canis* que comprende (i) una cepa atenuada de *E. canis* que tiene el número de acceso PCM B/00023; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna es eficaz para la prevención de la erliquiosis en mamíferos, en particular, perros y seres humanos. La invención proporciona además la cepa atenuada de *E. canis* que tiene el número de acceso PCM B/00023. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que una cepa atenuada de *E. canis* induce eficazmente inmunidad protectora contra la manifestación clínica de la enfermedad de erliquiosis en perros, incluso después de una sola inoculación y sin el uso de adyuvantes u otros reactivos especializados.

Además, las enseñanzas de la presente invención son ventajosas sobre las vacunas y métodos de vacunación conocidos anteriormente, ya que producen un mayor grado de inmunidad y no requieren el uso de adyuvantes costosos y otros reactivos especializados.

30 En un primer aspecto, la invención proporciona una cepa atenuada de *E. canis*, teniendo la cepa el número de acceso en la Colección Polaco de Microorganismos (PCM) B/00023, con fecha de depósito 3 de septiembre de 2008, en adelante denominada PCM B/00023. La vacuna de *E. canis* comprende (i) una cantidad eficaz para la inmunización de PCM B/00023, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, la vacuna de *E. canis* se formula para administración parenteral, oral o intranasal. En una realización particular, la vacuna está sustancialmente libre de un adyuvante. En una realización particular, la vacuna de *E. canis* comprende además un adyuvante. En una realización particular, la vacuna de *E. canis* comprende además agente de inmunización activo adicional. En una realización particular, el agente de inmunización activo adicional es una forma atenuada o inactivada de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en: virus de la rabia; *Borrelia burgdorferi*; virus del moquillo canino; parvovirus canino; adenovirus canino; coronavirus canino; *Giardia* spp.; *Leptospira interrogans*; y combinaciones de los mismos. En una realización particular, el PCM B/00023 es para su uso en la prevención de la erliquiosis.

45 En un segundo aspecto, la invención proporciona una vacuna de *E. canis*, en la que la vacuna comprende (i) una cantidad inmunizante eficaz de una cepa atenuada de *E. canis* que tiene el número de acceso PCM B/00023; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Realizaciones adicionales de la presente invención se divulgan en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

50 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción y dibujos siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

55 **La figura 1** ilustra las temperaturas rectales medias (°C) de dos perros, a los se hace referencia, respectivamente, como N.º 10 (símbolos cuadrados) y N.º 11 (símbolos triangulares), infectados experimentalmente con *E. canis*. Los puntos de tiempo indicados en el eje x son los días después de la infección primaria (DPPI) en los que se tomaron las muestras. El día 0 es el día de la inoculación con células DH82 infectadas con *E. canis*, la cepa de *E. canis* obtenida después de pases seriados en las líneas celulares de cultivo tisular DH82 y J774. El día 119 es el día de la exposición con una cepa virulenta de *E. canis*.

60 La **figura 2** ilustra significa el recuento medio de plaquetas ($\times 10^3/l$) de los perros N.º. 10 y N.º. 11 infectados experimentalmente con *E. canis*, como se describe para la Figura 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

65 La presente invención proporciona una vacuna de *E. canis* eficaz para la prevención de la erliquiosis, una

enfermedad potencialmente mortal que amenaza tanto a los caninos de compañía como a los salvajes, así como a los seres humanos. En los seres humanos, la erliquiosis suele ser difícil de diagnosticar debido a la naturaleza inespecífica de los síntomas y el retraso resultante en el diagnóstico y el inicio del tratamiento adecuado puede conducir a complicaciones graves. La invención puede conducir a la reducción de la incidencia de la erliquiosis y sus consecuencias a largo plazo, y puede tener un impacto positivo en los campos de la medicina veterinaria y la salud pública. La vacuna de la invención es ventajosa sobre las vacunas inactivadas y recombinantes y los métodos recombinantes de la técnica anterior, ya que induce un mayor grado de inmunidad y no requiere el uso de adyuvantes costosos y otros reactivos especializados.

10 Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "atenuado" se refiere a una forma o cepa viva alterada de un agente de enfermedad patogénico (un patógeno) normalmente que es relativamente menos virulenta que la forma o cepa parental. Tras la administración a un huésped susceptible, una cepa atenuada es capaz de estimular una respuesta inmune y la inducción de inmunidad a largo plazo, pero que no causa enfermedad aguda, aunque se puede producir una forma subclínica leve de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, "atenuación", "que atenúa" y formas gramaticales relacionadas se refieren a procedimientos que hacen que un patógeno se atenúe, tal como el paso repetido en cultivo de tejidos. El proceso de atenuación puede ser el resultado de una acumulación de mutaciones puntuales o eventos de recombinación que dan lugar a una reducción de la virulencia del patógeno. En consecuencia, una "vacuna atenuada" se refiere a una vacuna que comprende una cepa atenuada. Una cepa atenuada y una vacuna que comprende una cepa atenuada inducen fuertes respuestas humorales y celulares, y, por lo general, solo se requieren una o dos inmunizaciones para inducir inmunidad a largo plazo al patógeno.

De acuerdo con ello, se dice que una cepa atenuada "deriva de" una cepa parental patogénica citada, cuando el material de partida para el proceso de atenuación era la cepa patogénica.

Debe entenderse expresamente que una cepa atenuada y una vacuna preparada del mismo son distintos y diferentes de una cepa inactivada y una vacuna preparada a partir de la misma, ya que estos últimos están muertos y no son infecciosos, y se producen utilizando medios que están destinados a matar a la patógenos, tales como agentes químicos, calor o luz UV. En general, una cepa inactivada y una vacuna preparada a partir de la misma son relativamente más débiles que las formas atenuadas correspondientes, ya que la inmunidad inducida por las cepas inactivadas y las vacunas es principalmente humoral y de corta duración. Por consiguiente, las vacunas inactivadas requieren generalmente el uso de adyuvantes, así como múltiples inmunizaciones.

Los términos "patogénico" y "virulentos" se usan indistintamente en el presente documento para describir un organismo o una cepa del mismo, que causa enfermedad (es decir, un patógeno) en un huésped susceptible, por ejemplo *E. canis* y especies de Ehrlichia relacionadas que producen erliquiosis en caninos y seres humanos.

Los términos "patogenicidad" y "virulencia" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a la capacidad y/o la capacidad relativa de un patógeno para causar enfermedad en un huésped susceptible.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "infectividad en una especie huésped de mamífero susceptible" se refiere a la capacidad de un organismo para penetrar en las células diana de una especie huésped de mamífero susceptible. Por ejemplo, *E. canis* y especies de Ehrlichia relacionadas tienen capacidad de infectar macrófagos y monocitos de caninos y otros mamíferos. No obstante, debe entenderse que la capacidad de infección una especie y cepa concreta de ehrlichia no conduce necesariamente a la manifestación clínica de la enfermedad, es decir, la erliquiosis, en un huésped particular. Si se produce o no una manifestación clínica de la erliquiosis depende, aparentemente, de una serie de factores, incluyendo la especie y la cepa de la ehrlichia, la expresión de determinados factores de virulencia por la ehrlichia, y el estado inmune y la composición genética del huésped.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad inmunizante eficaz" se refiere a la cantidad de una vacuna o de una cepa atenuada de *Ehrlichia* según la invención que es suficiente para ser protector contra la manifestación clínica de la erliquiosis en un huésped mamífero susceptible.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "confiere resistencia a uno o más cepas patogénicas" se refiere a la capacidad de un agente, es decir una cepa atenuada en el contexto de la presente invención, para proteger a un huésped contra los efectos virulentos de la infección con o exposición a dicha una cepa patogénica.

El término "ehrlichia" se usa en el presente documento genéricamente para referirse a los miembros de la familia *Anaplasmatacea*, tales como los de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*. Tales miembros incluyen, por ejemplo, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* (antes *Ehrlichia*) *phagocytophilum* y *Neorickettsia* (antes *Ehrlichia*) *sennetsu*. El término también se utiliza en el presente documento para referirse a una multiplicidad de organismos de ninguna especie y cepa en particular de la familia mencionada anteriormente. Del mismo modo, el término "de ehrlichia" se utiliza en el presente documento para describir enfermedades, organismos, respuestas inmunológicas y otras

afecciones médicas y veterinarias y acontecimientos asociados y/o causados por miembros de la familia *Anaplasmatacea*.

5 Como se usa en el presente documento, la forma del singular "un" "uno/una" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una cepa atenuada" incluye combinaciones de cepas atenuadas, y así sucesivamente.

E. canis, cepas de la misma y organismos relacionados

10 *Ehrlichia canis*, un miembro de la orden *Rickettsiales*, es una bacteria dimórfica gramnegativa intracelular obligada transmitida por garrapatas, que reside como microcolonias dentro de una vacuola intracelular revestida con membrana (mórula), principalmente en monocitos y macrófagos de los huéspedes mamíferos, particularmente caninos. Cada mórula puede contener 100 o más organismos. Ultraestructuralmente, *E. canis* tiene dos formas, denominadas células reticuladas y las células con núcleo densos, que se asemejan morfológicamente a formas corporales elementales de clamidias. *Ehrlichiae* tiene genomas relativamente pequeñas (~1,2 Mbp) y no poseen plásmidos extracromosómicos. Los miembros del género *Ehrlichia* incluyen *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminantium*. El análisis filogenético de ADN ribosómico 16S (ADNr) y los genes *groEL* de *E. canis* y *E. chaffeensis* apoyan la estrecha relación genética de estos organismos y se ha notificado una considerable reactividad cruzada antigénica entre ellos (Chen et al. (1997) Clin Diag Lab Immunol 4: 731-735; Chen et al. (1994) Am J Trop Med Hyg 50: 52-58; Rikihisa et al. (1994) J Clin Microbiol 32: 2107-12).

