

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 236**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2013 PCT/US2013/049997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14014725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013 E 13747541 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2874653**

54 Título: **Procedimiento para proporcionar inmunidad protectora contra cepas heterólogas de Leptospira**

30 Prioridad:

17.07.2012 US 201261672386 P

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

18.04.2018

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

PARDO, MARIA, CAMILA

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 664 236 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

Procedimiento para proporcionar inmunidad protectora contra cepas heterólogas de *Leptospira*

5 **INCORPORACIÓN POR REFERENCIA**

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional USSN 61/672.386, presentada el 17 de julio de 2012.

10 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0002] La presente invención se refiere en general a composiciones inmunogénicas de *Leptospira*, que son capaces de provocar respuestas inmunitarias de protección cruzada en animales, particularmente animales caninos. La presente invención además se refiere a proporcionar animales, especialmente animales caninos, con respuestas inmunitarias de protección cruzada contra *leptospira*.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0003] La leptospirosis es una importante zoonosis mundial, causada por espiroquetas del género *Leptospira*. Es un riesgo laboral para muchas personas que trabajan al aire libre o con los animales, incluidos los agricultores, veterinarios, trabajadores de la carne, productores de leche y personal militar. Es un peligro de recreo para campistas, o aquellos que participan en deportes al aire libre en zonas contaminadas, y se ha asociado con la natación, el vadeo y el rafting de aguas bravas. Los brotes de leptospirosis son causados generalmente por la exposición a agua contaminada con la orina de animales infectados. Muchos tipos diferentes de animales portan la bacteria; pueden llegar a enfermar, pero a veces no tienen síntomas. Los organismos de *Leptospira* se han encontrado en ganado vacuno, cerdos, caballos, perros, roedores y animales salvajes, incluyendo mamíferos marinos. Los seres humanos se infectan a través del contacto con el agua, los alimentos o suelo que contiene la orina de estos animales infectados. Esto puede ocurrir por ingestión de alimentos o agua contaminados o a través de contacto con la piel, especialmente con las superficies mucosas, tales como los ojos o la nariz, o con la piel rota.

[0004] Los serotipos más comunes descritos en los Estados Unidos son *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. canicola* y *L. bratislava*. Otro serotipo de interés descrito en América Latina, es el serotipo *L. interrogans* Copenhageni. Este serotipo pertenece al serogrupo *Icterohaemorrhagiae*, y tiene similitudes en la secuencia de ADN de los factores de virulencia colonización conocidos, y parece ser responsable de la mayoría de leptospirosis canina en Nueva Zelanda.

35 Revisión de la literatura

[0005] "Leptospirosis Fact Sheet" (OMS, Oficina Regional para el Sudeste de Asia, 2009) indica, en parte, que los animales y los seres humanos pueden ser inmunizados, pero esa protección es en gran parte específica de serotipo. La falta de protección cruzada no es sorprendente, especialmente en vista de las importantes diferencias genéticas/genómicas, por ejemplo, entre la organización de genes en el locus biosintético de lipopolisacáridos (rfb) (Pena-Moctezuma, A. et al., 2001 FEMS Immunology and Medical Microbiology 31 (2001) 73-81).

[0006] Nascimento, A.L.T.O. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovar reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 186 (7): 2164-2172, 2004.

[0007] Nascimento A.L.T.O. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res* abril 2004; 37 (2).

[0008] Recombitek Lepto 4 (Merial Limited) - contiene *Leptospira icterohaemorrhagiae* (LI), se obtuvo del Centro Nacional de Enfermedades Animales (NADC), Ames, Iowa, el 28 de febrero 1968 por Dow Chemical, Zionsville, Indiana. La vacuna contiene además serotipos de *Leptospira grippityphosa*, *L. canicola* y *L. pomona*.

