

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-076692-00000-0000

Fecha: 2012-05-10 09:59:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: ANTÍGENOS DE ACTINOBACILLUS SUIS.

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

DIRECCIÓN: 2621 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506 U.S.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 10 de Mayo de 2012

P2012/000050

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE &

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-076692- -00000-0000

Fecha: 2012-05-10 09:59:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000050

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC.

Dirección: 2621 North Belt Highway
St. Joseph, MO 64506 U.S.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estadounidense

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/055951 Fecha Noviembre 9, 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/059950 Fecha Mayo 19, 2011

6

Título (54) ANTÍGENOS DE ACTINOBACILLUS SUIS.

Clasificación Internacional (51) A61K 39/102; A61P 31/04.

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
US

(32) Fecha
Noviembre 10, 2009

(31) Número de Solicitud
61/259.728

9

Comprobante de pago No. 12-0045403

Fecha Mayo 08 de 2012



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. **11-024,243**



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



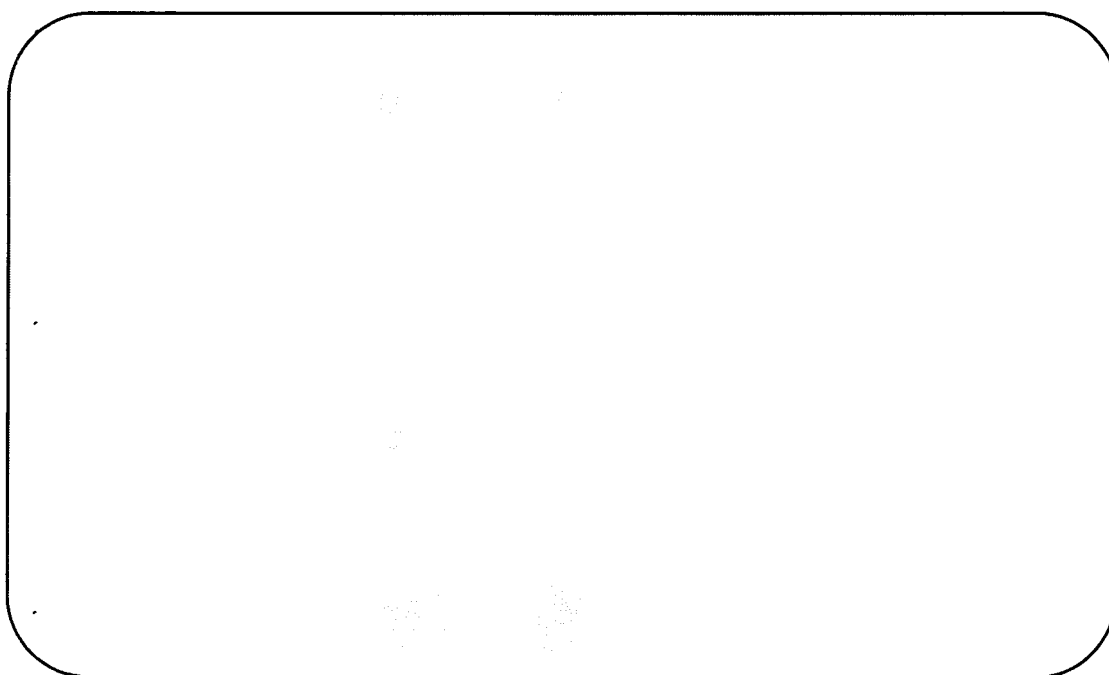
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2010/055951

JORDAN, Dianna Marie Murphy

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway
St. Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

KROLL, Jeremy J.

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway
St. Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

UTLEY, Philip

502 8th avenue, Slater, Iowa 50244
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

- / -

Bogotá D.C., Mayo 08 de 2012 - 16:23:08

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES		
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				<u>590.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-076692- -00000-0000

Fecha: 2012-05-10 09:59:05 Dep.: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra.: 11 PATENTEIYII Eve.: 378 FASENACIONALI
Act.: 411 PRESENTACION Folios: 59

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 8 de 2012 - 16:23:10

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés
presentado ante mí.

ROBERTO M. OLARTE GARCÍA

Traductor e Intérprete Oficial

Ministerio de Justicia

Licencia 0041/1996



ESTADO DE MISSOURI
Oficina del Secretario de Estado

Solicitado para uso en COLOMBIA

No para ser usado en los Estados Unidos de América.

El propósito de la Apostilla es el de certificar la autenticidad de la rúbrica del funcionario quien firma el documento, el cargo del funcionario quien firma el documento, y, donde fuese adecuado, la certificación del sello.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por JUANITA M. NOBLE
3. actuando en calidad de Notario Público, Estado de Missouri
4. lleva el sello de JUANITA M. NOBLE - NOTARIO PÚBLICO -
ESTADO DE MISSOURI

CERTIFICA

5. en Jefferson City, Missouri
6. este 24 de febrero de 2011
7. Por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri
8. No. 232026
9. (SELLO OFICIAL/SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO - MISSOURI)

10. Firma:

(firma: ilegible)

6

Estado de Missouri
Condado de Buchanan

El 14 de febrero de 2011, ante mí Juanita M. Noble, Notario Público para este estado,
compareció de manera personal **R. Michael Herrman**, Sub-Secretario y Director Jurídico
para Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., quien doy fe de ser la persona cuyo nombre
está suscrito en el presente documento quien actúa a nombre de dicha compañía y
reconoció ante mí que firmó la misma para los fines expresados en el mismo.

En testimonio del cual me suscribo y coloco el sello oficial.

(firma ilegible)

Notario Público

Mi comisión vence: 3/4/12

Sello: JUANITA M. NOBLE
Notario Público, Sello Notarial
Estado de Missouri
Condado de Buchanan
Comisión No. 08495643
Mi comisión vence el 4 de marzo de 2012

2

7

ESTADO DE MISSOURI
Oficina del Secretario de Estado

Solicitado para uso en COLOMBIA

No para ser usado en los Estados Unidos de América.

El propósito de la Apostilla es el de certificar la autenticidad de la rúbrica del funcionario quien firma el documento, el cargo del funcionario quien firma el documento, y, donde fuese adecuado, la certificación del sello.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por
3. actuando en calidad de
4. lleva el sello de

JUANITA M. NOBLE

Notario Público, Estado de Missouri

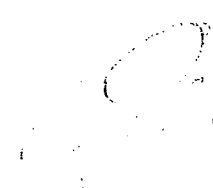
JUANITA M. NOBLE - NOTARIO PÚBLICO -
ESTADO DE MISSOURI

CERTIFICA

5. en Jefferson City, Missouri
6. este 3 de marzo de 2011
7. Por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri
8. No. 232205
9. (SELLO OFICIAL: SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO - MISSOURI)

10. Firma:

(firma: ilegible)



88
POLARTE MOURE
OF ARTEMORE & ASOCIADOS LTDA.

Certificación Notarial

(traducción adicional)

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. Declaración de Consentimiento Unánime de los
Directores con fecha de 8 de noviembre de 2007.

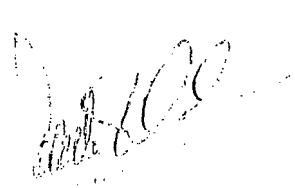
Estatutos de Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. 19 de mayo de 2009

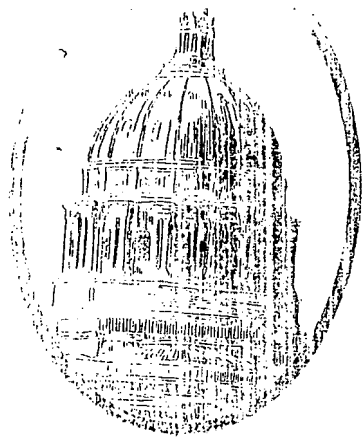
(firma ilegible)

R. Michael Herrman

Sub-Secretario

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.





STATE OF MISSOURI

Office of Secretary of State

Requested for use in: COLOMBIA

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document bears office, and where appropriate, the identity of the seal or stamp.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by JUANITA M. NOBLE

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

4. bears the seal/stamp of JUANITA M. NOBLE - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri

6. the 24th day of FEBRUARY

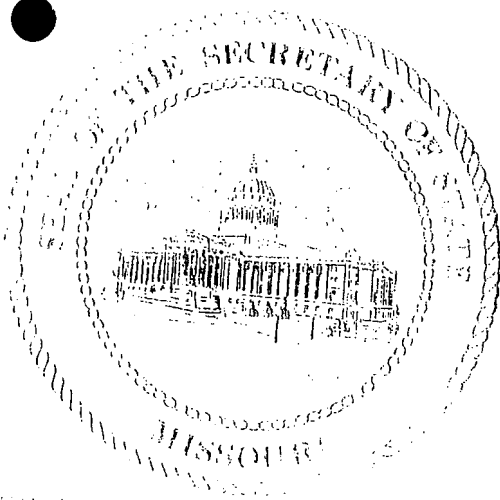
2011

7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri

8. No. 232026

9. Seal/Stamp

10. Signature:



Robin Carnahan
Secretary of State

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

domiciled in

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliado en

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002 United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right, also to file Unfair competition actions and request injunctions in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated. to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual y también para presentar acciones de competencia desleal y pedir medidas cautelares a nombre de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Date/Fecha:

City/Country/Ciudad,País:

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

State of Missouri)

County of Buchanan)

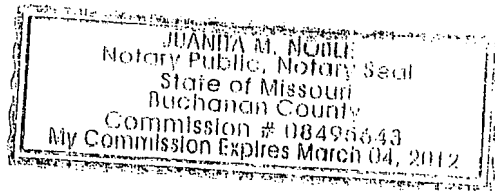
On this 14th day of Feb, in the year 2011 before me, Juanita M. Noble Notary Public in and for said state, personally appeared R. Michael Herrman, Secretary and General Counsel for Beohringer Ingelheim Vetmedica, Inc., known to me to be the person whose name is subscribed to the within instrument on behalf of said corporation and acknowledged to me that he executed the same for the purposes therein stated.