25 *Ehrlichiae* tiene un ciclo de vida complejo que implica un vector de garrapata y un huésped mamífero y han desarrollado estrategias para establecer infecciones persistentes en los huéspedes naturales. *E. canis* se transmite entre los perros a través de la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* y se mantiene en la naturaleza por la infección persistente de perros salvajes y domésticos. Las ninfas o larvas de garrapatas normalmente se infectan con *E. canis* al alimentarse de un perro infectado persistentemente y mantienen la infección transtadialmente a medida que la garrapata mudas de un estadio a otro. Otras especies de mamíferos, a saber, lobos, zorros, chacales y ciervos, también pueden ser reservorios de *E. canis*.

30 El género *Ehrlichia* está estrechamente relacionado con los géneros de *Anaplasma* y *Neorickettsia*, cuyos miembros tienen un ciclo de vida intracelular similar. Los organismos *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys* y *Neorickettsia risticii* estaban clasificados anteriormente en el género *Ehrlichia*, pero se han vuelto a clasificar sobre la base del análisis filogenético del ADNr 16S.

35 El mecanismo de la infección por *Ehrlichia* persistente no está claro, aunque se han identificado proteínas inmunorreactivas y los posibles mecanismos patogénicos. Los miembros del género *Ehrlichia* tienen una familia de múltiples genes que codifican proteínas de superficie importantes homólogas, aunque distintas. Un loci de múltiples genes de *E. canis* incluye 25 genes parálogos que codifican proteínas de 28 kDa que pueden expresarse de forma diferencial en la garrapata y en los huéspedes mamíferos. Además, en *E. canis* se han identificado dos glicoproteínas de peso molecular alto (gp140 y gp200) y los correspondientes ortólogos en *E. chaffeensis*. Estas glicoproteínas parecen ser objetivos importantes de la respuesta inmune del huésped y provocan una fuerte respuesta de anticuerpos.

45 La cepa atenuada de *E. canis* de acuerdo con la invención es que tiene el número de acceso en la colección polaca de microorganismos (PCM) B/00023, de fecha de depósito 3 de septiembre de 2008 (al que se hace referencia en el presente documento como PCM B/00023), que procedió de la cepa Israel 611. Un procedimiento de atenuación de ejemplo, tal como el utilizado para desarrollar PCM B/00023, se describe en el presente documento en el Ejemplo 1. La eficacia de una cepa atenuada preparada de la misma manera para la prevención de la manifestación clínica de la erliquiosis en animales infectados experimentalmente se describe en el presente documento en el Ejemplo 2.

50 La expresión "propiedades inmunizante" incluye, pero no se limita a, uno o más de: la capacidad de inducir respuestas inmunes humorales y mediadas por células; el título y la duración de este tipo de respuestas; la capacidad para inducir tales respuestas en ausencia de adyuvante; la capacidad de inducir inmunidad a largo plazo; la capacidad de conferir protección contra la manifestación clínica de la enfermedad es decir, erliquiosis, y la capacidad de conferir resistencia a una cepa patogénica u organismo.

60 Una cepa de *E. canis* patogénica que puede utilizarse para la preparación de la cepa atenuada y la vacuna de la invención puede seleccionarse de cualquier cepa o aislado conocido, incluyendo, pero sin limitaciones, Israel 611, Ebony, Broadfoot, Florida, Kogashima 1, Louisiana, Oklahoma, Venezuela, Sao Paulo, North Carolina State University (NCSU) cepa Jake y los aislados de NCSU Demon, DJ y Fuzzy. Además, una cepa de *E. canis* patogénica adecuada puede ser una que se ha pasado en serie en una línea celular, tal como la línea celular canina DH82.

65 Algunos inventores de la presente invención divulgaron anteriormente la cepa Israel 611 y tiene dos formas de mórulas: (1) estrechamente compactada y (2) laxamente compactada, y su secuencia génica de ARNr de 16S es tres nucleótidos diferentes de la cepa Oklahoma y cuatro nucleótidos diferentes que la cepa Florida, con una

diferencia de un nucleótido en cada una (Keysary et al. (1996) Vet Parasitol 62:331-40; Keysary et al. (2001) J Vet Diagn Invest 13(6):521-3). El grado de diferencia de homología de la cepa Oklahoma es un 0,54 por ciento, mientras que la diferencia de la cepa Florida es de 0,61 por ciento (Keysary de 1996, citado anteriormente).

- 5 Supuestamente, la cepa Ebony tiene una homología del 99,9 por ciento con la cepa Oklahoma según la secuencia del ADNr 16S (Mathew et al. (1996) Am J Vet Res 57(11):1594-8). Se ha demostrado que Ebony es transmisible a los perros a través de la garrapata marrón del perro, ninfas y adultas (*Rhipicephalus sanguineus*).

10 La cepa Florida se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 6.458.942 y la patente de Estados Unidos n.º 6.432.649 y parece que contiene un gen de la proteína inmunorreactiva conservada de 28 kDa (patente de Estados Unidos n.º 6.458.942) y un gen de p30 perteneciente a la familia de múltiples genes de omp-1 (patente de Estados Unidos n.º 6.458.942). Además, la patente de Estados Unidos n.º 6.043.085 da a conocer que la cepa Florida tiene una proteína antigénica inmunodominante de 120 kDa, que contiene 14 repeticiones con 36 aminoácidos cada una, que se ha predicho que está expuesta en la superficie. Las unidades de repetición son hidrófilas que forman el núcleo de las regiones expuestas en la superficie de la proteína y son ricas en serina y ácido glutámico. La serina y el ácido glutámico comprenden cada uno el 19 % de los aminoácidos de una unidad de repetición. La cepa Florida se postula que es menos virulenta que la cepa de *E. canis* Jake (Breitschwerdt et al. (1998) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(2):362-68), mientras que la comparación sexológica con la cepa Oklahoma reveló 100 % de especificidad y 87,5 % de sensibilidad (Dawson et al. (1991) J Infect Dis. March; 163(3):564-71).

20 Al igual que la cepa Florida, la cepa Louisiana tiene un gen de la proteína inmunorreactiva mayor conservada de 28 kDa (patente de Estados Unidos n.º 6.458.942), un gen p30 perteneciente a la familia de múltiples genes omp-1 (patente de Estados Unidos n.º 6.432.649), y, como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 6.043.085, una proteína antigénica inmunodominante de 120 kDa, que contiene 14 repeticiones con 36 aminoácidos cada una, que se ha predicho que está expuesta en la superficie. Las unidades de repetición son hidrófilas que forman el núcleo de las regiones expuestas en la superficie de la proteína y son ricas en serina y ácido glutámico. La serina y el ácido glutámico comprenden cada uno el 19 % de los aminoácidos de una unidad de repetición.

30 De un modo similar, la cepa Oklahoma tiene un gen de la proteína inmunorreactiva mayor conservada de 28 kDa (patente de Estados Unidos n.º 6.458.942), un gen p30 perteneciente a la familia de múltiples genes omp-1 (patente de Estados Unidos n.º 6.432.649), y, como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 6.043.085, una proteína antigénica inmunodominante de 120 kDa, que contiene 14 repeticiones con 36 aminoácidos cada una, que se ha predicho que está expuesta en la superficie. Las unidades de repetición son hidrófilas que forman el núcleo de las regiones expuestas en la superficie de la proteína y son ricas en serina y ácido glutámico. La serina y el ácido glutámico comprenden cada uno el 19 % de los aminoácidos de una unidad de repetición. Además, McBride et al. divulgan que Oklahoma posee un gen de la glicoproteína (2,064 pb) que codifica las proteínas de 548 a 688 aminoácidos con masas moleculares predichas de solamente 61 y 73 kDa, pero con movilidades electroforéticas de 140 kDa (P140), respectivamente (McBride et al. (2000) Infection and Immunity 68(1):13-18). El gen de la proteína de 140 kDa tiene catorce unidades de repetición de 108 pb dispuestas en tándem, casi idénticas. La región 14 de repetición (78 %) del gen de P140 (1,620 pb) se expresó en *E. coli*, y la proteína recombinante mostró masas moleculares que varían de 1,6 a 2 veces más grandes que las predichas 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*. Mediante un análisis de la composición de hidratos de carbono identificó glucosa, galactosa y xilosa en las proteínas recombinantes. La presencia de solo un sitio de glicosilación unido a N (Asn-Xaa-Ser/Thr), la falta de efecto de la N-glicosidasa F, la presencia de 70 y 126 sitios de glicosilación de Ser/Thr en las regiones de repetición de P120 y P140, respectivamente, y una relación molar alta entre los hidratos de carbono y la proteína sugiere que los glicanos pueden estar unidos por O (McBride et al. (2000) Infection and Immunity 68(1):13-18). Oklahoma se puede cultivar en la línea celular de macrófagos caninos DH82 en medio esencial mínimo con 12,5 % de suero bovino fetal y L-glutamina 200 mM (Bowie et al. (1999) Clin. Diagnostic Lab. Immun. 6(2):209-15). Una comparación sexológica con la cepa Florida reveló una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 87,5 % (Dawson 1991, citado anteriormente). Se ha encontrado una similitud del 99,9 porcentaje, basado en la secuencia del ARNr 16S con las cepas Ebony (Mathew 1996), Kagoshima 1 (Unver et al. (2003) Ann NY Acad. Sci. 990:692-8), y Venezuela (Unver et al. (2001) J Clin Microbiol. 39(8):2788-93).

55 Los aislados de NCSU Demon, DJ y Fuzzy, y la cepa Jake de NCSU poseen todos ellos un gen de la proteína inmunorreactiva mayor conservada de 28 kDa (patente de Estados Unidos n.º 6.458.942). Se ha divulgado que DJ, Fuzzy y Jake también tienen un gen p30 perteneciente a la familia de múltiples genes omp-1 (patente de Estados Unidos n.º 6.432.649). Se cree que Jake es más virulenta que la cepa Florida (Breitschwerdt 1998, citado anteriormente).