[0009] Novibac (Merck Animal Health) - contiene el *L. interrogans* serogrupo Canicola serotipo Portland-Vere (cepa Ca-12-000); *L. interrogans* serogrupo *icterohaemorrhagiae* serotipo copenhageni (cepa Ic-02-001); *L. interrogans* serogrupo Australis serotipo Bratislava (cepa As-05-073); y *L. kirschneri* serogrupo *Grippityphosa* serotipo Dadas (cepa Gr-01-005). Los datos proporcionados por la compañía indican, como era de esperar, que la vacuna que contiene Copenhageni provoca en el animal canino una respuesta inmunitaria contra el serotipo copenhageni. Esta declaración de la etiqueta del producto también es consistente con lo que es bien conocido en la técnica de *Leptospira*, a saber, que poca o ninguna evidencia de "protección cruzada", que se define aquí como proporcionar protección contra un serotipo de *Leptospira* heterólogo mediante la administración de una cantidad eficaz de un serotipo diferente (por ejemplo protección contra

copenhageni mediante la administración de una cantidad eficaz homóloga de LI Icterohaemorrhagiae no copenhageni serogrupo Leptospira.

[0010] Una vacuna pentavalente contra Leptospira que contiene L. interrogans serotipo hardjo tipo hardjopravito proporciona al ganado una protección contra un estímulo con L. borgpetersenii serotipo hardjo tipo hardjo-bovis cepa 203 (Rinehart, CL. Et al., 2012 American Journal of Veterinary Research 73 (2012) 735-740). La vacunación con una vacuna multivalente contra Leptospira induce una respuesta inmunitaria protectora contra el estímulo de una cepa homóloga en hamsters, así como una estimulación de cepa heteróloga para Leptospira Ballum (González, M. et al., 2004 Biotecnología Aplicada 21 (2004) 77-81).

[0011] Por lo tanto, como alternativa a la vacunación de animales utilizando todos los serotipos leptospiros, sería útil proporcionar nuevos procedimientos para provocar respuestas inmunitarias de protección cruzada contra diferentes serotipos Lepto. Hasta la presente descripción, los procedimientos para proporcionar protección frente a LI Copenhageni usando serotipos no copenhageni no eran conocidos.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0012] La presente invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad eficaz de serotipo Leptospira no copenhageni para usar en proporcionar a un animal canino inmunidad protectora contra Leptospira interrogans serotipo copenhageni; en la que la vacuna es una vacuna multivalente/de combinación que comprende los serotipos Leptospira interrogans (LI) icterohaemorrhagiae, LI canicola, LI grippotyphosa y LI pomona.

[0013] Una vacuna para usar en proporcionar inmunidad protectora contra un primer serotipo de Leptospira que comprende la etapa de administrar un segundo serotipo o serotipos de Leptospira, que es de un serogrupo y/o serotipo diferente, con respecto al primer serotipo de Leptospira. En los casos en que el segundo serotipo o serotipos de Leptospira es una combinación de serotipo de Leptospira (por ejemplo, una vacuna de combinación/multivalente), el segundo serotipo o serotipos de Leptospira no debe contener o comprender un serotipo de Leptospira del mismo serotipo que el primer serotipo de Leptospira, para el cual se busca la inmunidad protectora.

[0014] En una realización, la vacuna para usar en el procedimiento de la invención proporciona inmunidad protectora contra Leptospira icterohaemorrhagiae (LI) serotipo copenhageni, y comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un serotipo de LI no copenhageni a un animal canino en necesidad del mismo.

[0015] En una realización particular, el serotipo de LI no copenhageni es del pase 24 de LI obtenido del Centro Nacional de Enfermedades Animales (NADC), Ames, Iowa, el 28 de febrero 1968 por Dow Chemical, Zionsville, Indiana.