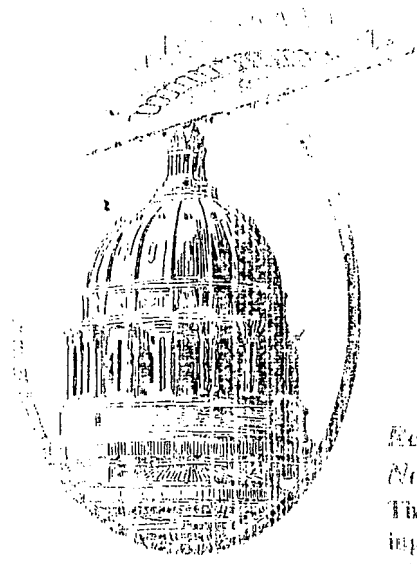
In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Juanita M. Noble
Notary Public

My Commission Expires: 3/4/12

(seal)





STATE OF MISSOURI
Office of
Secretary of State

Requested for use in COLOMBIA

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document bears office, and where appropriate, the identity of the seal or stamp.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. Country: United States of America
- 2. This public document has been signed by JUANITA M NOBLE
- 3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI
- 4. bears the seal/stamp of JUANITA M NOBLE - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

- 5. at Jefferson City, Missouri
- 6. the 3RD day of MARCH 2011
- 7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
- 8. No. 232205
- 9. Seal/Stamp
- 10. Signature:



Robin Carnahan
Secretary of State

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

R. Michael Herrman

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Secretary

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

of **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**

de

3. That **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**,

3. Que

having its principal place of business located in 2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002 United State of America

con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. Unanimous Written Consent of Directors dated November 3, 2007

Bylaws of Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. May 19, 2009

R. Michael Herrman
Assistant Secretary

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

18

LA FLORE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

State of Missouri)
County of Buchanan)

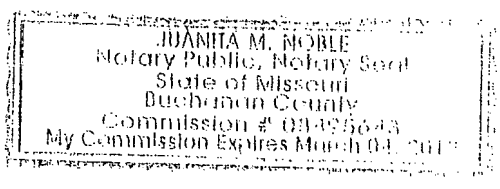
Assumed

On this 1st day of March, in the year 2011 before me, Juanita M. Noble, a Notary Public in and for said state, personally appeared R. Michael Herrman, Secretary and General Counsel for Bechringer Ingelheim Vetmedica, Inc., known to me to be the person whose name is subscribed to the within instrument on behalf of said corporation and acknowledged to me that he executed the same for the purposes therein stated.

In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Juanita M. Noble
Notary Public

My Commission Expires: 3/8/12



15

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 May 2011 (19.05.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/059950 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/102 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(74) Agents: MORRIS, Michael P. et al.; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, CT 06877-0368 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2010/055951

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
9 November 2010 (09.11.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/259,728 10 November 2009 (10.11.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
[US/US]; 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **JORDAN, Dianna Marie Murphy** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **KROLL, Jeremy J.** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **UTLEY, Philip** [US/US]; 502 8th Avenue, Slater, Iowa 50244 (US).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))



WO 2011/059950 A1

(54) Title: ACTINOBACILLUS SUIIS ANTIGENS

(57) Abstract: The invention provides immunogenic compositions useful for inhibiting, treating, protecting, or preventing infection by *Actinobacillus suis*. These immunogenic compositions are demonstrated to usefully stimulate immunogenic responses in treated pigs. Some vaccines stimulated reactions sufficient to be protective against *A. suis*. In addition, the invention provides kits comprising the immunogenic compositions; as well as, methods of using the compositions and kits.

ACTINOBACILLUS SUIIS ANTIGENS

RELATED APPLICATIONS

[0001] This application relates to and claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 61/259,728, which was filed November 10, 2009. The teachings and contents of which are
5 incorporated herein by reference in their entirety. All applications are commonly owned.

BACKGROUND OF THE INVENTION

A. Field of the Invention

[0002] The present invention relates to methods and compositions useful for inhibiting, treating, protecting, or preventing infection by *Actinobacillus suis*.

10 B. Description of the Related Art

[0003] *Actinobacillus suis* has recently emerged as a new threat to the swine industry in the United States. Previously associated with high mortality in “high health” herds, *A. suis* is now recognized as an important pathogen of conventional herds. It is particularly detrimental to younger animals. Infection results in actinobacillosis and can cause sudden death in both
15 neonate and weaned pigs. Symptoms in weaned pigs include anorexia, fever, cyanosis, congestion of the extremities, respiratory distress, pneumonia, necrotizing pneumonia, persistent cough, skin lesions, and fatal septicemia. Pneumonia, arthritis, septicemic signs, pleurisy, pericarditis, and miliary abscesses are known to occur in finishing pigs. Actinobacillosis also causes metritis and abortion in sows.

20 [0004] The gross pathology of actinobacillosis is characterized by lesions found in lungs, kidney, heart, liver, spleen, intestines and skin; hemorrhages and necrosis; and pneumonic lesions resembling pleuropneumonia. Histopathologically, the disease is characterized by the presence of bacterial thromboemboli with accompanying fibrinohemorrhagic necrosis in the vessels of various tissues; necrotizing bronchopneumonia; and pleuritis. Causes and contributing
25 factors to infection include precipitation by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) infection, teeth clipping, de-tailing, scrubbed knees, and entry via either respiration, cuts, or abrasions.

16
[0005] *Actinobacillus suis* is an opportunistic, gram-negative, non-motile, aerobic and facultative anaerobic coccobacillus that colonizes the upper respiratory tract. Genotyping of *A. suis* isolates recovered from clinical cases in the North American swine herds has revealed a limited genetic variability, with only 13 strains being identified among 74 isolates recovered from 29 different herds. The Simpson's diversity index (also known as species diversity index, see Simpson, 1949) for *A. suis* genotypes is 0.64, meaning that a random isolate has a 64% chance of being included in a unique genotype group using for example BOX-PCR (Simpson, 1949; Versalovic et al, 1991; Oliveira et al, 2007). Compared with *H. parasuis*, for example, which has a diversity index of 0.93 (Oliveira et al, 2007), *A. suis* is relatively clonal.

10 [0006] The phenotypic diversity of *A. suis* is also relatively limited. Only 2 serovars, namely O1 and O2 (Rullo, Papp-Szabo and Michael, 2006), and three capsular types, K1-3, have been described so far. Pathogenicity studies suggest that isolates from serogroup O2 tend to be more virulent than O1 isolates (Slavic, DeLay and Hayes, 2000). Serotyping of *A. suis* isolates used for autogenous vaccine production also confirms that a higher percentage of O2 isolates were associated with clinical disease compared with O1 isolates (Slavic, Toffner, and Monteiro, 15 2000). Although some of the *A. suis* virulence factors are known (e.g. the RTX toxins Apx I_{var. suis} and Apx II_{var. suis}), the factors that may trigger systemic infection still remain to be defined. Some of these potential factors include lipopolysaccharide (LPS) and capsular polysaccharides (CPS), outer membrane protein A (OmpA), proteases, and iron acquisition.

20 [0007] Currently, there are no commercial vaccines available for the control of *A. suis*, and most field veterinarians rely on autogenous vaccines and antimicrobial treatments to control disease. The development of a vaccine that will potentially protect against most isolates in the field is desirable; however, necessary data regarding the association between genotype, serovar, toxin, protein profiles, and factors that are involved in the pathogenesis of *A. suis* infection still remain to be defined. Herein, such data are provided, as well as, vaccines, and their methods of use, against *A. suis*. 25

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] The present invention provides new immunogenic compositions that are useful for protecting a subject against *Actinobacillus suis* infection. These compositions are also useful for inhibiting, treating, or preventing infection by various strains or types of *Actinobacillus suis*. 30

[0009] Compositions of the invention comprise a supernatant collected from one or more *A. suis* cultures grown to between 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀; and an adjuvant. Preferably the supernatant is inactivated, most preferably by formalin. The supernatant is also preferably filtered, such as through a 45 micron filter. Filtration may occur before or after inactivation as
5 deemed appropriate for a given situation. The supernatant, more preferably the filtered supernatant, is essentially free from *A. suis* cells but may contain multiple cellular components.

[0010] The skilled artisan will recognize that any of a variety of adjuvants may be suitably included in a composition of the invention. One exemplary adjuvant is Emulsigen® -D. The determination of adjuvant will, in part, depend upon the nature of the subject that is to receive
10 the composition; the method of administration to the subject; and conditions under which the composition is to be administered. For example, the adjuvant and supernatant, or filtered supernatant, may be admixed together prior to administration to a subject, administered simultaneously, or administered sequentially to a subject.

[0011] Suitable subjects of the immunogenic compositions of the invention include
15 animals and humans. Animals in which the immune response is stimulated by use of compositions or methods of the invention include livestock, such as pigs, calves, chickens, goats, and sheep, and domestic animals, such as mice, rabbits, dogs, cats, and horses. Preferred animals include porcines, murids, equids, lagomorphs, and bovids. Most preferably the animal is a porcine.

[0012] The invention also provides methods of provoking an immune response against
20 *Actinobacillus* reducing the incidence of or severity of a clinical sign associated with *Actinobacillus suis* infection in a subject comprising administering to the subject an immunogenic composition of the invention. Clinical signs associated with *A. suis* that may be reduced in incidence or severity in a subject include meningitis, septicemia, metritis, pneumonia,
25 cripelas-like lesions, and abortion. Any one of which may be lessened by the administration of a composition of the invention relative to a subject not receiving the immunogenic composition. Preferred compositions of the invention elicit a protective immunological response that is at least a 10% reduction in at least one clinical sign of an *A. suis* infection.

[0013] A preferred *Actinobacillus suis* infection that may be reduced by administration of a
30 composition of the invention is *A. suis* ISU-8594.

29

[0014] The invention also provides methods of making or preparing immunogenic compositions of the invention that may be useful in the making of a medicament. Such methods include the steps of growing an *Actinobacillus suis* culture to between 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀; collecting a supernatant from the culture; filtering the supernatant to yield a filtrate; and
5 mixing the filtrate with an adjuvant. Such methods may also include inactivating the supernatant, preferably prior to admixing the supernatant with an adjuvant. Inactivation may occur either before or after filtering the supernatant.

[0015] The invention further provides methods of diagnosing an *Actinobacillus suis* infection in a subject. Such methods comprise: a) providing a filtered supernatant prepared by
10 growing an *A. suis* culture to between 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀, collecting supernatant from the culture, and filtering the supernatant; b) contacting the filtered supernatant with a sample obtained from the subject; and c) identifying the subject as having an *A. suis* infection if an antibody capable of binding a component in the filtered supernatant is detected in the sample.

[0016] Those of skill in the art will be familiar with a variety of techniques suitable for
15 ascertaining if an antibody is capable of binding to a component. For example, binding may be detected by using a second antibody capable of binding the antibody in the sample. Binding by such second antibodies may be detected by a colorimetric assay or other suitable means.

[0017] The invention also provides kits that comprise: a) a filtered supernatant prepared by
20 growing an *Actinobacillus suis* culture to between 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀, collecting a supernatant of the culture, and filtering the supernatant; b) an adjuvant; and c) a container for packaging the supernatant and adjuvant. The filtered supernatant and adjuvant may be packaged together or separately.

[0018] A kit may further comprise instructions for use of the kit. It may also comprise a means of administering the filtered supernatant and adjuvant to a subject. A means of admixing
25 the supernatant and adjuvant together may also be included in a kit.

[0019] Compositions of the invention may further comprise a veterinarily acceptable carrier, second adjuvant, or combination thereof. Such compositions may be used as a vaccine and comprise an attenuated vaccine, an inactivated vaccine, or combinations thereof. Such

vaccines elicit a protective immunological response against at least one disease associated with *Actinobacillus*.

[0020] Preferred inactivation agents for use in methods of the invention are selected from the group consisting of binary ethyleneimine (BEI) and formalin. Formalin is a more preferred inactivation agent. Those of skill in the art will recognize that other inactivation agents and methods (i.e. heating, changing pH, etc.) are known in the art and may be interchangeably used in the practice of the invention, as long as, such agents or deactivation methods do not adversely alter the immunogenic properties or safety of the composition produced.