60 Se descubrió que casi toda la secuencia de ARNr 16S de Kagoshima 1 era similar a las secuencias de las cepas Oklahoma y Venezuela de *E. canis* (1 par de bases de diferencia de 1,387) con una identidad de secuencia del 99,9 por ciento (Unver 2003, citado anteriormente). Además, y de manera similar, de su alta identidad de secuencia con la cepa Kagoshima 1, la cepa Venezuela tiene un 99,9 por ciento de similitud con la cepa Oklahoma según la secuencia de ADNr de 16S (Unver 2001, citada anteriormente).

Patogenicidad de *E. canis* y erliquiosis

La cepa *E. canis* seleccionada puede considerarse patógena sobre la base de su aislamiento a partir de un huésped mamífero que presenta signos clínicos y/o síntomas de la erliquiosis, o, como alternativa o además de, sobre la base de su capacidad de causar signos y/o síntomas clínicos de erliquiosis tras la administración a un huésped mamífero, por ejemplo en una infección experimental. Tales medios de determinación de la patogenicidad son conocidos por los expertos en la técnica.

La cepa *E. canis* patógena puede ser un aislado clínico, un cultivo de células infectadas de *E. canis* o una reserva de *E. canis* pasada en animales vivos, por ejemplo perros. Un aislado clínico puede ser una muestra de sangre, médula ósea, bazo, saliva, o fracciones aisladas de las mismas. Un cultivo de células es, convenientemente, un cultivo celular continuo, por ejemplo, la línea celular de macrófagos canina DH82, divulgada en Dawson et al (1991) J Infect Dis 163:564–567 y en Wellman et al (1988) In Vitro Cell Develop Biol 24:223–228. Sin embargo, un cultivo celular puede ser un cultivo primario de monocitos de sangre periférica, como se divulga en Nyindo et al. (1971) Am J Vet Res 32:1651–1658, o de monocitos, como se divulga en Hemelt et al. (1980) Cornell Vet 70:37–42. Otros posibles métodos de cultivo de células pueden utilizar macrófagos peritoneales caninos, como se divulga en Stephenson et al (1977) Am J Vet Res 38:1815–1819; células híbridas humanas caninas-humanas (Stephenson et al (1977), citado anteriormente), o una línea celular endotelial microvascular humana, como se divulga en Dawson et al (1993) Pathobiology 61: 293–296. Una reserva de *E. canis* pasada en animales vivos puede obtenerse como se divulga en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.º de publicación 2005/0202046 y 2006/0188524.

Erliquiosis se refiere a la enfermedad transmitida por garrapatas que se produce en caninos (domésticos y salvajes), zorros, lobos, chacales, ciervos y seres humanos, y que puede estar causada por cualquiera de una serie de especies de *Ehrlichia*, incluyendo *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminantium*. La erliquiosis también puede ser causada por *Anaplasma* (antes *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *A. platys* y *Neorickettsia* (antes *Ehrlichia*) *sennetsu* y *A. platys*. Sto. organismos pueden tener diferentes tropismos de células huésped incluyendo monocitos, granulocitos y plaquetas. La erliquiosis en los caninos se denomina erliquiosis monocítica canina (EMC) y está causada predominantemente por *E. canis*, aunque también puede estar causada por *E. chaffeensis*. La erliquiosis en los seres humanos se ha denominado erliquiosis monocítica humana (EMH) y erliquiosis venezolana humana (EVH), que se han determinado que está causada por *E. chaffeensis* y *E. canis*, respectivamente.

Los huéspedes mamíferos susceptibles a la erliquiosis incluyen los mamíferos mencionados anteriormente, así como especies adicionales, incluyendo vacas, caballos, cerdos, gatos, roedores y ovejas.

Las infecciones por *E. canis* en perros se caracterizan por fases aguda y subclínicas, y en algunos casos, una etapa crónica. En la fase aguda de la enfermedad, los perros pueden resolver la enfermedad, pero desarrollan infecciones subclínicas persistentes y, por lo tanto, se convierten en portadores asintomáticos de la infección. Cuando se produce la forma crónica de la enfermedad, la respuesta a la terapia con antibióticos puede ser mala y los perros a menudo mueren hemorragia, debilidad grave o infección secundaria.

La manifestación clínica de la erliquiosis en los perros se caracteriza por signos como fiebre; anorexia; petequias; equimosis, epistaxis, linfadenopatía; leucopenia; trombocitopenia; hiperplasia reticuloendotelial; hiperglobulinemia; mialgia; secreción ocular y nasal mucopurulenta; esplenomegalia, y combinaciones de los mismos. En los seres humanos, la manifestación clínica de la erliquiosis se caracteriza por síntomas como fiebre, dolor de cabeza, mialgia, erupción cutánea, náuseas/vómitos, alteración del estado mental, linfadenopatía, trombocitopenia, elevación de las transaminasas hepáticas, hipoalbuminemia, linfopenia, leucopenia, hiponatremia y combinaciones de los mismos.

La manifestación clínica de la erliquiosis puede ir acompañada de la replicación de *ehrlichia* en el huésped. La presencia de ADN de *Ehrlichia* en huéspedes afectados puede detectarse mediante análisis de muestras de fluidos o tejidos corporales tomadas del huésped, por ejemplo, sangre, utilizando una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica de PCR puede emplear, convenientemente, cebadores dirigidos a secuencias de ácido nucleico correspondientes a las principales proteínas de la superficie de *ehrlichia*, por ejemplo, p30, p43, y map2 de *E. canis*, y p28, p120 y map2 de *E. chaffeensis*, como se describe, por ejemplo, en Harrus et al. (1998) J Clin Microbiol 36(1): 73–76; Ohashi et al.(1998) J Clin Microbiol 36(9):2671–2680; Yu et al. (2000) J Clin Microbiol 38(1):369–374; McBride et al. (2001) J Clin Microbiol 39(1): 315–322; Stich et al (2002) J Clin Microbiol 40(2):540–546, y Knowles et al (2003) Clin Diagn Lab Immunol 10(4):520–524.

Métodos de atenuación

Se dan a conocer también un método para la atenuación de una cepa *E. canis* y un método para la preparación de una cepa atenuada de *Ehrlichia*. Los métodos comprenden las etapas de: (i) seleccionar una cepa patógena *E. canis* o *Ehrlichia* que se sabe que tiene capacidad de infección en una especie de huésped mamífero susceptibles y que es capaz de causar manifestación clínica de erliquiosis en la especie de huésped mamífero susceptible; (ii) infectar una primera línea celular de cultivo de tejidos con *E. canis* o la cepa de *Ehrlichia* patógenas y, posteriormente, realizar pases en serie de la primera línea celular de cultivo de tejidos infectada e (iii) infectar una segunda línea celular de cultivo de tejidos con la cepa obtenida de (ii), y, posteriormente, realizar pases en serie de

la línea celular de cultivo de tejido infectada. La primera línea celular de cultivo de tejidos puede ser una línea celular canina y la segunda línea celular de cultivo de tejidos puede ser una línea celular de mamífero no canina. La primera línea celular de cultivo de tejidos puede ser una primera línea celular derivada de la especie de huésped mamífero susceptible y la segunda línea de células de cultivo de tejidos puede derivar de una especie de mamífero distinta de la especie huésped mamífero susceptible.

Los métodos pueden comprender además una etapa adicional, a saber, la etapa (iv), que comprende infectar una segunda línea celular de cultivo de tejidos canina con la cepa obtenida de (iii) y, después, realizar pases en serie de la segunda línea celular de cultivo de tejidos canina infectada. Esta variante se emplea cuando la primera línea celular de cultivo de tejidos en la etapa (ii) es una línea celular canina y la segunda línea celular de cultivo de tejidos en la etapa (iii) es una línea celular de mamífero no canina.

En otra variante, la etapa (iv) comprende infectar una segunda línea celular derivada de la especie huésped mamífero susceptible con la cepa obtenida a partir de (iii) y, a continuación, realizar pases en serie de la segunda línea celular infectada derivada de la especie huésped mamífero susceptible.

Debe entenderse expresamente que las líneas celulares de cultivo de tejidos utilizadas en las etapas (ii) y (iii) derivan de diferentes especies de mamíferos. La línea celular de cultivo de tejidos utilizada en la etapa (iv) debe derivar de la misma especie de mamífero que la de la línea celular de la etapa (ii), aunque no tiene que ser una línea celular idéntica. Es decir, la línea celular utilizada en la etapa (iv) puede ser la misma o diferente de la utilizada en la etapa (ii), pero, cuando es diferente, la línea celular de la etapa (iv) debe derivar de la misma especie de mamífero que la que derivó la línea celular de la etapa (ii). Las líneas celulares utilizadas en las etapas (ii) y (iv) pueden ser diferentes, pero derivan de la misma especie de mamífero.

Por ejemplo, se puede usar una línea celular de monocitos de perro en la etapa (ii), tal como DH82, y en la etapa (iii) se puede utilizar una línea celular de monocitos murinos, ya que estas líneas celulares derivan de diferentes especies de mamíferos. La línea celular utilizada para la etapa (iv) debe derivar de tejido de perro. Por ejemplo, puede ser DH82, es decir, idéntica a la línea celular de la etapa (ii) La línea celular utilizada para la etapa (iv) puede ser una línea celular de perro diferente, aunque puede derivar de células hematopoyéticas, o de cualquier otro linaje, tejido o compartimento originario de perro.

La línea celular utilizada en las etapas (ii) y (iv) puede ser una línea celular de cultivo de tejidos canina. Ejemplos de líneas celulares caninas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, DH82, DLC 02, MDH, y un cultivo de células primarias de monocitos caninos. Una línea celular de cultivo de tejidos canina actualmente preferida es la línea celular de monocitos canina DH82.

No obstante, debe entenderse que las líneas celulares de mamífero no caninas se pueden usar en las etapas (ii) y (iv), en cuyo caso, una línea celular canina se puede usar en la etapa (iii).

La línea celular utilizada en la etapa (iv) puede ser una línea celular de cultivo de tejidos de mamífero no canino.