[0016] En otra realización, la vacuna para usar en el procedimiento de la invención proporciona inmunidad protectora contra LI serotipo copenhageni mediante la administración de una vacuna de Leptospira de combinación/multivalente. En una realización particular, la vacuna es RECOMBITEK® 4 Lepto de Merial, tal como se fabrica en los Estados Unidos desde el 25 de junio de 2012. En una realización, el 4 lepto comprende *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona* (todas inactivadas químicamente) y declaraciones de la etiqueta (desde el 25 de junio de 2012) de acuerdo con lo siguiente: "proporciona protección contra Leptospira grippotyphosa durante 15 meses y evita la pérdida de espiroquetas de Leptospira en la orina. Específicamente la vacuna está etiquetada para prevenir la Leptospirosis y la Leptospiruria causadas por L. icterohaemorrhagiae, L. canicola, L. grippotyphosa. También ayuda en la prevención de la Leptospirosis y la Leptospiruria causadas por L. Pomona.".

[0017] En una realización particular, e inesperadamente/sorprendentemente para el experto en posesión del conocimiento actual del estado de la técnica en el campo de leptospirosis, la invención proporciona una vacuna para usar en un procedimiento de administración de RECOMBITEK® 4 Lepto de Merial a animales caninos para provocar inmunidad protectora contra un primer serotipo de LI, que no está contenido dentro de la vacuna de 4 vías, y que es serotipo de LI copenhageni.

[0018] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y están abarcadas por la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019] Se establece más particularmente en el resto de la memoria descriptiva una descripción completa y habilitante de la presente invención, incluyendo el mejor modo de la misma, para un experto en la técnica, incluyendo la referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 proporciona un gráfico de las puntuaciones de la histopatología renal por grupo;

La figura 2 es una imagen de inmunohistoquímica de riñón (40X) de un perro de control con leptospirosis aguda. La flecha indica la presencia de espiroquetas de *Leptospira* en los túbulos renales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] La presente invención abarca una vacuna para usar en un procedimiento para la prevención de la infección debida a *Leptospiras* de un serotipo particular, mediante la administración de *Leptospiras* de un serotipo diferente.

[0021] En una realización, la invención proporciona procedimientos para provocar en un animal canino una respuesta inmunitaria protectora contra *Leptospira interrogans* serotipo *copenhageni* que comprende la etapa de administrar al animal una cantidad eficaz de un serotipo de *Leptospira* no *copenhageni*.

[0022] En una realización, el serotipo de *Leptospira* no *copenhageni* se suministra como parte de una vacuna multivalente/de combinación. En una realización particular, el serotipo de *Lepto* no *copenhageni* es *LI icterohaemorrhagiae*.

[0023] En otra realización, la vacuna comprende *Leptospira Interrogans* (*LI*) serotipo *icterohaemorrhagiae*. En todavía otra realización, la vacuna comprende *LI icterohaemorrhagiae*, *LI canicola*, *LI grippotyphosa* y *LI pomona*.

[0024] En una realización particular, la vacuna es RECOMBITEK® 4 *Lepto* de Merial, tal como se fabrica en junio de 2012.

Descripciones/Definiciones

[0025] La semilla de "LI serotipo ictero" de RECOMBITEK® 4 *Lepto* se identifica en el presente documento como ictero, que se obtuvo del Centro Nacional de Enfermedades Animales (NADC), Ames, Iowa, el 28 de febrero 1968 por Dow Chemical, Zionsville, Indiana. El 17 de diciembre de 1971, la semilla se transfirió a Pitman-Moore, Inc., Licencia No. 264, Washington Crossing, New Jersey. Se preparó una semilla madre por Dow en el pase 20. Pitman-Moore, Inc., produjo una semilla madre después de tres pases en medio artificial el 21 de enero 1975 como "LI 1508 P23". También se calificó una semilla madre por Pitman-Moore, Inc., identificada como "LI SC1518, P24 MS, 8/18/76". Rhône Merieux, Inc. (ahora conocido como Merial, Inc.), Licencia No. 298, recibió un cultivo de Pitman-Moore, Inc., el 30 de junio 1.988 identificado como "LI SC1518 P24 MS 8/18/76".