[0021] Methods of the invention may also comprise admixing a composition of the invention with a veterinarily acceptable carrier, adjuvant, or combination thereof. Those of skill in the art will recognize that the choice of carrier, adjuvant, or combination will be determined by the delivery route, personal preference, and animal species among others.

[0022] Preferred routes of administration include intranasal, oral, intradermal, and intramuscular. Administration in drinking water, most preferably in a single dose, is preferred. The skilled artisan will recognize that compositions of the invention may also be administered in two or more doses, as well as, by other routes of administration. For example, such other routes include subcutaneously, intracutaneously, intravenously, intravascularly, intraarterially, intraperitoneally, intrathecally, intratracheally, intracutaneously, intracardially, intralobally, intramedullary, intrapulmonarily, or intravaginally. Depending on the desired duration and effectiveness of the treatment, the compositions according to the invention may be administered once or several times, also intermittently, for instance on a daily basis for several days, weeks or months and in different dosages.

[0023] The invention also provides kits for vaccinating a subject comprising a set of printed instructions; a dispenser capable of administering a vaccine to an animal; and a supernatant from an *A. suis* culture having one or more components that effectively stimulates an immune response in a subject. Kits of the invention may further comprise a veterinarily acceptable carrier, adjuvant, or combination thereof.

[0024] A dispenser in a kit of the invention is capable of dispensing its contents as droplets; and the *A. suis* supernatant included in the kit is capable of reducing the severity of at

least one clinical sign of an *A. suis* infection when administered to a subject. Preferably, the severity of a clinical sign is reduced by at least 10% as compared to an untreated, infected subject.

[0025] An "immunogenic or immunological composition" refers to a composition of matter that comprises at least one *A. suis* supernatant, or immunogenic portion thereof, that elicits an immunological response of a cellular or antibody-mediated immune response to the composition in the subject. In a preferred embodiment of the present invention, an immunogenic composition induces an immune response and, more preferably, confers protective immunity against one or more of the clinical signs of a *Actinobacillus* infection.

[0026] An "immune response" or "immunological response" means, but is not limited to, the development of a cellular and/or antibody-mediated immune response to the composition or vaccine of interest. Usually, an immune or immunological response includes, but is not limited to, one or more of the following effects: the production or activation of antibodies, B cells, helper T cells, suppressor T cells, and/or cytotoxic T cells, directed specifically to an antigen or antigens included in the composition or vaccine of interest. Preferably, the vaccinated subject will display either a therapeutic or a protective immunological (memory) response such that resistance to new infection will be enhanced and/or the clinical severity of the disease reduced. Such protection will be demonstrated by either a reduction in number of symptoms, severity of symptoms, or the lack of one or more of the symptoms associated with the infection of the pathogen, a delay in the onset of clinical symptoms, reduced pathogen persistence, a reduction in the overall pathogen load and/or a reduction of pathogen excretion.

[0027] "Protection against *A. suis*", "protective immunity", "functional immunity", and similar phrases, mean an immune response against *A. suis* generated by an immunization schedule that results in fewer deleterious effects than would be expected in a non-immunized subject that has not been previously exposed to *A. suis*. That is, the severity of the deleterious effects of the infection are lessened in an immunized subject because the subject's immune system is resistant to the bacterium. Infection may be reduced, slowed, or possibly fully prevented, in an immunized subject, preferably a pig. Herein, where complete prevention of infection is meant, it is specifically stated. If complete prevention is not stated then the term includes partial prevention.

[0028] Herein, “reduction of the incidence and/or severity of clinical signs” or “reduction of clinical symptoms” means, but is not limited to, reducing the number of infected subjects in a group, reducing or eliminating the number of subjects exhibiting clinical signs of infection, or reducing the severity of any clinical signs that are present in the subjects, in comparison to wild-type infection. For example, it should refer to any reduction of pathogen load, pathogen shedding, reduction in pathogen transmission, or reduction of any clinical sign symptomatic of *A. suis* infection. Preferably these clinical signs are reduced in subjects receiving the composition of the present invention by at least 10% in comparison to subjects not receiving the composition and may become infected. More preferably clinical signs are reduced in subjects receiving the composition of the present invention by at least 20%, preferably by at least 30%, more preferably by at least 40%, and even more preferably by at least 50%.

[0029] The term “increased protection” herein means, but is not limited to, a statistically significant reduction of one or more clinical symptoms which are associated with *A. suis* infection in a vaccinated group of subjects vs. a non-vaccinated control group of subjects. The term “statistically significant reduction of clinical symptoms” means, but is not limited to, the frequency in the incidence of at least one clinical symptom in the vaccinated group of subjects is at least 20%, preferably 30% , more preferably 50%, and even more preferably 70% lower than in the non-vaccinated control group after the challenge with an infectious *Actinobacillus* bacterium.

[0030] Those of skill in the art will understand that the compositions used herein may incorporate known injectable, physiologically acceptable sterile solutions. For preparing a ready-to-use solution for parenteral injection or infusion, aqueous isotonic solutions, e.g. saline or plasma protein solutions, are readily available. In addition, the immunogenic and vaccine compositions of the present invention can include veterinary-acceptable carriers, diluents, isotonic agents, stabilizers, or adjuvants.

[0031] As used herein, “a veterinary-acceptable carrier” includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. In some preferred embodiments, and especially those that include lyophilized immunogenic

compositions, stabilizing agents for use in the present invention include stabilizers for lyophilization or freeze-drying.

[0032] In some embodiments, the immunogenic composition of the present invention contains an adjuvant. "Adjuvants" as used herein, can include aluminum hydroxide and aluminum phosphate, saponins e.g., Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), water-in-oil emulsion, oil-in-water emulsion, water-in-oil-in-water emulsion. The emulsion can be based in particular on light liquid paraffin oil (European Pharmacopea type); isoprenoid oil such as squalane or squalene; oil resulting from the oligomerization of alkenes, in particular of isobutene or decene; esters of acids or of alcohols containing a linear alkyl group, more particularly plant oils, ethyl oleate, propylene glycol di-(caprylate/caprate), glyceryl tri-(caprylate/caprate) or propylene glycol dioleate; esters of branched fatty acids or alcohols, in particular isostearic acid esters. The oil is used in combination with emulsifiers to form the emulsion. The emulsifiers are preferably nonionic surfactants, in particular esters of sorbitan, of mannide (e.g. anhydromannitol oleate), of glycol, of polyglycerol, of propylene glycol and of oleic, isostearic, ricinoleic or hydroxystearic acid, which are optionally ethoxylated, and polyoxypropylene-polyoxyethylene copolymer blocks, in particular the Pluronic products, especially L121. See Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) and Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997).

[0033] Other exemplary adjuvants are the SPT emulsion described on page 147 of "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, and the emulsion MF59 described on page 183 of this same book.

[0034] A further instance of an adjuvant is a compound chosen from the polymers of acrylic or methacrylic acid and the copolymers of maleic anhydride and alkenyl derivative. Advantageous adjuvant compounds are the polymers of acrylic or methacrylic acid which are cross-linked, especially with polyalkenyl ethers of sugars or polyalcohols. These compounds are known by the term carbomer (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Persons skilled in the art can also refer to U.S. Patent No. 2,909,462 which describes such acrylic polymers cross-linked with a polyhydroxylated compound having at least 3 hydroxyl groups, preferably not more than 8, the hydrogen atoms of at least three hydroxyls being replaced by unsaturated aliphatic radicals

having at least 2 carbon atoms. The preferred radicals are those containing from 2 to 4 carbon atoms, e.g. vinyls, allyls and other ethylenically unsaturated groups. The unsaturated radicals may themselves contain other substituents, such as methyl. The products sold under the name Carbopol ; (BF Goodrich, Ohio, USA) are particularly appropriate. They are cross-linked with
5 an allyl sucrose or with allyl pentaerythritol. Among them, there may be mentioned Carbopol 974P, 934P and 971P. Most preferred is the use of Carbopol 971P. Among the copolymers of maleic anhydride and alkenyl derivative, are the copolymers EMA (Monsanto), which are copolymers of maleic anhydride and ethylene. The dissolution of these polymers in water leads to an acid solution that will be neutralized, preferably to physiological pH, in order to give the
10 adjuvant solution into which the immunogenic, immunological or vaccine composition itself will be incorporated.

[0035] Further suitable adjuvants include, but are not limited to, the RIBI adjuvant system (Ribi Inc.), Block co-polymer (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monophosphoryl lipid A, Avridine lipid-amine adjuvant, heat-labile enterotoxin from E. coli
15 (recombinant or otherwise), cholera toxin, IMS 1314 or muramyl dipeptide, or naturally occurring or recombinant cytokines or analogs thereof or stimulants of endogenous cytokine release, among many others.

[0036] "Diluents" can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among
20 others. Stabilizers include albumin and alkali salts of ethylenediaminetetracetic acid, among others.

[0037] It is expected that an adjuvant can be added in an amount of about 100 µg to about 10 mg per dose, preferably in an amount of about 100 µg to about 10 mg per dose, more preferably in an amount of about 500 µg to about 5 mg per dose, even more preferably in an amount of about 750 µg to about 2.5 mg per dose, and most preferably in an amount of about 1
25 mg per dose. Alternatively, the adjuvant may be at a concentration of about 0.01 to 50%, preferably at a concentration of about 2% to 30%, more preferably at a concentration of about 5% to 25%, still more preferably at a concentration of about 7% to 22%, and most preferably at a concentration of 10% to 20% by volume of the final product.

[0038] Herein, “effective dose” means, but is not limited to, an amount of *A. suis* supernatant or filtered supernatant that elicits, or is able to elicit, an immune response that yields a reduction of clinical symptoms in a subject to which the supernatant is administered.

[0039] “Safety” refers to the absence of adverse consequences in a vaccinated subject following vaccination, including but not limited to: potential reversion of a bacterium-based vaccine to virulence, clinically significant side effects such as persistent, systemic illness or unacceptable inflammation at the site of vaccine administration.

[0040] The terms “vaccination” or “vaccinating” or variants thereof, as used herein means, but is not limited to, a process which includes the administration of a composition of the invention that, when administered to a subject, elicits, or is able to elicit—directly or indirectly—an immune response in the subject against *A. suis*.

[0041] Methods for the treatment or prophylaxis of infections caused by *A. suis* are also disclosed. The method comprises administering an effective amount of the immunogenic composition of the present invention to a subject, wherein said treatment or prophylaxis is selected from the group consisting of reducing signs of *A. suis* infection, reducing the severity of or incidence of clinical signs of *A. suis* infection, reducing the mortality of subjects from *A. suis* infection, and combinations thereof.

[0042] “Mortality”, in the context of the present invention, refers to death caused by *A. suis* infection, and includes the situation where the infection is so severe that an animal is euthanized to prevent suffering and provide a humane ending to their life.