Especies de mamíferos no caninos incluyen especies murinas, bovinas, ovinas, porcinas, equinas, felinas, primates y seres humanos. Entre los ejemplos de una línea celular de cultivo de tejidos de mamífero no canina adecuado se incluyen, pero no se limitan a, J774.A1; P388D1; RAW264.7; Mm1; BDM-1, y IC-21. Una segunda línea celular de cultivo de tejidos preferida actualmente es la línea celular de monocitos murinos J774.A1.

Una combinación adecuada de una primera línea celular de cultivo de tejidos para la etapa (ii) y una segunda línea celular de cultivo de tejidos para la etapa (iii) es DH82 y J774.A1, respectivamente. Un ejemplo de una cepa patogénica de *E. canis* adecuada para su uso para el crecimiento en serie y de atenuación en estas cepas es Israel 611. Se pueden usar otras cepas patogénicas de *E. canis*, descritas anteriormente en el presente documento.

Especies de huéspedes mamíferos susceptibles son aquellas que tienen el potencial de desarrollar erliquiosis después de la infección con ehrlichia. Especies huéspedes mamíferos susceptibles incluyen perros, lobos, zorros, chacales, ciervos y seres humanos.

Las líneas celulares utilizadas en las etapas (ii) a (iv) pueden ser todas líneas de células hematopoyéticas, que pueden ser ventajosas debido al tropismo de las especies de *Ehrlichia*. Sin embargo, algunas de las líneas celulares también pueden derivar de células o tejidos no hematopoyéticos.

El método puede comprender además uno o más ciclos adicionales de las etapas (ii) - (iv), o cualquier combinación de los mismos. Es decir, cualquiera de las etapas (ii) - (iv) se puede repetir posteriormente a una etapa anterior. Por ejemplo, las etapas (ii) y (iii) se pueden repetir en secuencia después de realizarse la etapa (iii) inicialmente. Las etapas (ii) y (iii) se pueden repetir en secuencia después de la etapa (iv). El método puede comprender, además, un ciclo adicional de las etapas (ii) y (iii). El ciclo adicional de las etapas (ii) y (iii) se puede llevar a cabo tras la etapa (iii).

Infectar se refiere a la práctica de la introducción de una cepa de *E. canis* o una *Ehrlichia* diferente en una línea celular de cultivo de tejidos en particular, en presencia de un medio de crecimiento adecuado, y en condiciones adecuadas de, por ejemplo, temperatura, humedad y dióxido de carbono, durante un período de tiempo suficiente para conseguir la infección de, al menos, una proporción de las células en cultivo. La infección de las células se puede detectar por medios conocidos, tales como inmunofluorescencia y microscopía electrónica, como se describe, por ejemplo, en Keysary et al. (2001), citado anteriormente. Otros medios de detección de la infección son conocidos por los expertos en la técnica.

La realización de pases se refiere a la práctica de transferir una parte de las células infectadas en cultivo de tejido a un recipiente de crecimiento diferente que contiene las células no infectadas y medio fresco. El pase es el medio estándar por el cual un organismo que crece en una célula huésped se puede propagar. El pase en serie se refiere a la práctica de repetir continuamente el proceso del pase, por lo general a intervalos definidos, o en los puntos definidos por una etapa particular del crecimiento de las células o infección. Por ejemplo, las células de cultivo de tejidos infectadas con *E. canis* pueden pasarse cada de 7 a 14 días o cuando están infectadas, al menos, el 80 % de las células. Otros intervalos de tiempo o puntos finales también son adecuados, por ejemplo, pases cada de 10 a 30 días, o cuando están infectadas el 90-100% de las células. El intervalo de tiempo elegido entre los pases dependerá de la tasa de infección de las células. Debe entenderse expresamente que el término "pases" puede referirse tanto a la etapa inicial de la infección de las células, como a la posterior etapa de crecimiento dentro de las células. La etapa de la infección puede requerir un período de tiempo más largo que la etapa de crecimiento.

De conformidad con los métodos anteriores, las ehrlichia pueden pasarse alternativamente en diferentes líneas de células de cultivo de tejidos, que, en el presente documento, se denominan (a) y (b) con el propósito de proporcionar una explicación. "Pasar alternativamente" hace referencia al proceso de propagar las ehrlichia primero en la línea celular de cultivo de tejidos (a) y, después, en la línea celular de cultivo de tejidos (b), en el que cada etapa de propagación puede implicar un solo pase o pases en serie utilizando una serie de pases, 'por ejemplo, al menos 5, tal como aproximadamente 10 o aproximadamente 50 o aproximadamente 100.

Entre los medios que son adecuados para la infección y los pases en líneas celulares de cultivo de tejidos incluyen, por ejemplo, RPMI-1640, Opti-MEM®, AIM V® y medio Tagle modificado de Dulbecco (DMEM). Un medio de crecimiento puede complementarse de forma variada con suero (por ejemplo, suero de ternera fetal, suero bovino fetal, suero de caballo), glucosa, sales, aminoácidos y antibióticos, como se conoce en la materia.

Se puede obtener una suspensión de *E. canis* de la línea celular de cultivo de tejidos en la que se propaga. La suspensión puede estar libre de células o sustancialmente libre de células. Un método adecuado comprende la rotura de las células infectadas por homogenización o sonicación, seguido de centrifugación. El método puede implicar repetidas rondas de rotura celular y centrifugación, y puede involucrar además cromatografía de exclusión por tamaño. La centrifugación puede ser centrifugación en gradiente de densidad. Los métodos adecuados se describen, por ejemplo, en Keysary et al. (2001), citado anteriormente; McBride et al. (2001), citado anteriormente; Knowles et al. (2003), citado anteriormente y Rikihisa (1991) J Clin Microbiol 29(9):2024-2029. Una suspensión de *E. canis* obtenida de este modo se puede utilizar para infectar un cultivo no infectado de la misma línea celular, o un cultivo no infectado de una línea celular diferente. La suspensión puede además analizarse en un sistema animal experimental para determinar si la *E. canis* en el mismo se ha atenuado. Si la cepa de *E. canis* está atenuada, la suspensión puede utilizarse para preparar una vacuna atenuada.

Los métodos divulgados en el presente documento proporcionan una cepa atenuada de *E. canis* (o *Ehrlichia*) que confiere resistencia a una o más cepas patogénicas de *E. canis*, como se demuestra en el Ejemplo 2.

El número de pases en las etapas (ii) a (iv) de los presentes métodos puede ser suficiente para atenuar la patogenicidad de la cepa patogénica *E. canis* (u otra *Ehrlichia*), a fin de obtener una cepa atenuada de *E. canis* (u otra *Ehrlichia*) protectora contra la manifestación clínica de la erliquiosis. Debe entenderse que no hay un límite superior o inferior en particular del número de pases para cualquiera de estas etapas individuales y el número particular de pases o intervalo de los mismos para cada etapa puede variar de acuerdo con la especie y cepa de *Ehrlichia* utilizada, así como los tipos de células de cultivo de tejidos particulares. Sin embargo, está dentro de la capacidad de un experto ordinario en la técnica determinar el número requerido, por ejemplo mediante el uso de un diseño experimental de una matriz, en el que el número de pases de cada etapa es diferente.

En los métodos divulgados en el presente documento, los pases en serie en cada una de las etapas (ii) a (iv) puede llevarse a cabo (iv) para una serie de pases de al menos aproximadamente 5. El número de pases en cada una de las etapas (ii) a (iv) puede ser, de al menos aproximadamente 5, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100. De forma alternativa, el número de pases en cada una de las etapas (ii) a (iv) puede ser de aproximadamente 50. El número de pases en la etapa (iii) puede ser aproximadamente igual al número de pases en la etapa (ii), por ejemplo aproximadamente 50 cada uno. El número de pases en la etapa (iii) también puede ser aproximadamente el doble del número de pases en la etapa (ii), por ejemplo aproximadamente 100 en la etapa (iii) y aproximadamente 50 en la etapa (ii). Dependiendo del intervalo de tiempo entre los pases, los pases de las líneas celulares de cultivo de tejidos infectadas en cada una de las etapas (ii) - (iv) puede ser para un período de aproximadamente 1 año. En realizaciones particulares, los pases de las líneas celulares de cultivo de tejidos

infectadas en cada una de las etapas (ii) - (iv) es para un período de aproximadamente 1 año a aproximadamente 5 años, por ejemplo, de aproximadamente 2 años a aproximadamente 4 años.

5 Los métodos divulgados en el presente documento pueden comprender además uno o más ciclos adicionales de las etapas (ii) - (iv), o cualquier combinación de los mismos. El método puede comprender un ciclo adicional de las etapas (ii) y (iii), en el que el ciclo adicional se lleva a cabo después de la etapa (iii).

10 Cuando se incluye dicho ciclo adicional de las etapas (ii) y (iii), el número de pases en cada una de las etapas (ii) y (iii) puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20. En este ciclo adicional, la pases en cada una de las etapas (ii) y (iii) puede ser durante un periodo de al menos un mes, por ejemplo, aproximadamente 2 meses a aproximadamente 6 meses.

15 El método puede comprender además al menos una etapa de congelación. La congelación puede llevarse a cabo durante o entre cualquiera de las etapas (ii) - (iv). La congelación puede comprender el almacenamiento a corto o a largo plazo a -20 °C o -70 °C como se conoce en la técnica.

20 Para determinar si una cepa patógena *E. canis* se ha atenuado tras repetidos pases en serie en cultivo de tejidos tras la práctica del método divulgado en el presente documento, una preparación de la muestra de células de ehrlichia de cultivo de tejidos infectadas, o una suspensión sustancialmente libre de células de ehrlichia preparadas a partir del cultivo de tejidos como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se administra a animales de ensayo en un sistema de infección experimental para evaluar la patogenicidad de la ehrlichia en la muestra.

25 Un sistema de infección experimental emplea, típicamente, un número de perros sanos de mediana edad que están vacunados para enfermedades caninas estándar, incluyendo virus del moquillo, parvovirus, parainfluenza, adenovirus-2, *Leptospira* spp. y rabia. En el momento de la infección, los perros deben ser seronegativos para anticuerpos de *E. canis*, como se determina mediante el ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes indirectos (IFA) y no debe detectarse ADN de Ehrlichia en las muestras de sangre usando PCR con cebadores específicos para *E. canis*. Los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica deben estar dentro del intervalo de referencia normal y el estudio deberá realizarse en una instalación para animales libre de garrapatas.