[0026] La cepa de estimulación de "LI serotipo *copenhageni*" era de origen y serogrupo/serotipo diferentes, cuando se comparó con los serotipos de vacunación (aislados de un ser humano en Brasil, y designado: Fiocruz L1-130).

[0027] Por "antígeno" o "inmunógeno" se entienden una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una pieza o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno pueden comprender una toxina o antitoxina.

[0028] El términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o bioactivo.

[0029] El término "polipéptido inmunogénico o antigénico", como se usa en el presente documento incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez que se administra al huésped, es capaz de evocar una respuesta inmune de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína según la invención comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier técnica de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente gran cantidad de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones

de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en el sector y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítomos conformacionales son fácilmente identificados mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Los procedimientos especialmente aplicables a las proteínas de T. parva se describen completamente en el documento PCT/US2004/022605.

[0030] Como se discute en el presente documento, la invención abarca fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por lo tanto, el término "polipéptido inmunogénico o antigénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones a la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento. El término "variación conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreaccionen con el polipéptido no sustituido.

[0031] El término "epítomo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítomo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

[0032] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Normalmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped mostrará tanto una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, tal que la resistencia a una nueva infección se verá aumentada y/o la gravedad clínica de la enfermedad se verá reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas y/o signos clínicos de la enfermedad normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0033] Por "animal" se entienden mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped tal como se usa en el presente documento incluye mamíferos y humanos. El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado), porcino (por ejemplo, cerdo), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emu y casuario), primate (por ejemplo, prosimio, tarsero, mono, gibón, mono), hurones, focas, y pescado. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas de recién nacido, embrionario y fetal.

[0034] A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0035] Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

[0036] La presente invención se describirá a continuación adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Protección cruzada de Recombitek® 4 Lepto contra una estimulación con *Leptospira interrogans* serotipo *Copenhageni* en perros

Objetivo. Para evaluar la protección cruzada de RECOMBITEK® 4 lepto contra una estimulación con *Leptospira interrogans* serotipo *Copenhageni* en perros.

[0037] *Materiales y Procedimientos.* Se dividieron aleatoriamente veinticuatro (24) beagles criados a propósito, de aproximadamente 2 meses, en dos grupos de 12 perros cada uno. A un grupo se administró Recombitek® 4 Lepto y al otro grupo una vacuna placebo (PBS). Todos los perros recibieron 2 dosis subcutáneas (1 ml) de la vacuna en un intervalo de 21 días. Los perros de ambos grupos se combinaron durante el estudio completo. Aproximadamente 4 semanas después de la segunda vacunación todos los perros fueron sedados y administrados con estimulación con *L. Copenhageni* a $4,7 \times 10^8$ espiroquetas de Lepto/ml, 10 ml por vía intraperitoneal y 0,2 ml por instilación tópica por ojo en el saco conjuntival. Después de la estimulación, la sangre se recogió periódicamente para el perfil de hígado y el reaislamiento de leptospira. Las muestras de suero se ensayaron para anticuerpos específicos de serotipo mediante el ensayo de microaglutinación a intervalos regulares. Se recogió la orina periódicamente para el reaislamiento de leptospira. Los perros fueron sometidos a necropsia al final del estudio y los riñones fueron recogidos para histopatología y reaislamiento de leptospira.