[0043] “Attenuation” means reducing the virulence of a pathogen. In the present invention “attenuation” is synonymous with “avirulent”. In the present invention, an attenuated bacterium is one in which the virulence has been reduced so that it does not cause clinical signs of an *A. suis* infection but is capable of inducing an immune response in the target subject, but may also mean that the clinical signs are reduced in incidence or severity in subjects infected with the attenuated *A. suis* in comparison with a “control group” of subjects infected with non-attenuated *A. suis* and not receiving the attenuated bacterium. In this context, the term “reduce/reduced” means a reduction of at least 10%, preferably 25%, even more preferably 50%, still more

preferably 60%, even more preferably 70%, still more preferably 80%, even more preferably 90% and most preferably of 100% as compared to the control group as defined above.

[0044] An “effective amount” for purposes of the present invention, means an amount of an immunogenic composition capable of inducing an immune response that reduces the incidence of or lessens the severity of *A. suis* infection in a subject. An effective amount refers to colony forming units (CFU) per dose or logs/dose.

[0045] “Long-lasting protection” shall refer to “improved efficacy” that persists for at least 3 weeks, but more preferably at least 3 months, still more preferably at least 6 months. It is most preferred that the long lasting protection shall persist until the average age at which porcine animals are marketed for meat.

[0046] Herein, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular. In this application, the use of “or” means “and/or” unless stated otherwise.

[0047] Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0048] The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

[0049] FIG. 1. Daily average temperatures among treatment groups from day 0 to day 41 of the study.

DETAILED DESCRIPTION

[0050] The invention provides methods and compositions useful for inhibiting, treating, protecting, or preventing infection by *Actinobacillus suis*. Herein are described the effectiveness of *A. suis* prototype vaccines against a heterologous challenge of various serotypes or isolates of *A. suis*. These vaccines were demonstrated to usefully stimulate immunogenic reactions in treated animals. Some vaccines stimulated reactions sufficient to be protective against *A. suis*.

[0051] The *A. suis* vaccine prototypes were comprised of different, culture fractions (e.g. whole cell, supernatant, or outer membrane protein (omp)) and a Ingelvac® APP-ALC live vaccine against *A. pleuropneumoniae* (APP). The whole cell vaccine was made from the pelleted material that resulted from a centrifugal spin of a cell culture. The cultural supernatant was made from the supernatant that resulted from the centrifugal spin, and may have included exotoxins, endotoxins, secreted or sloughed-off omps, and other cellular components that were not removed during the spin (see Example 1). The Ingelvac® APP-ALC live vaccine was included because APP encodes Apx I and II toxins that are very similar to *A. suis* toxins. It was hypothesized that the Ingelvac® APP-ALC vaccine may provide some cross protection against *A. suis*.

[0052] This efficacy study consisted of six treatment groups of weaned 3 week-old $\pm$ 7 days of age pigs. Treatment group 1 (15 pigs) received a 1 x 2mL intramuscular (IM) dose of a formalin-inactivated, whole cell fraction of *A. suis* on days 0 and 21 of the study, respectively. Treatment group 2 (15 pigs) received a 1 x 2mL IM dose of a formalin-inactivated *A. suis* culture supernatant fraction on days 0 and 21 of the study, respectively. Treatment group 3 (15 pigs) received a 1 x 2mL IM dose of an *A. suis* outer membrane protein (omp) cellular fraction on days 0 and 21 respectively. Treatment group 4 (15 pigs) received a 1 x 2mL IM dose of Ingelvac® APP-ALC on days 0 and 21 respectively. Treatment group 5 (15 pigs) designated as “challenge controls” received a 1 x 2mL IM dose of placebo on days 0 and 21 respectively. Treatment group 6 (10 pigs) were designated “strict controls” and did not receive vaccine or placebo treatment.

[0053] On the day of challenge (day 35) the pigs in groups 1-5 received a 6mL dose/pig, 3mL applied to each nostril, of *A. suis* strain ISU-8594 via intranasal (IN) inoculation containing $1 \times 10^{9.0}$ logs/dose. General observations were monitored throughout the study, days 0 to 41, to

record the overall health of the pigs, as well as, injection site reactivity and rectal temperatures. On Day 41 of the study, all animals were euthanized, and all sections of the lung were scored for determining the percentage of lung pathology. Fresh and fixed (lungs only) samples of the lung (3 lobes with lesions, if present), liver, kidney, spleen, tonsil, and swabs of nasal turbinates, trachea, bronchi, meninges, and heart blood were collected from each animal and were cultured for bacterial isolation and histopathology (lungs only).

[0054] The *A. suis* fractions and placebo groups were adjuvanted with Emulsigen® -D, and a few adverse injection site reactions were noted in these groups. One pig in the supernatant group (group 2) was noted with a mild reaction at the injection site during the first vaccination event. Overall, the Emulsigen® -D in combination with the test articles did not produce any significant injection site reactions in the supernatant and omp groups. However, the whole cell group did have a few animals with abscesses present at the time of necropsy, which could have been due to the test article formulation that consisted of a concentrated whole cell stock. The administration of these vaccine prototypes (i.e. whole cell, supernatant, and omp) appeared to be well-tolerated during the time of administration. The APP-ALC group had some injection site swelling, which is consistent with the product literature that notes swelling in 11% of the vaccinated animals.

[0055] The general overall health of the pigs in each of the treatment groups was good during the pre-challenge period. Only one pig, from treatment group 4, was removed from the study during this period. This pig was removed due to a bacterial infection believed not to be associated with administration of the APP vaccine. Further observations showed one pig in the challenge control group was lame on its right leg from day 7 to day 24 of the study. This pig skewed the clinical observation results during the pre-challenge period and could have been considered an outlier and removed from the study data analysis. Also, one pig showed poor body condition in the whole cell group and died after a few days. None of the pigs in the pre-vaccination period showed signs of respiratory difficulties.

[0056] Assessment of the primary and secondary parameters were validated by significant ($p < 0.05$) increases in lesion development that occurred in the challenge control group (treatment group 5) compared to the strict control group (treatment group 6). Results of this assessment validated the virulent pure culture *A. suis* challenge model in pigs. Further comparisons were

made against the challenge control and not to the strict control group when comparing groups 1-4.

[0057] During the six day challenge period one pig died of acute death due to *A. suis* infection one day post-challenge in the whole cell group. Based on previous challenge studies, the intranasal route and the potency were appropriate to cause significant lesion development in the test animals and apparent fatal sudden death, as was the case for this one pig in the whole cell group.

[0058] Based on average lung lesion scores and percent with a lesion, gross lung lesion scores appeared to be most severe in the challenge group. Statistical analyses showed no statistical differences ($p < 0.05$) in average lung lesion scores or percent with a lesion present when comparing groups 1 through 5. Numerically the challenge controls received overall the highest average gross lung lesion scores followed by the whole cell and omp groups, which also received relatively high scores. Lesion development was lower in the supernatant and APP groups, which received lower numerical scores compared to the other groups. All groups 1-5 had at least 50% of the pigs with a gross lesion score, and the challenge and omp groups had as much as 80% of the pigs with lesion development.

[0059] Furthermore, microscopic lung lesion analysis was based on the severity of the hallmark traits of an *A. suis* infection, i.e. bronchopneumonia, necrosis, and pleuritis. Bronchopneumonia and necrosis were more severe in the challenge control and omp groups where microscopic lesion scores were lower than in the supernatant and APP groups. The APP group showed the best signs of protection against an *A. suis* infection based on the microscopic lesion data with statistical differences ($p < 0.05$) found between group 3 (omp) for necrosis and pleuritis and the group 5 (challenge) for pleuritis. Presence of bacterial colonies in all of the groups ranged from about 20% to about 46.7% with the lowest percent colonization occurring in the whole cell and APP (20.0%) groups.

[0060] The secondary parameters monitored were used to support the primary efficacy parameters (i.e., gross and microscopic (IHC) lesions) responses due to vaccine and challenge for each treatment group. Clinical observations made during the challenge period indicated that the challenge controls had an overall higher score when compared to the vaccine treatment groups 1-4, showing that the challenge controls responded to the challenge. The supernatant group did

not seem to be as clinically affected. However, all groups did have some pigs that did have some respiratory issues with a cough, body condition, or behavior.

[0061] The treated groups saw an increase in average rectal temperatures, above 104 °F, four hours after the first vaccination event. Temperatures for the APP and omp groups spiked at or above 104.9 °F, which was the cut-off of pyrexia following four hours post vaccination, and lasted about twenty-four hours for the omp group. Temperatures in the groups were returning back to normal by day 1 or 3. For the booster event, temperatures were only taken on day 28 and not at 4hrs or on days 1, 3, and 5 post-vaccination as with the first vaccination. During the booster period, on day 28 the APP group was statistically different ($p < 0.05$) when compared to the whole cell and supernatant groups. During the challenge period, the challenge controls had an overall higher rectal temperature at both the beginning and end of the period. The whole cell group had the highest rectal temperatures during days 38 and 39. The challenge control group had the highest overall percent animals febrile (10/15) followed by the whole cell (8/15), OMP (5/15), supernatant (2/15), and APP (1/15) groups, respectively.

[0062] Bacterial isolation was highest in the lung and tonsil samples. The highest recovery of *A. suis* occurred in the challenge control group. The strict control group was negative for *A. suis* except in nasal and tonsil samples, which had 3 out of 10 and 1 out of 10 respectively. These results were recorded as a positive and not verified by BCA or other means. Possible reasons for these results could have been an inadvertent misread of the agar plate or a cross-contamination event during the processing of the swabs. Furthermore, three parameters had very low recovery rates of *A. suis* which were the spleen, meninges, and heart blood, and thus, were not included in the analysis. Overall the rate of septicemia was low due to low recovery of *A. suis* in the visceral organs and heart blood. There was also evidence that this challenge crossed the blood brain barrier in three of the animals that were severely infected. Other detected bacteria were *Bordetella*, alpha and beta streptococci.

[0063] Serology testing using a western blot procedure was performed to test for reactivity against the test article that was used to vaccinate the treatment groups. The western blots showed detectible seroconversion to the whole cell, supernatant, and omp fractions at 1:100 dilution. The APP fraction had the best reactivity and was detectable at a dilution of 1:1000,

confirming that the host recognized some part of the fractions used for vaccination of each treatment group.

[0064] Overall the best protection occurred in the pigs vaccinated with the APP and supernatant prototype vaccines. Comparatively, neither the whole cell nor omp vaccines or LPS derived antigens provided much protection from *A. suis* challenge. Details of the challenge study are provided in the Examples below.

[0065] Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as is commonly understood by one of skill in the art to which this invention belongs at the time of filing. If specifically defined, then the definition provided herein takes precedent over any dictionary or extrinsic definition. Further, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities, and plural terms shall include the singular. Herein, the use of "or" means "and/or" unless stated otherwise. All patents and publications referred to herein are incorporated by reference.