30 Después de la inoculación de *E. canis* o células infectadas con *E. canis* a los perros de ensayo, se realizará una exploración física diaria durante un período adecuado, por ejemplo, 4 semanas, para detectar signos clínicos de erliquiosis. Las muestras de sangre deben extraerse a intervalos diferentes después de la inoculación y se evaluaron para detectar anticuerpos contra *E. canis*, por ejemplo mediante IFA, como se divulga en Keysary et al (1996), citado anteriormente, y/o para detectar ADN de *E. canis* usando amplificación por PCR, como se divulga en, por ejemplo, Stich et al (2002), citado anteriormente.

35 La atenuación se sugiere fuertemente si no se observa ninguna manifestación clínica de la erliquiosis, o si solo se observan signos leves de la enfermedad, aunque la infección se confirma por la seroconversión de IgG y una PCR positiva.

40 La capacidad de una cepa de *E. canis* atenuada para conferir protección contra la erliquiosis en un huésped mamífero susceptible puede determinarse mediante exposición a la infección de los perros de ensayo a los que se ha administrado una cepa atenuada de *E. canis*, como se ha descrito anteriormente, en paralelo con la exposición a la infección de los perros control que no han estado expuestos ni a los que se ha administrado la cepa atenuada de *E. canis*. Los perros de ensayo y control deben tener una PCR negativa en el momento de la exposición. Una reserva de exposición debe contener *E. canis* patógena, por ejemplo, sangre de un perro para el que se ha confirmado que tiene erliquiosis acuerdo con los signos clínicos y PCR positiva. Se puede preparar una reserva de exposición a partir de pases repetidos en huéspedes vivos, como se divulga en las solicitudes de patente con n.º de publicación 2005/0202046 y 2006/0188524. Se ha sugerido fuertemente que existe protección si no se observa ninguna manifestación clínica de erliquiosis en los perros de ensayo o si solo se observan signos leves de la enfermedad, mientras que los perros de control desarrollan signos clínicos y hematológicos compatibles con erliquiosis. La protección se confirma en los perros de ensayo con PCR positiva, lo que indica la aparición de la infección compatible con ausencia sustancial de manifestación clínica de erliquiosis.

55 Debe entenderse que la cepa atenuada de *E. canis* y la vacuna de la invención pueden ser protectoras contra la manifestación clínica de la erliquiosis, incluso cuando la erliquiosis está causada por especies de Ehrlichia distintas a *E. canis*. Es decir, pueden ser protectoras contra la erliquiosis causada por cualquiera de *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium*, *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys* y *Neorickettsia risticii*. Además, la cepa atenuada de *E. canis* y la vacuna de la invención pueden ser adecuadas para la administración a más de un tipo de especies de huésped mamífero, incluyendo perros y seres humanos.

Vacunas

65 La invención proporciona además una vacuna de *E. canis*, en la que la vacuna comprende (i) una cantidad inmunizante eficaz de una cepa atenuada de *E. canis* que tiene el número de acceso PCM B/00023; y (ii) un

- vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inventores de la presente invención han encontrado que una cepa atenuada de *E. canis* puede obtenerse mediante crecimiento secuencial y pases en serie de una cepa patogénica de *E. canis* en al menos dos tipos diferentes de líneas de células de cultivo de tejidos, derivadas, respectivamente, de una especie de mamífero canino y una especie de mamífero no canino, tal como se describe en el presente documento. El número de pases en serie en cultivo celular puede ser suficiente para atenuar la patogenicidad de la cepa de *E. canis* patogénica. Es importante destacar que la cepa atenuada de *E. canis* confiere resistencia a una o más cepas patogénicas de *E. canis* después de la infección de un huésped susceptible con una cepa patógena de este tipo, de manera que el huésped se mantiene sustancialmente libre de enfermedad clínica.
- 10 La vacuna comprende la cepa atenuada de *E. canis* que tiene el número de acceso en la Colección Polaca de Microorganismos (PCM) B/00023, con fecha de 3 de septiembre de 2008 (PCM B/00023). En general, es preferible que la vacuna esté sustancialmente libre de células de origen en cualquiera de las líneas celulares de cultivo de tejido en las que se prepararon y se propagó la cepa atenuada.
- 15 Una cantidad inmunizante eficaz significa la cantidad determinada que es protectora contra la manifestación clínica de la erliquiosis en un huésped mamífero susceptible. La cantidad eficaz puede variar más de acuerdo con la vía de administración. La cantidad inmunizante eficaz puede variar además de acuerdo con el peso y el tipo de mamífero que se está inmunizando. Por ejemplo, los perros de raza pequeña, mediana y grande requerirán diferentes dosis que se calculan de acuerdo con el peso corporal, como se conoce en el campo de la medicina veterinaria. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz para administrar.
- 20 Una cantidad inmunizante eficaz puede expresarse en diferentes unidades, o calcularse por diferentes medios. Por ejemplo, la cantidad inmunizante eficaz puede expresarse en términos del número de ehrlichia atenuadas por unidad de dosis. En este caso, una cantidad inmunizante eficaz puede estar dentro del intervalo de 1×10^3 a 1×10^{12} ehrlichia atenuadas por unidad de dosis. Una cantidad inmunizante eficaz puede ser 1×10^3 , o 1×10^4 , o 1×10^5 , o 1×10^6 o 1×10^7 o 1×10^8 o 1×10^9 , o 1×10^{10} , o 1×10^{11} , o 1×10^{12} ehrlichia atenuadas por unidad de dosis. Como alternativa, la cantidad inmunizante eficaz puede expresarse como microgramos de proteína de ehrlichia por kg de peso corporal. En este caso, una cantidad inmunizante eficaz puede estar en el intervalo de 1 a 100 microgramos de proteína de ehrlichia por kg de peso corporal por dosis unitaria. Como alternativa, una cantidad inmunizante eficaz puede expresarse en términos de células de cultivo de tejidos infectadas por ehrlichia. En este caso, una cantidad inmunizante eficaz puede estar en el intervalo de 1×10^3 a 1×10^{12} células de cultivo de tejidos, en el que el 40-100 % de las células están infectadas. Como alternativa, la cantidad inmunizante eficaz puede expresarse en unidades de dosis infecciosa de cultivo tisular (DICT₅₀). En este caso, la cantidad inmunizante eficaz puede estar en el intervalo de 1×10^3 a 1×10^{12} DICT₅₀ de *E. canis* atenuada por dosis unitaria.
- 35 La cepa atenuada de *E. canis* puede derivar de cualquier cepa de *E. canis*, tal como, por ejemplo, Israel 611; Ebony; Broadfoot; Florida; Kogashima 1; Louisiana; Oklahoma; Venezuela; Sao Paulo; Jake; Demon; DJ, y Fuzzy. La cepa atenuada de *E. canis* puede ser una que se ha sometido a pases en serie en una línea celular no canina. La línea celular no canina puede derivar de un mamífero, incluyendo uno clasificado como murino, bovino, ovino, porcino, equino, felino, primate y ser humano. La línea celular no canina se puede seleccionar de J774.A1; P388D1; RAW264.7; MM1; BDM-1, y IC-21. Las líneas celulares mencionadas anteriormente son líneas de células hematopoyéticas murinas. Las líneas celulares no caninas incluyen los derivados de cualquier otro mamífero y de cualquier linaje no hematopoyético de las mismas. La línea celular no canina puede ser la línea celular de monocitos murinos J774.A1.
- 45 La cepa atenuada de *E. canis* puede ser una que se ha sometido a pases en serie en una línea celular canina. La línea celular canina se puede seleccionar del grupo que consiste en: DH82; DLC 02; MDH, y un cultivo de células primarias de monocitos caninos. La línea celular canina puede ser DH82.
- 50 La cepa atenuada de *E. canis* puede ser una que se ha sometido a pases en serie en una línea celular canina y en una línea celular no canina. La línea celular canina puede ser DH82 y la línea celular no canina es J774.A1.
- La cepa atenuada de *E. canis* puede ser una que se ha sometido a pases alternos en una línea celular canina y en una línea celular no canina. El número de pases en cada una de la línea celular canina y la línea celular no canina puede ser al menos aproximadamente 5, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100.
- 55 La vacuna se puede formular para administración parenteral, oral o intranasal. La administración parenteral incluye administración por vía intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica e intravenosa. Las formas de administración parenteral incluyen formas líquidas estériles, tales como soluciones o suspensiones.
- 60 Las formas de administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, comprimidos masticables, soluciones líquidas, suspensiones, polvos o elixires para administración oral.
- 65 Se puede usar cualquier vehículo inerte, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato, o cualquier vehículo en el que la vacuna tenga propiedades de solubilidad adecuadas. Las vacunas pueden estar en forma de preparaciones de dosis única o en frascos de múltiples dosis que se pueden usar para los programas de vacunación

masiva.

La vacuna puede estar sustancialmente libre de un adyuvante, o agentes que proporcionan los efectos de un adyuvante. Como alternativa, la vacuna puede comprender un adyuvante para potenciar la producción de anticuerpos y/o células inmunes. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, varias formulaciones de aceite, tales como adyuvante completo de Freund, el dipéptido conocido como MDP, saponinas, como se divulga en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.047.540, hidróxido de aluminio, o citocinas linfáticas. El adyuvante de Freund es una emulsión de aceite mineral y agua que se mezcla con la sustancia inmunógena. Aunque el adyuvante de Freund es potente, usualmente no se administra a seres humanos. En cambio, el adyuvante alúmina (hidróxido de aluminio) se puede utilizar para la administración a un ser humano. La vacuna puede ser absorbida sobre el hidróxido de aluminio desde el que se libera lentamente después de la inyección. La vacuna también puede encapsularse dentro de liposomas, como se divulga en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.235.877.