Tabla 1. Diseño del estudio

GRUPO	PERROS POR GRUPO	GRUPO DE VACUNA	RUTA/DOSIS	FRECUENCIA	ESTIMULACIÓN* (29 días después de V2)
A	12	Recombitek® 4 Lepto	SC/1 ml	dos veces, 21 días de diferencia	Conjuntivo 0,2 ml/interaperitoneal 10 ml
B	12	Placebo (PBS)	SC/1 ml	dos veces, 21 días de diferencia	

*Dosis de estimulación: $4,7 \times 10^8$ organismos por ml, aproximadamente $10^{9,73}$ organismos por pero

[0038] *Resultados.* Los perros con mortalidad después de la estimulación con *L. Copenhageni* antes de la necropsia prevista fueron clasificados con leptospirosis aguda si uno de los riñones era positivo para leptospirosis mediante inmunohistoquímica y/o las lesiones histopatológicas eran indicativas de leptospirosis aguda. Los perros que se sometieron a necropsia al final del estudio fueron clasificados con enfermedad debida a *L. Copenhageni* si tenía una o más muestras de orina positivas y una puntuación de histopatología renal mayor que o igual a 1 para cualquier riñón.

Tabla 2. Incidencia de la enfermedad, leptospiuria y leptospiremia

Nombre del grupo	(-)	(+)
Incidencia de la enfermedad debida a estimulación con <i>L. copenhageni</i>		
Placebo (PBS)	1	10
Vacuna de ensayo (Recombitek® 4 Lepto)	9	2
Valor p del test exacto de Fisher	P ≤ 0,01	
Leptospiuria - presencia de leptospira en la orina		
Placebo (PBS)	2	7
Vacuna de ensayo (Recombitek® 4 Lepto)	8	1
Valor p del test exacto de Fisher	P ≤ 0,05	
Leptospiremia - presencia de leptospira en la sangre		

Placebo (PBS)	1	10
Vacuna de ensayo (Recombitek® 4 Lepto)	9	1
Valor p del test exacto de Fisher	$P \leq 0,01$	

Tabla 3. Signos clínicos - incidencia y duración después de la estimulación

Signos clínicos	Grupo	Número total de perros	Duración promedio (días)
Depresión	Placebo (PBS)	3/11	2,3
	Recombitek® 4 Lepto	0/11	NA
Deshidratación	Placebo (PBS)	3/11	1
	Recombitek® 4 Lepto	1/11	1
Ictericia	Placebo (PBS)	3/11	3
	Recombitek® 4 Lepto	0/11	NA
Conjuntivitis	Placebo (PBS)	9/11	15,4
	Recombitek® 4 Lepto	5/11	7,8

- 5 [0039] *Conclusiones.* Esta es la primera vez que se describe la protección cruzada de Recombitek® 4 Lepto contra una estimulación con *L. Copenhageni* en perros. Estos datos son a la vez sorprendentes e inesperados en vista de la gran mayoría de las referencias bibliográficas, que colectivamente enseñan que la vacunación con una especie de leptospira particular no proporciona respuestas inmunitarias protectoras contra especies heterólogas de *Leptospira* (véase especialmente la "Leptospirosis Fact Sheet" (OMS, 2009) y Peña-Moctezuma, A. et al., 2001). La incidencia de la leptospirosis, y el reaislamiento de leptospira de sangre y orina fue significativamente mayor en el grupo placebo en comparación con los grupos con Recombitek® Lepto 4. Los perros en el grupo de placebo tenían una mayor incidencia de la depresión, deshidratación, ictericia y conjuntivitis. Todos los perros en el grupo de placebo tuvieron una puntuación de histopatología renal de 1 o mayor. Los valores promedio de ALP, ALT, BUN y creatinina en días específicos fueron mayores en el grupo de placebo en comparación con el grupo de Recombitek® Lepto 4.
- 10
- 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende una cantidad eficaz de serotipos de *Leptospira* no *copenhageni* para usar para proporcionar a un animal canino inmunidad protectora contra *Leptospira interrogans* serotipo *copenhageni*; en la que la vacuna es una vacuna multivalente/de combinación que comprende los serotipos *Leptospira Interrogans* (LI) *icterohaemorrhagiae*, LI *canicola*, LI *grippotyphosa* y LI *pomona*.
- 10 2. Vacuna para usar, según la reivindicación 1, en la que los serotipos *Leptospira Interrogans* (LI) *icterohaemorrhagiae*, LI *canicola*, LI *grippotyphosa* y LI *pomona* están químicamente inactivados.
3. Vacuna para usar, según la reivindicación 1, en la que se administra aproximadamente 1 ml de vacuna al animal canino.
4. Vacuna para usar, según la reivindicación 1, en la que se administran 2 dosis subcutáneas al animal canino.
- 15 5. Vacuna para usar, según la reivindicación 4, en la que se administran las 2 dosis en un intervalo de 21 días.
6. Vacuna para usar, según la reivindicación 1, en la que la vacuna comprende antígenos adicionales que proporcionan inmunidad contra patógenos caninos adicionales.
- 20 7. Vacuna para usar, según la reivindicación 6, en la que los antígenos adicionales se seleccionan del parvovirus canino (CPV), virus de la parainfluenza canina (CPI2), virus del moquillo canino (CDV), adenovirus, virus del herpes, rabia, coronavirus canino y combinaciones de los mismos.