EXAMPLES

[0066] The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

EXAMPLE 1: Prototype Vaccines and Challenge Treatment

A. Preparation of Vaccine Prototypes

[0067] Growth of *A. suis* (KSU-1) cultures: One milliliter of *A. suis* (103007-1KSU) lot # 201-9,10,11 was used to inoculate 150 ml of BHI media (lot # 195-121) in a 250 ml spinner. The inoculated media was placed at 37°C at about 72 rpm for six hours. Afterwards, about 2.5 ml of the inoculated media was added to about 2500 ml fresh BHI media. This step was repeated until four batches of 2500 ml were prepared. The four batches were incubated at 37°C overnight at about 72 rpm. Two batches were used to isolate whole cell OMP, and supernatant fractions,

one batch was used to prepare a concentrated whole cell fraction, and the final batch was used for LPS extraction.

[0068] Harvesting of cell fractions: Optical densities of batches were read fifteen hours after inoculation. Optical densities ranged from 0.775 to 0.815 at 600 nm. BAPs were streaked from each culture to verify that the cultures were pure for *A. suis*.

[0069] To collect the OMP and supernatant fractions, two culture batches were transferred to 500 ml centrifuge tubes, placed in a JA-10 rotor, and spun at 10K for 10 minutes. The supernatants were decanted, and the pellets were transferred into sterile 250 mL Corning centrifuge tubes. The pellets were centrifuged at about 5000 rpm in a JA-10 rotor for 10 minutes, and the remaining supernatants were removed. The pellets were pooled and placed at -80°C until sarcosyl extraction (see below). The decanted supernatants were pooled, and filtered through 0.45 µm filters (Nalgene 0.45 SFCA) into sterile 2 L Pyrex bottles. The filtered supernatant was aliquoted into 2 x 850 cm RBs, 81 x 5 mL vials, and 4 x 250 mL Nalgene bottles. Filtered supernatant was stored at -20°C until use.

[0070] To collect the concentrated (10x) whole cell pellet fraction, one culture batch was harvested as above, but the pellets were resuspended in 300 mL TSP buffer. The solution was mixed well and aliquoted into 50 x 2 mL vials and 4 x 50 mL vaccine bottles. Resuspended whole cell pellets were stored at -80°C until use.

[0071] To prepare the LPS fraction, *A. suis* culture was harvested as described above. The pellets were resuspended in 1x PBS buffer and re-centrifuged at 10K rpm for ten minutes. Supernatants were decanted, and the pellets were resuspended in 1 L of 1x PBS buffer. An optical density reading at about 600 nm was 1.003, which is within the expected range of 0.8-1.200 for LPS extraction. The LPS fraction was aliquoted into 3 x 250 mL Nalgene bottles and stored at -80°C until use. The remaining volume of LPS fraction was stored at 4°C for LPS extraction.

[0072] KSU-1 Whole cell formalin-inactivated vaccine: The optical density (OD) of the cell culture measured at 600 nanometer wavelength was at 0.775 at the time of harvest. In previous studies, this optical density has correlated to approximately 8.7 logs/mL based on the logarithmic estimate curve to determine logs/mL based on colony forming units (cfu). The

whole cell fraction was concentrated 10x and frozen. The frozen stock was then formalin-inactivated, and diluted (54mLs of culture into 26 mLs of 1x phosphate buffered saline (pbs), to 67.5% of the total fraction. The inactivated, diluted vaccine stock was then stored at 4°C.

[0073] The whole cell formalin-inactivated vaccine stock was removed from 4°C for formulation. Working in a bio-safety hood 80mLs of the material was aliquoted out into a sterile 100mL Pyrex bottle containing a magnetic stir bar. The bottle was placed on a stir plate, and with continuous stirring, 20 mLs (20% v/v) of the adjuvant (Emulsigen® -D) was added over 1 minute. The adjuvanted prototype was then stirred for an additional 10 minutes. The material was transferred to a 100 mL vaccine bottle where it was capped and placed at 4°C. Lot nos. for the whole cell formalin-inactivated vaccine prototype were N201-110-WC-073108 (day 7) and N201-122-WC-082108 (day 21).

[0074] Sterility was verified by no growth on 5% Sheep Blood Agar Plate (BAP) after 28hrs and 30hrs of 37°C aerobic incubation for day 0 and day 21 respectively. Vaccine prototype material was kept on ice prior to administration to the test animals and during the entire vaccine administration procedure.

[0075] KSU-1 Supernatant formalin-inactivated vaccine: The supernatant prototype was formulated from the 10x concentration step of the whole cell fraction preparation (see above) by collecting the supernatant and filtering it through a 0.45 micro filter. The resulting filtered supernatant was frozen. This supernatant was then formalin inactivated and stored at 4°C until formulated. The formulation step was as for the whole cell formalin-inactivated vaccine. Lot nos. for the supernatant formalin-inactivated vaccine prototype were N201-110-Supe-073108 (day 7) and N201-122-Supe-082108 (day 21).

[0076] Sterility was verified, and the vaccine prototype material was maintained prior to administration to the test animals and during the entire vaccine administration procedure as previously described.

[0077] KSU-1 OMP fraction vaccine: The OMP fraction was produced from pellets prepared from a KSU-1 culture (isolate BI-103007-1KSU) and stored at -80°C by using the following OMP sarcosyl extraction procedure. Pellets were thawed on the benchtop. The pellets were resuspended (22.5g wet weight) with 130 mL of 10 mM HEPES balanced salt solution and

aliquoted into four 50 mL conical Falcon tubes (40 mL/tube). (A 1 mL resuspended pellet sample was retained for protein quantification and analysis.) The resuspended pellets were placed in an ice bath and sonicated for 1 minute using (Large/Microtip) probe (50 mL aliquots) with a sonication pulse setting of 1 pulse/sec. The sonication was repeated three times. (A 1 mL post-sonication sample was retained.) The sonicated pellets were centrifuged at 17,000 x g for 20 min in 50 mL tubes. Afterwards, the supernatants were decanted and pooled into a separate container. Pellets were stored at 4°C until after a bicinchoninic acid assay (BCA) and then discarded.

[0078] The pooled supernatants were run in an ultra centrifuge, ~0.0128 kg/tube, at a setting of 124,000 x g (30,000 rpm), 1:10 hours, 4°C, with maximum acceleration, and no brake. Supernatants were decanted, pooled with the earlier supernatant, and stored at 4°C. About 1 mL of 10mM HEPES was added on top of each pellet in the ultra centrifuge tubes, and the pellets were incubated overnight at 4°C to loosen the pellets from the tubes. Another 2 mL of 10mM HEPES was added to each tube to resuspend the pellets. Each resuspended pellet solution was q.s. to 6 mL (total vol.) with 10 mM HEPES, and 6 mL of 2% Sarcosyl was added to each. Solutions were incubated for 30 min at room temperature. Afterwards, the tubes were balanced in ultra centrifuge buckets (~0.0128 kg/tube) using 2% sarcosyl and run in an ultra centrifuge at 124,000 x g, 1:10 hour, 4°C, with maximum acceleration, and no brake. The supernatants were collected into a vessel, and 1 mL of 10mM HEPES was added to each pellet. The OMP pellets were stored at 4°C for 1 hour prior to measuring protein concentration or visualization of proteins.

[0079] Duplicate samples (1:10 dilution) were run on either a reduced MOPS 10-12% Bis-Tris SDS PAGE gel or a NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel to visualize protein bands. Total protein concentrations of the final OMP stock were determined using the BCA and were determined prior to formulation with adjuvant. Based on the values obtained by BCA, the total mass of protein contained in the OMP extraction stock was 1.75 µg/mL. Based on this value, the potency of the formulated vaccine OMP prototype was 250 µg/dose. The resuspended, extracted OMP fraction was aliquoted into 200 µl samples, labelled, and frozen at -70°C.

[0080] Five vials containing 0.5 mLs of the extracted OMP fraction were removed from -70°C. These vials were thawed at room temperature. Working in a bio-safety hood 23.25 mLs

of 1x phosphate buffered saline (pbs) and 2.35 mLs of the OMP material were aliquoted into a sterile 100 mL Pyrex bottle containing a magnetic stir bar. The bottle was placed on a stir plate, and with continuous stirring, 6.4 mLs (20% v/v) of the adjuvant (Emulsigen® -D) were added over 1 minute. The adjuvanted OMP prototype vaccine was then stirred for an additional 10 minutes. The OMP prototype vaccine was transferred to a 60 mL vaccine bottle where it was capped and placed at 4°C. Lot nos. for the OMP vaccine prototype were N201-110-OMP-073108 (day 7) and N201-122-OMP-082108 (day 21).

[0081] Sterility was verified, and the vaccine prototype material was maintained prior to administration to the test animals and during the entire vaccine administration procedure as previously described.

[0082] Ingelvac® APP-ALC vaccine: One bottle of APP-ALC was removed from -70°C and thawed in luke warm water. Once thawed, a sample was removed using a 16 gauge sterile needle and placed in a vaccine bottle for potency testing. The vaccine bottle was placed at 4°C. Titrations of Ingelvac APP-ALC were performed on Days 0 and 21 for determining colony forming units (CFU) per dose. The samples were serially diluted out 10-fold and plated onto Mueller Hinton Chocolate Agar plates. Three reps were performed and allowed to incubate at 37°C for 24hrs before determining the CFU. Colony forming units were respectively at Day 0: 9.99 logs/dose and at Day 21: 10.2 logs/dose. Lot nos. for the Ingelvac® APP-ALC vaccine were N201-110-APP-073108 (day 0) and N201-122-APP-082108 (day 21).

[0083] Vaccine prototype material was maintained prior to administration to the test animals and during the entire vaccine administration procedure as previously described.

[0084] Placebo vaccine Working in a bio-safety hood, 60 mLs of 1x phosphate buffered saline (pbs) was aliquoted out into a sterile 100 mL Pyrex bottle containing a magnetic stir bar. The bottle was placed on a stir plate, and with continuous stirring, 15 mLs (20% v/v) of the adjuvant (Emulsigen® -D) was added over 1 minute. The adjuvanted prototype was then stirred for an additional 10 minutes. The material was transferred to 100 mL vaccine bottle where it was capped and placed at 4°C. The Lot no. for the placebo vaccine was N 201-109.

[0085] Sterility was verified, and the placebo prototype material was maintained prior to administration to the test animals and during the entire vaccine administration procedure as previously described.

B. Preparation of Challenge Treatment

5 [0086] The challenge strain used was *A. suis* Isolate ISU-8594 p5. The challenge material was produced by inoculating a 1 liter Belco spinner flask containing 800mLs of Brain Heart Infusion Porcine (BHI-Porcine) media with 5mLs of ISU-8594 p4. The spinner was placed into a 37° C incubator at ~100 rpm. The culture was grown to an optical density (OD600) of 0.109--about 5 hrs and 30 minutes post inoculation. The culture was then transferred to 6 x 100
10 mL vaccine bottles containing 100 mLs total volume that were stoppered and capped. Five of the bottles were placed into a cooler containing ice packs and one bottle which served to represent the other five bottles for titrations was placed in another cooler containing ice packs. The titer of the challenge material was determined by CFU count generated from plating serial 10-fold dilutions onto 5% sheep blood agar plates. The challenge titer obtained was 1.69×10^8
15 cfu(s)/mL or 9.0 logs/6 mL dose. The Lot no. for the challenge material was N201-138.