En una realización particular, la vacuna comprende además un agente activo inmunizante inmunización adicional para producir una vacuna capaz de inducir inmunidad contra una serie de diferentes patógenos. El agente activo inmunizante adicional puede ser una forma atenuada o inactivada de un patógeno. Un patógeno de este tipo puede ser, por ejemplo, el virus de la rabia, *Borrelia burgdorferi*, el virus del moquillo canino, el parvovirus canino, adenovirus canino, coronavirus canino, *Giardia* spp., *Leptospira interrogans*, *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Dipylidium caninum*, *Isospora* spp, o una combinación de los mismos.

Debe entenderse que mientras que la cepa atenuada de *E. canis* y la vacuna que comprende la cepa atenuada de *E. canis* no requieren un adyuvante para inducir una respuesta inmune, cualquier agente de inmunización adicional, tal como el mencionado anteriormente, puede requerir un estimulante inmunológico no especificado.

Los métodos de preparación y utilización de vacunas, y detalles generales de formulaciones de vacuna que incluyen cantidades de antígenos, la vía de administración y los adyuvantes se divulgan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18ª ed. Mack Publishing Co., Easton, Pa., Osol (ed.); New Trends and Developments in Vaccines (1978) Voller et al (eds.), University Park Press, Baltimore, Md.; Kensil, (1996) Therapeutic Drug Carrier Systems 13:1-55; Livingston et al. (1994) Vaccine 12:1275, y Powell et al. (1994) AIDS RES, Human Retroviruses 10:5105.

La descripción anterior de las realizaciones específicas también revelará completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando los conocimientos actuales, modificar y/o adaptar fácilmente para varias aplicaciones, tales como realizaciones específicas, sin experimentación indebida y sin desviarse del concepto general de la marca. Debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en el presente documento tiene el propósito de descripción y no de limitación. Los medios, materiales y etapas para llevar a cabo diversas funciones divulgadas pueden adoptar una variedad de formas alternativas sin apartarse de la invención.

Los ejemplos siguientes se presentan con el fin de ilustrar más completamente determinadas realizaciones de la invención. No obstante, de ningún modo deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención. Un experto en la técnica puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Pase en serie alterno de *Ehrlichia canis* en dos tipos diferentes de cultivo celular tisular

Un cultivo viable de la cepa israelí 611 de *Ehrlichia canis* se propagó mediante pases en serie en células DH82 durante un período de aproximadamente 2 años. Después de este período, se continuó la propagación de la cepa mediante pases en serie en células J774.A1, como se describe en (9). La propagación en J774.A1 se llevó a cabo durante un período de aproximadamente 3 años. A continuación, las ehrlichia se propagaron de forma alterna en DH82 y en J774.A1, llevándose a cabo pases en serie en cada línea celular durante un periodo de aproximadamente 2 meses, para un total de aproximadamente 1 año. Finalmente, las ehrlichia se propagaron mediante pases en serie en células DH82 durante un período adicional de aproximadamente 2 años, llevándose a cabo cada pase cada 7-10 días. La viabilidad de la cepa resultante se confirmó mediante cultivo.

Ejemplo 2. Una cepa atenuada de *E. canis* confiere protección contra la manifestación clínica de la erliquiosis en perros

Mientras se estudiaba el tiempo mínimo de fijación de la garrapata necesario para la transmisión de *Ehrlichia canis*, dos perros fueron infectados experimentalmente con la cepa de *E. canis* que se habían sometido a múltiples pases en dos cultivos celulares diferentes (células DH82 y J774.A1), como se describe en el Ejemplo 1. Después de la inoculación primaria, los perros mostraron una enfermedad leve, indicada por trombocitopenia sin signos clínicos evidentes. La exposición intravenosa con una cepa virulenta salvaje de *E. canis* dio como resultado una enfermedad clínica leve sin fiebre, en comparación con una enfermedad grave en los perros control. Los resultados de este estudio sugieren por primera vez que los múltiples pases de *E. canis* en dos tipos diferentes de cultivo celular puede conducir a la alteración y/o atenuación de *Ehrlichiae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Garrapatas experimentales

5 En este estudio se utilizaron garrapatas de *R. sanguineus* criadas en laboratorio libres de infección con patógenos vertebrados. Los estadios preadultos se alimentaron de jerbos (*Meriones tristrami*) y las garrapatas adultas de conejos como se ha descrito anteriormente (7). Los estadios que no se alimentan se mantuvieron en un incubador a 27 °C y una humedad relativa del 80 %.

10 Infección experimental de perros con *E. canis*

15 Dos perros sabuesos de 4 años de edad sanos (n.º 10 y 11) vacunados para el virus del moquillo, el parvovirus, parainfluenza, adenovirus-2, *Leptospira* y la rabia se utilizaron en este estudio. Los perros se aclimataron a su nuevo ambiente durante 4 semanas antes de la inoculación. Los perros eran seronegativos para anticuerpos de *E. canis*, determinado mediante el ensayo de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y no se detectó ADN de Ehrlichiae en un ensayo PCR utilizando cebadores específicos para *E. canis* en el momento de la infección. Su parámetros hematológicos y de bioquímica clínica estaban dentro del intervalo normal de referencia del laboratorio del hospital veterinario de la Universidad Hebrea. Durante el curso del estudio que se mantuvieron en una instalación para animales libre de garrapatas.

20 A los perros (n.º 10 y 11) se les inoculó por vía intravenosa como se ha descrito previamente (8), con 10⁶ células DH82 (línea celular de macrófagos) muy infectadas (> 80 % de infección) con organismos de *E. canis* viables, obtenidos tras el pase en dos líneas celulares diferentes, DH82 y J774.A1, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

25 Se realizaron exploraciones físicas diarias, incluyendo mediciones de la temperatura rectal, para ambos perros durante la aclimatación y el periodo posterior a la infección (PI). Se extrajo sangre de la vena yugular antes de la inoculación y, después, al menos tres veces por semana. Se separó el suero después de centrifugación en el plazo de 1 hora de la recogida de sangre y se almacenó a -70 °C hasta su análisis. Se extrajo sangre para hematología y PCR en tubos de plástico que contenían EDTA. Los análisis hematológicos se realizaron en 2 horas desde la extracción de sangre usando un contador de células de impedancia semiautomático (Abacus, Diatron, Austria). No se trató a los perros contra la EMC durante el curso del estudio.

30 La serología para anticuerpos IgM e IgG de *E. canis* se llevó a cabo durante el curso del estudio usando la prueba IFA, como se ha descrito anteriormente (10). Además, se realizó una PCR anidada específica de la especie para la detección de ADN de *E. canis* basado en el gen p30, como se ha descrito anteriormente (11), antes y después de la inoculación.

35 El Comité para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Hebrea aprobó el protocolo de estudio y este cumplió todos los criterios establecidos por el mismo.

Ensayos de infección con garrapatas mediante alimentación de perros infectados

40 Las larvas de *R. sanguineus* criadas en laboratorio se alimentaron de jerbos. Después de la muda, las ninfas resultantes se introdujeron bolsas para las orejas en perros infectados experimentalmente con *E. canis* como se ha descrito anteriormente (7, 12).

45 Doscientos diez ninfas se colocaron en cada bolsa para orejas (una bolsa para cada perro) el día 23 PI cuando los perros estaban rickettsémicos según lo determinado por PCR. Las bolsas para orejas se comprobaron diariamente durante un periodo de 10 días hasta que se desprendieron. Las garrapatas que no se fijaron a las orejas durante las primeras 72 horas se descartaron (un total de 30 ninfas). Se encontró que ambos perros estaban rickettsémicos el día del desprendimiento, determinado por PCR. Se realizó PCR anidada conforme a p30 con el ADN extraído de las garrapatas después de la muda con el fin de detectar la infección de la garrapata por *E. canis*. El ADN extraído de las garrapatas no expuestas se utilizó como control negativo y el ADN de *E. canis* extraído de las células DH82 infectadas por *E. canis* sirvió como control positivo para el ensayo de PCR.

Infección por exposición de los perros n.º 10 y 11 con una cepa salvaje de *E. canis*

50 119 días después de la infección primaria con células DH82 infectadas con *E. canis*, los dos perros (n.º 10 and 11) fueron expuestos por vía intravenosa a 5 ml de sangre heparinizada, extraída de un perro infectado por *E. canis* de forma natural confirmada por PCR. Al mismo tiempo, se inoculó a cinco perros adicionales de la misma manera con la fuente de la infección idéntica en un experimento diferente y se utilizaron como controles para el estudio actual (6). Se realizó PCR anidada basada en p30 para *E. canis* con sangre extraída de los dos perros, antes y después de la inoculación por exposición como se ha descrito anteriormente (11).

65

RESULTADOS

Infección de los perros n.º 10 y 11 con *E. canis* cultivada

5 Ambos perros se infectaron con *E. canis* como lo confirma la seroconversión y la PCR positiva el día 12 PI. Ninguno de los perros desarrolló signos clínicos, sus temperaturas rectales estaban dentro del intervalo de referencia normal durante el curso del estudio (Figura 1), no obstante, ambos perros desarrollaron trombocitopenia pronunciada que alcanzó un nadir el día 23 PI de $21 \times 10^3/\mu\text{l}$ perro N.º 11) y $77 \times 10^3/\mu\text{l}$ (perro N.º 10), (Figura 2). No se registraron otras anomalías hematológicas.

10 Ambos perros desarrollaron anticuerpos IgG frente a *E. canis*, detectados inicialmente el día 12 después de la infección primaria (Tabla 1) Se detectaron títulos bajos de IgM solo dos veces durante las infecciones primarias, los días 16 y 21 PI para el perro 11, y los días 12 y 16 PI para el perro 10. En contraste, los niveles de IgG aumentaron rápidamente y fueron mayores que 1:1.280 para ambos perros desde el día 16 PI en adelante.