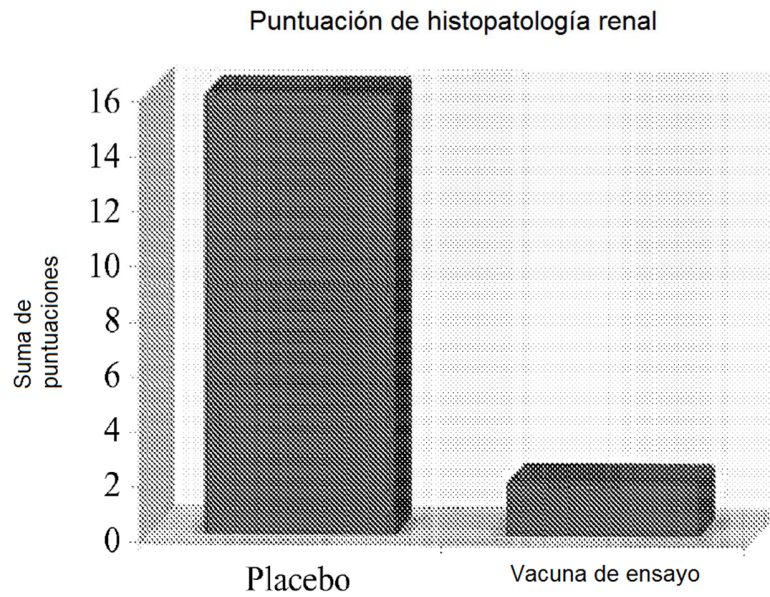


Figura 1

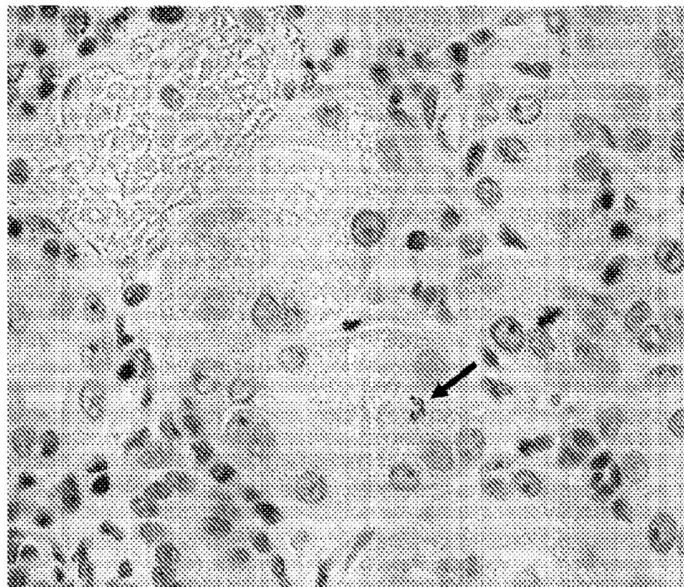


Figura 2