[0087] Challenge material was kept on ice prior to administration to the test animals and during the entire challenge procedure.

EXAMPLE 2: Vaccination of Pigs

[0088] A mixture of female and neutered male porcine animals of a commercial cross and
20 3 weeks $\pm$ 7 days of age were obtained from Wilson Prairie View Farms. Animals were healthy with no evidence of clinical respiratory disease and negative for bacterial respiratory pathogens such as *A. pleuropneumonia*, *H. parasuis*, *S. suis*, *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *E. rhusiopathiae* and *A. suis*. While allowance was made for animals to be excluded from the study if and when health problems unrelated to vaccination or challenge became apparent, no animals
25 were removed.

[0089] At the time of arrival to the test site, all animals received a 1 mL shot of Excenel® (a short acting antibiotic). The animals were housed at the test site until the study was terminated. The animals were ear-tagged upon arrival, and housed appropriately for species, age, size, and condition. Challenge and strict control pigs were housed together in separate pens

26

in a separate building away from the other treatment groups. At the time of challenge, the challenge controls were moved into the same building as the treated groups. All treatment groups were housed in separate pens throughout the study. The animals were provided with a ration that was free of antibiotics and appropriate for species, age, size, and condition of the animals. The animals were in good health and nutritional status at initiation of the study. A health examination was conducted by a clinical veterinarian according to generally accepted veterinary practice on each animal prior to inclusion in the study.

[0090] A computer random number generator (Microsoft Office Excel) was used to assign each animal a unique random number. The random number was then sorted into ascending order. Assignments occurred by allocating the experimental units across treatment groups starting with the lowest block of random numbers and assigning them to treatment groups 1 through 6. Increasing in random number, the next block of experimental units were then assigned to treatment groups and so on until all animals were assigned to a treatment group.

[0091] This efficacy study consisted of 6 treatment groups of weaned 3 week-old $\pm$ 7 days of age pigs. Treatment group 1 (15 pigs) received a 1 x 2mL intramuscular (IM) dose of formalin-inactivated whole cell *A. suis* on days 0 and 21 of the study, respectively. Treatment group 2 (15 pigs) received a 1 x 2 mL IM dose of formalin-inactivated *A. suis* culture supernatant on days 0 and 21 of the study, respectively. Treatment group 3 (15 pigs) received a 1 x 2mL IM dose of *A. suis* outer membrane protein (omp) on days 0 and 21 respectively. Treatment group 4 (15 pigs) received a 1 x 2mL IM dose of Ingelvac® APP-ALC on days 0 and 21 respectively. Treatment group 5 (15 pigs) designated as "challenge controls" received a 1 x 2mL dose of placebo by IM route of administration on days 0 and 21 respectively. Treatment group 6 (10 pigs) were designated "strict controls" and did not receive vaccine or placebo treatment. All groups were observed for 41 days.

[0092] On Day 35 of the study, Groups 1-5 received a 6mL dose/pig (3mL applied to each nostril per pig) of *A. suis* strain ISU-8594 via intranasal (IN) inoculation containing $1 \times 10^{9.0}$ logs/dose. Group 6, the "strict control" group, did not receive any treatment or challenge.

[0093] Rectal temperatures were collected from all animals prior to treatment on Day 0; 4 hours post-inoculation; and on 1 day(s) post inoculation (DPI), 3, 5, 7, 14, 21, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 and 41 DPI.

[0094] Venous whole blood (6-10 mL) was collected from each animal prior to treatment on Day 0 and weekly (Days 7, 14, 21, 28, 34 and 41) for future serological testing.

[0095] Injection sites were examined prior to treatment and at 4, 24, 48, and 72 hours post inoculation in all pigs of Groups 1-5. The injection sites were examined for swelling, hardness, and size. The data were documented. The following scoring system was used for injection site observations: swelling (0=none, 1=swelling present), appearance (0=normal, 1=hard, 2=soft, 3=abscessed, 4=draining), size (0=normal, for all others, the length by width dimensions in centimeters (i.e. length x width x diameter) were recorded).

[0096] Clinical observations were performed daily from Day 0 to Day 41 for any signs of respiratory distress including labored breathing, sneezing, coughing, altered respiratory movements, anorexia, lameness, swelling of joints, dehydration, ability to stand, paddling, moribund for 2 or more consecutive days, or death.

[0097] Animals that had severe clinical symptoms during the study were humanely euthanized and necropsied to determine the cause of death. On Day 41 of the study, all animals were euthanized and all sections of the lung were scored for determining the percentage of lung pathology. Fresh and fixed (lungs only) samples of the lung (3 lobes with lesions, if present), liver, kidney, spleen, tonsil, and swabs of nasal turbinates, trachea, bronchi, meninges, and heart blood were collected from each animal and cultured for bacterial isolation and histopathology (lungs only).

EXAMPLE 3: Evaluating Efficacy of Prototype Vaccines

A. Statistical Analysis

[0098] Statistical Analysis was performed using SAS version 9.1.3 for data management and analysis. Summary statistics including mean, standard deviation, standard error, median, range, 95% confidence intervals, coefficient of variation, and frequency distributions were generated for all data where appropriate. Analyses included all pairwise comparisons between all piglet treatment groups. All tests for significance were two-tailed with a $p \leq 0.05$ level to determine differences between treatment groups.

[0099] Primary Efficacy Parameters were non-normally distributed microscopic lesion scores and gross lesion scores that were compared by Wilcoxon Two-Sample Test and Fisher's

23

Exact Test. Secondary Efficacy Parameters were (1) clinical signs that were compared using the Wilcoxon Two-Sample Test; (2) pyrexia that was compared using the Fisher's Exact Test and ANOVA; and (3) bacterial isolation was compared using the Fisher's Exact Test.

B. Moribund Animals

5 [0100] Two animals were removed from the study after study initiation. Animal ID #31 (treatment group 4) was found dead on day 11 of the study. Gross examination showed that this pig was in poor condition and thin. Its lungs had red and purple discoloration, and its abdomen had purulent exudates with fibrous peritonitis. The presumptive diagnosis was HPS or a streptococcal infection. Bacteriology cultures were performed on the fresh tissue and swab
10 samples using standard techniques accepted in the field. The recovered bacterial colonies were analyzed, and the analysis found that the pig was infected with *Arcanobacterium pyrogenes*, *Aeromonas hydrophilia*, and *Citrobacter freundii*. Histopathology on fixed lung samples indicated no evidence of pneumonia, necrosis, pleuritis, or bacterial colonies present.

[0101] Animal ID #32 (treatment group 1) was found dead on day 36 one day
15 post-challenge. Gross examination showed that this pig's lungs had severe fibrinous and fluid in the chest cavity. Its lungs had consolidation and large hemorrhagic areas. The presumptive diagnosis was acute death due to *A. suis* challenge. Bacteriology cultures were performed on the fresh tissue and swab samples. *Actinobacillus suis* was recovered in all tissue and swab samples except the spleen and trachea. Histopathology on fixed lung samples indicated evidence of
20 severe pneumonia, necrosis, pleuritis, and bacterial colonies present.

C. General Observations

[0102] Animals were observed daily from vaccination/placebo administration to challenge (days 0 through 35) for adverse events attributed to treatment with test/control articles or other non-treatment derived health abnormalities.

25 [0103] General health observations for pigs in challenge control and strict control groups (groups 5 and 6) were as follows: Pig #71 (challenge control) started showing signs of lameness on its right front on day 7 and persisted to day 24 before symptoms ceased. The rest of the pigs were normal for this period of observation.

[0104] General health observations for pigs in vaccine treatment groups (groups 1-4) were
30 as follows: Pig ID #51 (whole cell, group 1) showed poor body condition on day 1 and persisted

for three days. In treatment group 4 (APP, group 4) Pig ID #31 was removed from the study as stated above. The remaining pigs in groups 1 through 4 had normal health observations.

[0105] Injection site reactions for IM-vaccinated treatment groups 1, 2, 3 and 4 were as follows: Pigs #35 (supernatant, group 2) and #10 (APP, group 4) had swelling of a 1 x 1 cm² area recorded on days 1, 2, and 3 of the study. No injection site evaluations were recorded for the day 21 vaccination event. Clinical observations revealed swelling in the neck in pig #10 (APP, group 4) on days 4 and 5, pig #20 (APP, group 4) on days 26 and 29, pig #40 (APP, group 4) on days 19 through 35, pig #41 (APP, group 4) on days 26 through 35, and pig #46 (APP, group 4) on days 14 through 35. All remaining animals had a normal, healthy disposition during this observation period.

[0106] At time of necropsy, pigs #69 and #75 both in treatment group 1 (whole cell) were recorded as having neck abscesses at the site of injections. No other adverse injection site recordings were reported during necropsy.

D. Primary Efficacy Parameters

1. Gross lesions

[0107] At necropsy (day 41 of the study), the lungs were removed from each pig and examined for gross lesions. Individual lobes were scored for percent involvement, and a total score was assigned to each individual pig. Table 1 shows the average lung lesion scores for each treatment group and the number of animals with a positive score per group.

Table 1. Average gross lung lesion scores by treatment group and number of animals with a positive gross score within groups.

Group	Treatment	N	Mean	Percent with Lesion Present
1	Whole Cell	15	26.73	66.67% (10/15)
2	Supernatant	15	12.68	60.00% (9/15)
3	OMP	15	21.69	80.00% (12/15)
4	APP	14	16.25	50.00% (7/14)
5	Challenge	15	28.67 ^a	86.67 ^a (13/15)

20

Group	Treatment	N	Mean	Percent with Lesion Present
6	Strict	10	0.00 ^a	0.00 ^a (0/10)

^aGroups 5 vs. 6 comparisons are statistically significant different ($p<0.05$, Wilcoxon Two Sample Test and Fishers Exact Test where appropriate).

[0108] Using the Wilcoxon Two-Sample Test and Fishers Exact Test on the number of positive lesions per group, statistical analyses were run to compare the means among treatment groups 5 vs. 6 and groups 1-4 vs. 5 on average gross lesion scores. Treatment group 6 (strict controls) was negative for gross lesion development (0) and the number of percent positive scores (0%). Evaluation of groups 1-5 for average lung lesion scores and percent with a lesion ranged from 12.68 to 28.67 out of a possible 100 and from 50.00% to 86.67% respectively.

[0109] Treatment group 5 (challenge), received the highest average gross lung lesion score (28.67) and percent with a lung lesion score (86.67%) compared to the other treatment groups. Treatment group 5 was significantly different ($p\leq0.05$) from treatment group 6, when comparing average gross lung lesion scores and percent positive with a lesion. Treatment group 2 (supernatant) received the lowest lesion score (12.68), but had a percent lesion score that was the second lowest (60.00%) compared to treatment group 4 (APP) which had the lowest percent lesion score (50.00%). Comparisons of groups 4 vs. 5 for percent with a lung lesion score was almost statistically different ($p=0.0502$). Furthermore, treatment group comparisons for gross lesion score of groups 4 vs. 5 and groups 2 vs. 5 were not statistically different, ($p\leq0.0840$) and ($p\leq0.0685$) respectively. Numerically, treatment group 1 (whole cell) had the second highest average lung lesion score of 26.73 followed by the treatment group 3 (omp) with a score of 21.69. Treatment group 3 (omp) had the second highest number of percent lesions present with 80.00% followed by treatment group 1 (whole cell) with 66.67%.