Ensayos con alimentación de garrapatas con perros infectados

15 Los ensayos para infectar garrapatas alimentándolas con perros infectados (n.º 10 y 11) dieron lugar a infección no detectable de las garrapatas, manifestada por los resultados negativos en la PCR.

Infección por exposición de los perros n.º 10 y 11 con una cepa salvaje de *E. canis*

20 El perro n. 11 mostró petequias leves y esplenomegalia el día 42 después de la exposición (día 161 después de la infección primaria), sin embargo el perro N.º 10 no mostró enfermedad clínica después de la infección por exposición. Ninguno de los perros tenía fiebre y sus recuentos de plaquetas se mantuvieron levemente trombocitopénicos después de la exposición durante un periodo de 42 días (Figuras 1 y 2). Otros hallazgos hematológicos estaban dentro del intervalo normal de referencia. Ambos perros (n.º 10 y 11) tenían niveles altos de anticuerpos IgG de *E. canis* el día de la exposición y durante el curso del estudio (Tabla 1). Ambos perros presentaron una PCR negativa en el día de la exposición (antes de la exposición) y PCR positiva los días 7, 11, 28 y 42 después de la exposición.

Tabla 1. Respuestas de anticuerpos IgM e IgG de los perros n.º 10 y 11.

DPPI		0-7	12	16	21	28	35	42	119*	126-191
Perro	10	-	1:160	1:80	-	-	-	-	-	
IgM										
Perro	10	-	1:1280	> 1:1280	> 1:1280	> 1:1280	> 1:1280	> 1:1280	> 1:1280	> 1:1280
IgG										
Perro	11	-	-	1:80	1:640	-	-	-	-	
IgM										
Perro	11	-	640	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	> 1:1280
IgG										

DPPI – Día posterior a la infección primaria.
*Día 119 posterior a la infección primaria= día de la infección por exposición con la cepa salvaje.

35 Los cinco perros en el experimento de control concurrente desarrollaron signos clínicos y hematológicos en consonancia con infección por *E. canis* y erliquiosis canina, incluyendo fiebre, anorexia, depresión, esplenomegalia, y trombocitopenia (6). Se detectó ADN de *Ehrlichia canis* en muestras de sangre de los cinco perros los días 7-10 PI, y todos ellos experimentaron seroconversión el día 12 PI. Los cinco perros desarrollaron enfermedad grave que puso en peligro sus vidas y obligaron a los inventores de iniciar el tratamiento con doxiciclina el día 12 PI (6).

DISCUSIÓN

40 El presente ensayo para infectar garrapatas mediante alimentación de perros rickettsémicos *E. canis* resultó un fracaso.. Se dejó que garrapatas comenzaran a alimentarse de los 2 perros reservorio durante la etapa aguda de la infección (día 23 PI) para aumentar la probabilidad de la infección por garrapatas, como se ha sugerido previamente (3, 13, 14). El fracaso en la transmisión de *E. canis* a las garrapatas mediante la alimentación de ninfas no repletas con perros infectados con *E. canis* cultivadas se ha descrito previamente en un solo informe (13). Sin embargo, en el último informe, el agente mantuvo su capacidad de infección patogenicidad para los perros a diferencia de nuestros resultados experimentales de infección canina. La diferencia entre los resultados en los dos estudios puede estar relacionada con el mayor número de pases del organismo en cultivo tisular y a la utilización de un cultivo de células no caninas diferente (J774.A1) como medio de transferencia adicional en el presente estudio. Los hallazgos de

Mathew et al. (1996) y nuestros resultados sugieren que la rickettsia podría haber perdido su capacidad de infección para *R. sanguineus* durante los pases repetidos en células de cultivo (13). El organismo podría haber sufrido algunos cambios que podrían haber afectado su afinidad por la garrapata. La regulación por disminución de las proteínas de unión a rickettsias/receptores podría explicar los últimos hallazgos.

5 Los posibles cambios en el organismo también pueden estar asociados con la enfermedad leve que se desarrolló en los perros inoculados. Ambos perros (n.º 10 y 11) desarrollaron trombocitopenia sin signos clínicos aparentes de erliquiosis canina después de la inoculación con *E. canis*. Inoculaciones previas de los perros con un aislado similar de *E. canis*, que, sin embargo, se habían cultivado durante solo unos pocos pases, con un tamaño del inóculo similar
10 y una ruta de infección similar, provocaron signos clínicos graves, incluyendo la pirexia observada el 10 PI, anorexia y linfadenomegalia generalizada, en cada uno de 6 perros participantes en el estudio (8). Parece ser que los múltiples pases a lo largo de varios años en las células DH82 y J774.A1 condujeron a la atenuación del organismo, lo que da lugar a una disminución de la patogenicidad, por tanto, producen una enfermedad menos grave.

15 La exposición intravenosa de los dos perros (N.º 10 y 11) con una cepa salvaje de *E. canis* 119 días después de la infección primaria dio como resultado una enfermedad leve sin fiebre (Figura 2). Sin embargo, los recuentos de plaquetas de ambos perros fueron ligeramente trombocitopénicos tras la exposición (Figura 2). La misma fuente de inóculo, cantidad y método de infección se utilizaron simultáneamente en un estudio paralelo en otros cinco perros no tratados (de la misma edad) de la misma colonia que nunca fueron expuestos a *E. canis* antes de la infección
20 experimental y se utilizaron como controles para el presente estudio. Sin embargo, en contraste con los resultados del presente estudio, la inoculación con la cepa salvaje dio como resultado una enfermedad grave en los cinco perros, que puso en peligro su vida y obligó a los inventores a comenzar el tratamiento el día 12 PI (6). Aunque en un estudio previo se demostró que *E. canis* puede persistir en la sangre de los perros infectados durante años después de la infección (15), se halló que la sangre de ambos perros en el presente estudio (N.º 10 y 11) tenía una
25 PCR-negativa para *E. canis* el día de la infección por exposición (cuatro meses después de la infección primaria), lo que sugiere la eliminación espontánea de los organismos de la sangre. La ausencia de la ehrlichiae de la sangre de los perros en una etapa tan temprana, cuatro meses PI, parece ser el resultado de la atenuación de Ehrlichia. Este último hallazgo, junto con la trombocitopenia leve, la ausencia de signos clínicos en un perro y los signos clínicos
30 leves en el otro perro después de la infección por exposición con una cepa virulenta de *E. canis* sugieren que estos perros se habían inmunizado mediante la inoculación primaria. No se extrajeron aspirados esplénicos de los dos perros expuestos (con la cepa salvaje) el día de la exposición, por lo tanto, existe la posibilidad de que los organismos de Ehrlichia estuvieran presentes en el bazo, aunque ausentes de la sangre (15). hallazgos sugieren que la cepa atenuada de *E. canis* se puede utilizar en el desarrollo de una vacuna eficaz para la EMC.

35 La respuesta serológica de IgM a *E. canis* en ambos perros pareció esporádica e inconsistente, coherente con un informe anterior (18), y sugiere que la medición de IgM no es ni fiable ni útil en el diagnóstico de la infección por *E. canis*. En contraste con la respuesta de IgM, las concentraciones de IgG aumentaron rápidamente y se mantuvieron altas durante el curso del estudio (Tabla 1), haciendo hincapié en su valor diagnóstico en el cribado y la definición de la exposición a *E. canis*.

40 En conclusión, los resultados de las infecciones experimentales y de exposición en este estudio sugieren, por primera vez, que *E. canis*, que ha sido objeto de atenuación después de varios pases en los dos cultivos de células diferentes puede servir como una potencial vacuna candidata para la EMC.

45 REFERENCIAS

1. Ristic M, Huxsoll DL, Weisiger RM, Hildebrandt PK, Nyindo MBA. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect. Immun.* 1972; 6: 226–231.
2. Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). *Am. J. Vet. Res.* 1975; 36: 937–940.
3. Lewis GE, Ristic M, Smith RD, Lincoln T, Stephenson EH. The brown dog tick Rhipicephalus sanguineus and the dog as experimental host of Ehrlichia canis. *Am. J. Vet. Res.* 1977; 38:1953–1955.
4. Harrus S, Waner T, Bark H.. nine monocytic ehrlichiosis – an update. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 1997;19: 431–444.
5. Branger S, Rolain JM, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, and Anaplasma phagocytophilum by real-time PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48: 4822–4828.
6. Harrus S, Kenny M, Miara L, Aizenberg I, Waner T, Shaw S. Comparison of Simultaneous Splenic Sample PCR for Diagnosis and treatment of Experimental Ehrlichia canis infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:4488–4490.
7. Hadani A, Cvilich R, Rechav Y, Dinur Y. Some methods for the breeding of ticks in the laboratory. *Isr. J. Vet. Med.* 1969; 26: 87–100.
8. Waner T, Leykin I, Shinisky M, Sharbani E, Buch H, Keysary A, Bark H, Harrus S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with Ehrlichia canis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000;7:145–150.
9. Keysary A, Waner T, Strenger T, Harrus S. Cultivation of Ehrlichia canis in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001;13: 521–523.

10. Keysary A, Waner T, Rosner M, Dawson JE, Zass R, Warner CK, Biggie KL, Harrus S. Isolation, in vitro propagation and genetic characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Israel. *Vet. Parasit.* 1995;62:331–340.
11. Stich RW, Rikihisa Y, Ewing SA, Needham GE, Grover DL, Jittapalapong S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30–based PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:540–546
- 5 12. Samish M, Pipano E. Transmission of *Theileria annulata* by *Hyalomma excavatum*. *Parasitology.* 1982;86:269–274.
13. Mathew JS, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Dawson JE, Warner CK, Murphy GL, Kocan KM. Attempted transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* after passage in cell culture. *Am. J. Vet. Res.* 10 1996;57:1954–1958.
14. Bremer WG, Schaefer JJ, Wagner ER, Ewing SA, Rikihisa Y, Needham GR, Jittapalapong S, Moore DL, Stich RW. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 2005;131:95–105.
- 15 15. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley J, Poland AM, Bark H. Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 month after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:79–82.
16. Bool PH. Studies on *Ehrlichia canis* (syn. *Rickettsia canis*). *Acta Tropica* 1959;16, 97–107.
17. Mahan S, Kelly PJ, Mahan SM. A preliminary study to evaluate the immune responses induced by immunization of dogs with inactivated *Ehrlichia canis* organisms. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2005;72:119–128.
- 20 18. McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Boudreaux C, Guedry T, Walker DH. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect. Immun.* 2003;71:2516–2524.

Reivindicaciones

1. Una vacuna frente a *Ehrlichia canis*, en la que la vacuna que comprende (i) una cepa atenuada de *Ehrlichia canis* que tiene el número de acceso PCM B/00023; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5
2. La vacuna de la reivindicación 1, en la que la cepa atenuada de *E. canis* confiere resistencia a una o más cepas patogénicas de *E. canis*.
3. La vacuna de la reivindicación 1, formulada para administración parenteral, oral o intranasal.
- 10
4. La vacuna de la reivindicación 1, sustancialmente libre de un adyuvante.
5. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende además un adyuvante.
- 15
6. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende además un agente de inmunización activo adicional.
7. La vacuna de la reivindicación 6, en la que el agente de inmunización activo adicional es una forma atenuada o inactivada de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en: virus de la rabia; *Borrelia burgdorferi*; virus del moquillo canino; parvovirus canino; adenovirus canino; coronavirus canino; *Giardia*; *Leptospira interrogans*; y combinaciones de los mismos.
- 20
8. La vacuna frente a *E. canis* de la reivindicación 1, para su uso en la prevención de la erliquiosis en un huésped mamífero susceptible.
- 25
9. La vacuna frente a *E. canis* para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la cepa atenuada de *E. canis* confiere resistencia a una o más cepas patogénicas de *E. canis*.
10. La vacuna frente a *E. canis* para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, formulada para administración parenteral, oral o intranasal.
- 30
11. La vacuna frente a *E. canis* para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el huésped mamífero susceptible se selecciona del grupo que consiste en: perro; lobo; zorro; chacal; ciervos y seres humanos.
12. La vacuna frente a *E. canis* para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la erliquiosis está causada por un organismo seleccionado del grupo que consiste en: *E. canis*; *E. chaffeensis*; *E. ewingii*; *E. muris*; *E. ruminantium*; *Anaplasma phagocytophilum*; *A. platys*, y *Neorickettsia risticii*.
- 35
13. Una cepa atenuada de *Ehrlichia canis* que tiene el número de acceso PCM B/00023.
- 40

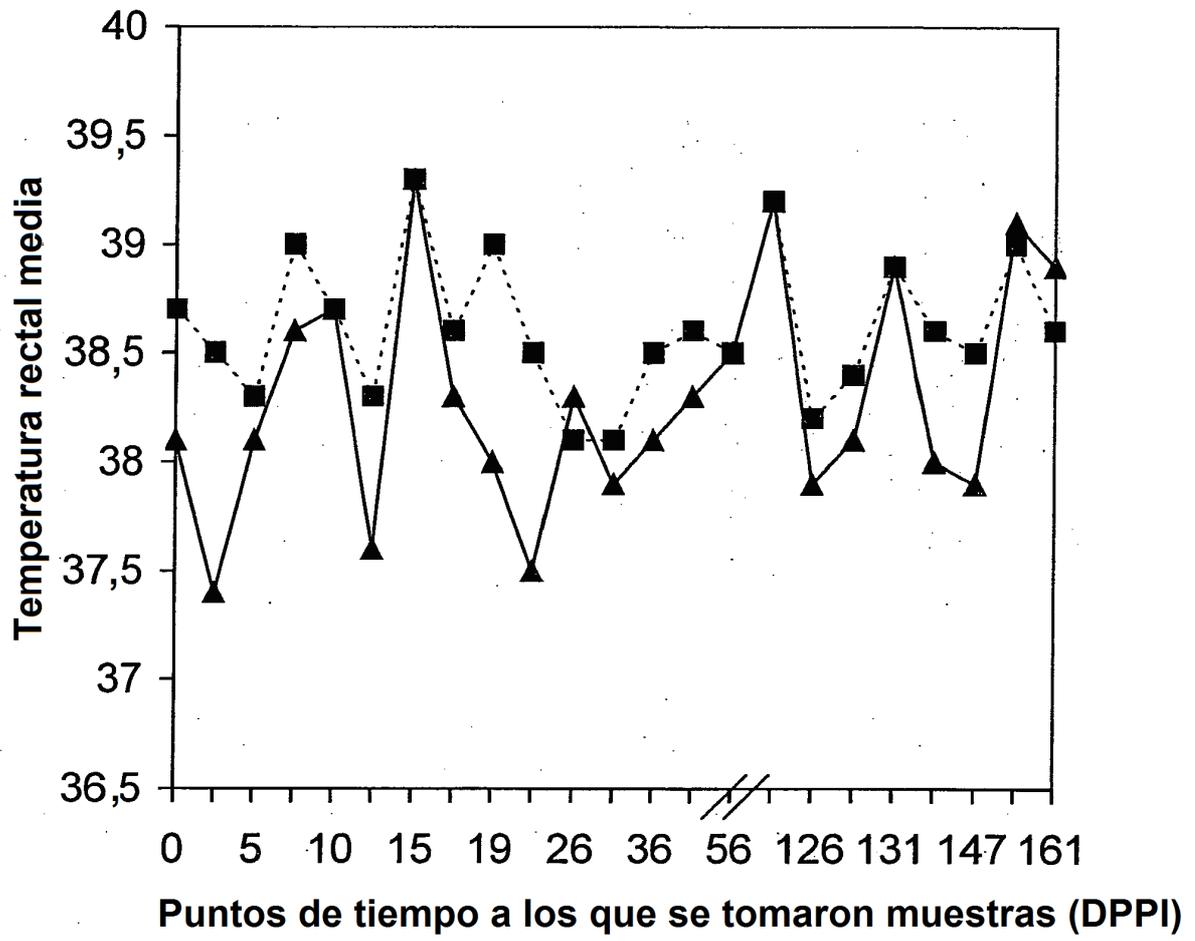


FIGURA 1

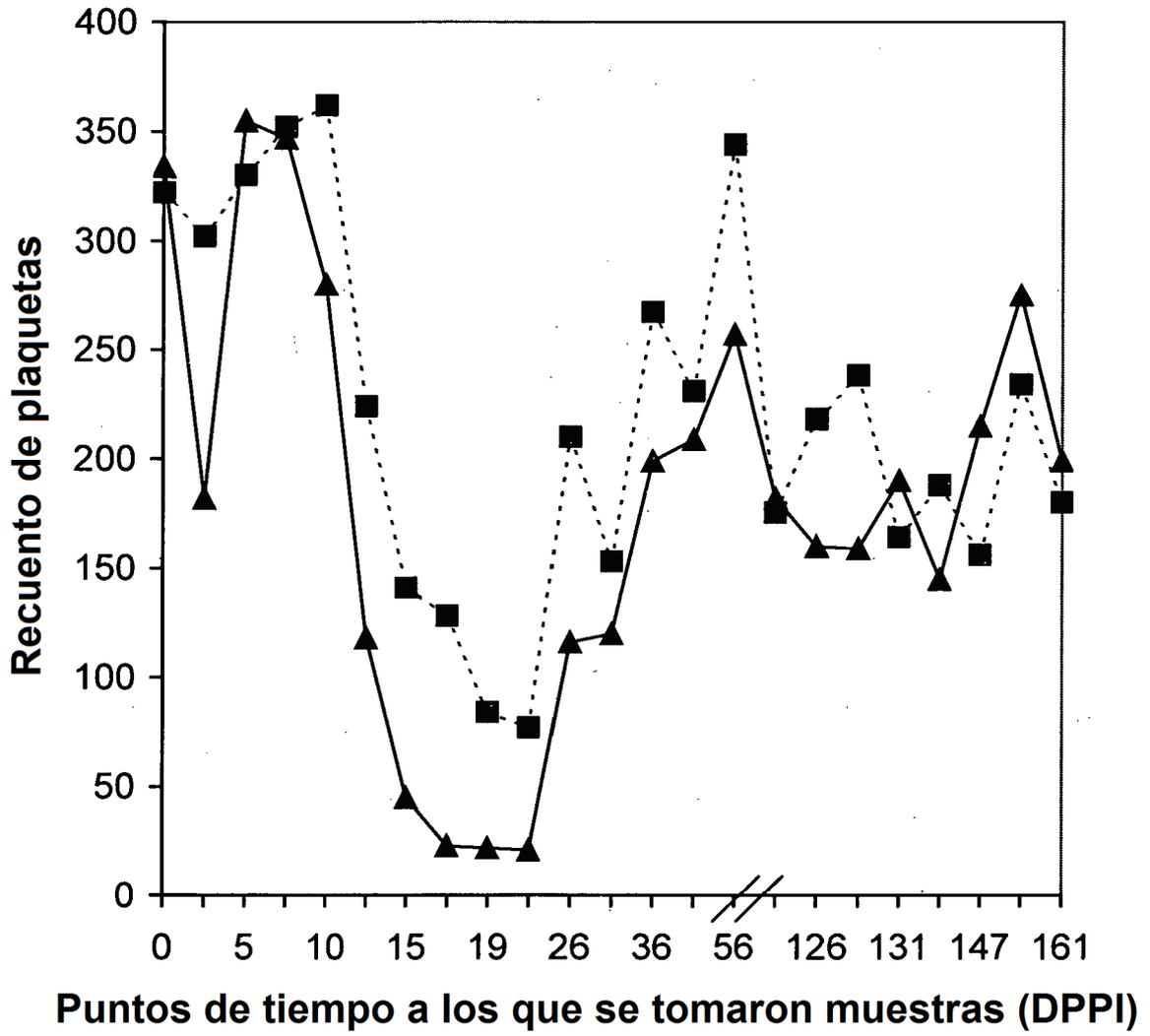


FIGURA 2