2. Microscopic lesions

[0110] Lung sections were collected, fixed, and submitted to the Iowa State Veterinary Diagnostic Laboratory for evaluation of non-specific microscopic lesion development (i.e. pneumonia, necrosis, and pleuritis) and presence of bacterial colonies. Scores were based on a nominal scale of 1 to 3 with 1 being mild, 2 being moderate, and 3 being severe. Groups were compared based on average lesion severity and presence of bacterial colonies (bugs) present within each tissue, and the frequency of positives for each group are shown in Table 2.

Table 2. Average microscopic lesion scores by treatment group and number of animals with a positive microscopic score within groups.

Grp	Treat- ment	N	Bron- cho Pneu- monia lesion	Necro- sis	Pleuri- tis	Broncho Pneumo- nia	Necrosis	Pleuritis	Bacterial Colonies
1	Whole Cell	15	1.07	0.67	1.67	53.33% (8/15)	40.00% (6/15)	60.00% (9/15)	20.00% (3/15)
2	Super- natant	15	0.87	0.8	1.13	46.67% (7/15)	40.00% (6/15)	46.67% (7/15)	33.33% (5/15)
3	OMP	15	1.60	1.47 ^c	1.60 ^c	66.67% (10/15)	60.00% (9/15)	66.67% (10/15)	46.67% (7/15)
4	APP	15	0.93	0.47 ^c	0.67 ^{b,c}	46.67% (7/15)	26.67% (4/15)	46.67% (7/15)	20.00% (3/15)
5	Challenge	15	1.27 ^a	0.93 ^a	1.93 ^{a,b}	66.67% ^a (10/15)	46.67% ^a (7/15)	66.67% ^a (10/15)	40.00% (6/15)
6	Strict Control	10	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00% ^a (0/10)	0.00% ^a (0/10)	0.00% ^a (0/10)	0.00% (0/10)

^aGroups 5 vs. 6 comparisons are statistically significant different (p<0.05, Wilcoxon Two Sample Test and Fishers Exact Test where appropriate).

5 ^bGroups 4 vs. 5 comparisons are statistically significant different (p<0.05, Wilcoxon Two Sample Test and Fishers Exact Test where appropriate).

^cGroups 3 vs. 4 comparisons are statistically significant different (p<0.05, Wilcoxon Two Sample Test and Fishers Exact Test where appropriate).

[0111] Using the Wilcoxon Two-Sample Test, statistical analyses were run to compare the
10 means among treatment groups on average microscopic lung lesions scores. The Fisher Exact
Test was also performed on the number of positive scores for the percent positive animals per
group for each parameter. Statistical differences (p≤0.05) were found when comparing treatment
groups 5 (challenge) vs. 6 (strict control) for bronchopneumonia, necrosis, and pleuritis lesion
scores, and percent positive. The scores were zero in all parameters for treatment group 6 (strict
15 controls) (Table 2).

[0112] The highest bronchopneumonia lesion scores (1.60) were found in treatment group
3 (omp) followed by (1.27) treatment group 5 (challenge). The lowest received score (0.87) was
in group 2 (supernatant) followed by (0.93) group 4 (APP). Scores for bronchopneumonia
ranged from 0.87 to 1.60. Comparing necrosis lesion scores for treatment groups 1-5 ranged
20 from 0.47 found in group 4 (APP) to 1.47 found in group 3 (omp). Statistical differences
(p≤0.05) were found when comparing treatment groups 3 vs. 4 for necrosis. Further

comparisons of treatment groups 1-5 for the pleuritis parameter revealed lesion scores that ranged from 0.67 in group 4 (App) to 1.93 in group 5 (challenge). Statistical differences ($p \leq 0.05$) were found when comparing treatment groups 3 vs. 4 and 4 vs. 5 for pleuritis. Comparison of treatment groups 1 vs. 4 was very close to being statistically different ($p = 0.0544$).

5 [0113] Numerical comparisons of percent positives showed that when compared to treatment groups 1, 2, 4, and 5 treatment group 3 (omp) received the highest scores for bronchopneumonia, necrosis, pleuritis, and bacterial colonies of 66.67%, 60.00%, 66.67%, and 46.67% respectively. The highest scores were shared with treatment group 5 (challenge) for bronchopneumonia and pleuritis parameters. Furthermore, comparisons of percent positives
10 showed that when compared to the treatment groups 1, 2, 3, and 5 the lowest scores were in treatment group 4 (APP) for bronchopneumonia, necrosis, pleuritis, and bacterial colonies of 46.67%, 26.67%, 46.67%, and 20.00% respectively. Treatment group 2 (supernatant) had the same lowest scores in bronchopneumonia and pleuritis parameters as group 4, and group 2 and group 1 (whole cell) had the same frequency of bacterial colonies present. No statistical
15 differences were found for percent positives in the parameters listed in Table 2.

E. Secondary Efficacy Parameters

[0114] Secondary parameters were used to support primary efficacy parameters in this study. Statistical analyses were performed on the following secondary parameters.

1. Clinical observations

20 [0115] Observations for clinical signs were made from the day of vaccination throughout the study (days 0 through 41). Four main parameters were scored: body condition (gauntness) on a scale of 1 to 3 with 1 being normal and 3 being dead; behavior (depression); locomotion; and respiration, each on a scale of 1 to 4 with 1 being normal and 4 being dead. An average clinical score was used from all 4 parameters by which a normal, healthy animal received a score
25 of 1 while a severely affected animal (dead) could have a maximum score of 3.75. Table 3 shows the average scores by treatment group. Using the Wilcoxon Two-Sample Test, statistical analysis was only performed to compare groups 1 through 5 on average clinical observation scores.

Table 3. Daily average clinical scores for pre-challenge and post-challenge periods within each treatment group.

Grp	Treatment	Pre-Challenge Days (0-35)	Post Challenge						Post Challenge Days (36-41)
			Day 36	Day 37	Day 38	Day 39	Day 40	Day 41	
1	Whole Cell	1.001 ^{a,b}	1.25 ^b	1.04	1.00	1.02	1.04	1.07	1.068 ^a
2	Supernatant	1.000 ^{a,b}	1.03	1.03	1.00	1.00 ^a	1.00 ^a	1.03 ^a	1.017 ^a
3	OMP	1.000 ^{a,b}	1.07 ^b	1.03	1.05	1.00 ^a	1.05	1.13	1.058 ^a
4	APP	1.011 ^b	1.00 ^{a,b}	1.02	1.00	1.02	1.04	1.14	1.036 ^a
5	Challenge	1.013 ^a	1.12 ^a	1.08	1.12	1.28 ^a	1.14 ^a	1.14 ^a	1.148 ^a
*6	Strict	1.000	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.000

* Treatment group 6 was not included in the statistical analysis.

^aGroups 1-4 vs. 5 comparisons are statistically significant different (p<0.05, Wilcoxon Two Sample Test where appropriate).

^bGroups 1-3 vs. 4 comparisons are statistically significant different (p<0.05, Wilcoxon Two Sample Test where appropriate).

[0116] Comparison of the treatment groups 1-5 during the pre-challenge period revealed that during this time period compared to the treated groups 1-4 the untreated challenge controls had the highest clinical scores of 1.013. Treatment group 4 (APP) had the second highest mean clinical score of 1.011 followed by groups 1, 2 and 3 with scores of 1.001, 1.000, and 1.000 respectively. Statistical differences (p≤0.05) were found when comparing treatment groups 1-3 vs. group 5 from an overall mean score for the pre-challenge period. In addition statistical differences (p≤0.05) were found when comparing groups 1-3 vs. group 4. No statistical differences were found when comparing group 4 vs. group 5.

[0117] During the challenge period it was noted that treatment group 5 (challenge) had the highest overall score of 1.148 followed by groups 1, 3, 4, and 2 with scores of 1.068, 1.058, 1.036, and 1.017 respectively. For overall average clinical scores, statistical differences (p≤0.05) were found when comparing groups 1-4 vs. group 5. During the challenge period, treatment group 5 (challenge) had the highest scores on days 37 through 41. Treatment group 1 (whole cell) had the highest score on day 36. Furthermore, treatment group 1 (whole cell) scores fell numerically following day 36 spike from 1.25 to a range of 1.00 to 1.07. The lowest overall score was in treatment group 2 (supernatant), and it was statistical different (p≤0.05) compared to group 5 (challenge) on days 39, 40, and 41. Further comparison of group 4 (APP) showed that on day 36, one day post challenge, there was a statistical difference (p≤0.05) compared to group

5 (challenge). Also, on day 36 groups 1 and 3 were statistical different ($p \leq 0.05$) compared to group 4 (APP).

2. Rectal temperatures

[0118] To monitor the effects of vaccination and challenge, rectal temperatures were taken at different time points throughout the study (Days 0, 0 + 4hrs, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, and 41). Temperature spikes greater than (104.9°F) were considered to be significant. The number of animals with temperatures exceeding the cut-off are listed in Table 4. Using Fisher's Exact Test and ANOVA, statistical analyses were only performed to compare pyrexia scores for groups 1 through 5.

[0119] Referring to FIG. 1 and Table 4 for the first vaccination time period of day 0 to 21, there was a general spike in rectal temperature in all treatment groups with a larger spike $\geq 104.9^\circ\text{F}$ at time 4 hours post vaccination in treatment groups 3 (omp) and 4 (APP) and continued to day 1 for group 3 (omp). In group 1 (whole cell) there was a decrease in temperature on day 7 to 102°F, and statistical differences were observed ($p \leq 0.05$) when comparing group 1 vs. groups 2-5 on this day. Furthermore, the treated animal temperatures in groups 1-4 were numerically less than the untreated groups 4-5 on day 7. On day 21 of the study the treated animals had numerically lower temperatures than the untreated and were found to be statistically different ($p \leq 0.05$) when comparing groups 1-4 vs. group 5.

Table 4. Rectal temperatures (°F) from day 0 to day 21 (first vaccintion period).

Grp	Treatment	Day 0	Day 0 + 4 hrs.	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7	Day 14	Day 21
1	Whole Cell	103.1	104.1 ^b	103.5 ^b	103.3	103.5	102.0 ^{a,b}	103.4 ^{a,b}	103.7 ^{a,b}
2	Supernatant	103.2	104.2 ^c	103.6 ^c	103.3	103.3	102.8 ^{a,b}	103.6	103.3 ^{a,b}
3	OMP	103.2	104.9 ^{a,b,c,d}	104.9 ^{a,b,c}	103.3	103.3	102.8 ^{a,b}	103.6	103.5 ^a
4	APP	103.3	105.1 ^{a,b,d}	103.9 ^c	103.2	103.5	102.9 ^{a,b}	103.8 ^b	103.5 ^a
5	Challenge	103.1	103.8 ^a	103.5 ^a	103.5	103.6	103.6 ^a	103.7 ^a	104.1 ^a
6	Strict	103.1	103.8	103.2	103.5	103.7	103.5	104.1	104.1

* Treatment group 6 was not included in the statistical analysis.
^aGroups 1-4 vs. 5 comparisons are statistically significant different ($p < 0.05$, ANOVA Test where appropriate).
^bGroups 1 vs. 2-4 comparisons are statistically significant different ($p < 0.05$, ANOVA where appropriate).
^cGroups 2 vs. 3-4 comparisons are statistically significant different ($p < 0.05$, ANOVA where appropriate).
^dGroups 3 vs. 4 comparisons are statistically significant different ($p < 0.05$, ANOVA where appropriate).

[0120] Referring to FIG. 1 and Table 5, for the booster time period of day 22 through day 35 it was observed that treatment group 4 (APP) had the highest numerical rectal temperature on day 28 of the study. Statistical differences were observed ($p \leq 0.05$) on day 28 when comparing treatment groups 1 and 2 vs. group 4.

5 Table 5. Rectal temperatures in degrees Fahrenheit (°F) from day 22 to day 35 (booster period).

Group	Treatment	Day 28	Day 34	Day 35
1	Whole Cell	103.7 ^a	103.5	103.9
2	Supernatant	103.6 ^b	103.7	104.0
3	OMP	103.9	103.6	103.8
4	APP	104.3 ^{a,b}	103.5	103.7
5	Challenge	103.9	103.5	103.7
6	Strict	103.9	103.5	103.7

* Treatment group 6 was not included in the statistical analysis.

^aGroups 1 vs. 2-4 comparisons are statistically significant different ($p < 0.05$, ANOVA where appropriate).

10 ^bGroups 2 vs. 3-4 comparisons are statistically significant different ($p < 0.05$, ANOVA where appropriate).

[0121] Referring to FIG. 1 and Table 6, for the challenge time period days 36 through day 41 it was observed that treatment group 5 (challenge) had the highest numerical rectal temperatures on days 36, 37, 40, and 41; whereas, treatment group 1 (whole cell) had the highest rectal temperatures on days 38 and 39. Furthermore, treatment group 4 (APP) had the lowest overall rectal temperatures on days 36, 37, 38, and 41. In addition treatment group 5 (challenge) had the same lowest temperature on day 38 as treatment group 4, and groups 2 and 3 had the lowest temperatures on days 39 and 40 respectively. Both groups 3 and 5 had an initial rise in temperature one day post-challenge that then fell for group 3; however, the temperature for group 5 rose again on day 40.

20 Table 6. Rectal temperatures (°F) from day 36 to day 41 (challenge period) and number of animals with pyrexia ($\geq 104.90^\circ\text{F}$) in parentheses for at least one day from day of challenge to necropsy.

Group	Treatment	Day 36	Day 37	Day 38	Day 39	Day 40	Day 41	% Present
1	Whole Cell	104.0	104.1	103.9 ^b	104.0	103.7	103.8 ^b	53.33% ^b (8/15)
2	Supernatant	103.7 ^a	103.8 ^a	103.7	103.5	103.9	103.9 ^c	13.33% ^{a,b} (2/15)
3	OMP	104.3	103.9 ^a	103.8	103.8	103.4 ^a	103.8 ^c	33.33% (5/15)
4	APP	103.5 ^a	103.6 ^a	103.5 ^b	103.7	103.6 ^a	103.1 ^{a,b,c}	7.14% ^{a,b} (1/14)

31

Group	Treatment	Day 36	Day 37	Day 38	Day 39	Day 40	Day 41	% Present
5	Challenge	104.6 ^a	104.4 ^a	103.5	103.7	104.1 ^a	104.0 ^a	66.67% ^a (10/15)
6	Strict	103.7	103.8	103.7	103.6	103.6	103.5	103.7

* Treatment group 6 and Spleen, Meninges, and Heart Blood were not part of the statistical analysis.

^aGroups 1-4 vs. 5 comparisons are statistically significant different (p<0.05, ANOVA and Fishers Exact Test where appropriate).

5 ^bGroups 1 vs. 2-4 comparisons are statistically significant different (p<0.05, ANOVA and Fishers Exact Test where appropriate).

^cGroups 2-3 vs. 4 comparisons are statistically significant different (p<0.05, ANOVA and Fishers Exact Test where appropriate).

[0122] Further evaluation of the challenge period showed that the challenge group 5
10 received the highest percent positive of animals that were febrile with a value of 66.67%, which was statistically different (p≤0.05) when compared to groups 2 and 4. The second highest score received was in treatment group 1 with a score of 53.33%, which was also statistically different (p≤0.05) when compared to groups 2 and 4. Groups 4 (APP) and 2 (supernatant) received the lowest scores of 7.14% and 13.33% respectively. Treatment group 3 (omp) had a score of
15 33.33%.

3. Bacterial isolation

[0123] At necropsy, swabs of the nasal cavity, trachea, bronchi, meninges, and heart blood were collected for bacterial isolation. Sheep blood agar plates (5% with TSA) and MacConkey agar plates were inoculated with each swab, streaked for isolation and incubated overnight at
20 37°C. Blood agar plates were placed under anaerobic and aerobic conditions, and the MacConkey agar plates were placed under aerobic conditions only. In addition, chocolate agar plates were used only for culturing lung samples and incubated at 37°C under aerobic conditions. Fresh tissue samples of the lung (3 lobes from sections containing lesions), liver, kidney, and tonsil were obtained. Swabs of each tissue were used to inoculate agar plates for bacterial
25 isolation. Plates were incubated along with the swab samples mentioned above, and plates were observed for presence of *A. suis* 24 hours post incubation. Biochemical analysis was done on a random sample in each of the treatment groups to confirm the presence of *A. suis*. Statistical analyses were only performed to compare groups 1 through 5 on bacterial isolation scores using the Fisher's Exact Test. The spleen, meninges, and heart blood were not statistically analyzed.
30 Tables 7a and 7b provides a summary of the bacteriology results.

Table 7a. Number of percent positive *A. suis* animals in treatment groups by bacterial isolation.

Group	Treatment	Lung	Liver	Kidney	Tonsil	Nasal
1	Whole Cell	40% (6/15)	6.67% (1/15)	6.67% (1/15)	66.67% (10/15)	13.33% (2/15)
2	Supernatant	33.33% (5/15)	0.00% (0/15)	13.33% (2/15)	80.00% (12/15)	13.33% (2/15)
3	OMP	33.33% (5/15)	0.00% (0/15)	0.00% (0/15)	60.00% (9/15)	6.67% ^a (1/15)
4	APP	33.33% (5/15)	6.67% (1/15)	6.67% (1/15)	60.00% (9/15)	0.00% ^a (0/15)
5	Challenge	73.33% (11/15)	13.33% (2/15)	20.00% (3/15)	86.67% (13/15)	46.67 ^a (7/15)
*6	Strict	0.00% (0/10)	0.00% (0/10)	0.00% (0/10)	0.00% (0/10)	20.00% (3/10)

* Treatment group 6 and Parameters Spleen, Meninges, and Heart Blood were not part of the statistical analysis.

^aGroups 1-4 vs. 5 comparisons are statistically significant different (p<0.05, Fishers Exact Test where appropriate).

5

Table 7b. Number of percent positive *A. suis* animals in treatment groups by bacterial isolation.

Group	Treatment	Trachea	Bronchi	*Spleen	*Meninges	*Heart blood
1	Whole Cell	6.67% (1/15)	13.33% (2/15)	0.00% (0/15)	6.67% (1/15)	6.67% (1/15)
2	Supernatant	6.67% (1/15)	0.00% (0/15)	0.00% (0/15)	0.00% (0/15)	0.00% (0/15)
3	OMP	6.67% (1/15)	13.33% (2/15)	6.67% (1/15)	0.00% (0/15)	0.00% (0/15)
4	APP	20.00% (3/15)	20.00% (3/15)	0.00% (0/15)	6.67% (1/15)	0.00% (0/15)
5	Challenge	20.00% (3/15)	26.67% (4/15)	6.67% (1/15)	6.67% (1/15)	6.67% (1/15)
*6	Strict	6.67% (1/10)	0.00% (0/10)	0.00% (0/10)	0.00% (0/10)	0.00% (0/10)

* Treatment group 6 and Parameters Spleen, Meninges, and Heart Blood were not part of the statistical analysis.

^aGroups 1-4 vs. 5 comparisons are statistically significant different (p<0.05, Fishers Exact Test where appropriate).

10

[0124] The recovery of *A. suis* in each of the target areas was the highest in treatment group 5 (challenge) compared to the other groups (1-4). The highest percentage of *A. suis* recovery was found in the tonsil followed by the lung. The recovery of *A. suis* was low in the spleen, meninges, and heart blood parameters with only a maximum recovery yield of 6.67%

among the treatment groups. The strict controls, group 6, had three out of ten pigs positive for *A. suis* in nasal tissue, and one pig positive for tracheal tissue. Statistical differences ($p \leq 0.05$) were found in nasal tissue when comparing groups 3 (omp) and 4 (APP) vs. group 5 (challenge).

[0125] Other common respiratory and bacterial organisms were isolated during the culturing process. *Bordetella sp.* was in high numbers in all groups as well as alpha and beta streptococcal bacteria and *Pasteurella multocida*. Other organisms isolated in very low numbers were *Arcanobacterium pyrogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Proteus*, blue fungi, and *Pastunella sp.*

4. Serology

[0126] Blood was drawn on study day 0, 7, 14, 21, 28, 34, and 41 of the study. Western blots were performed on pooled sera from treatment groups 1, 2, 3, and 4 on days 0 and 34 of the study to measure immunoreactivity to the fractions. Each treatment group consisted of three pooled groups, which consisted of 5 pigs from that treatment group. The western blots showed detectible seroconversion to the whole cell, supernatant, and omp fractions at 1:100 dilution, but not a 1:1000. The APP fraction had the best reactivity and was detectable at 1:1000. For all groups, no reactivity was found in the day 0 samples prior to treatment.

[0127] All of the compositions and methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the compositions and methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it will be apparent that certain agents which are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the following claims.

REFERENCES

[0128] The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

- Monteiro, Slavic, and Michael, 2000) *J Clin Microbiol* 38 (10): 3759–3762
- Oliveira et al, (2007) *American Association Of Swine Veterinarians*, pp. 371-376.
- Oliveira S. (2007) Swine respiratory bacterial pathogens: bacterial overview and vaccine trends.
In: J Wiseman, M Varley, S McOrist & B Kemp (Eds), *Paradigms in Pig Science*
5 (pp.196-178). Nottingham, UK: Nottingham University Press.
- Rullo, Papp-Szabo and Michael, (2006) *Biochimie et biologie cellulaire* 84(2):184-90.
- Simpson (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163:688
- Slavic, et al., (2000a) *Can J Vet Res.* 2000 April; 64(2): 81–87.
- Slavic, et al., (2000b) *J Clin Microbiol.* 2000 October; 38(10): 3759–3762.
- 10 Versalovic et al, 1991, *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 24 6823 –6831

33

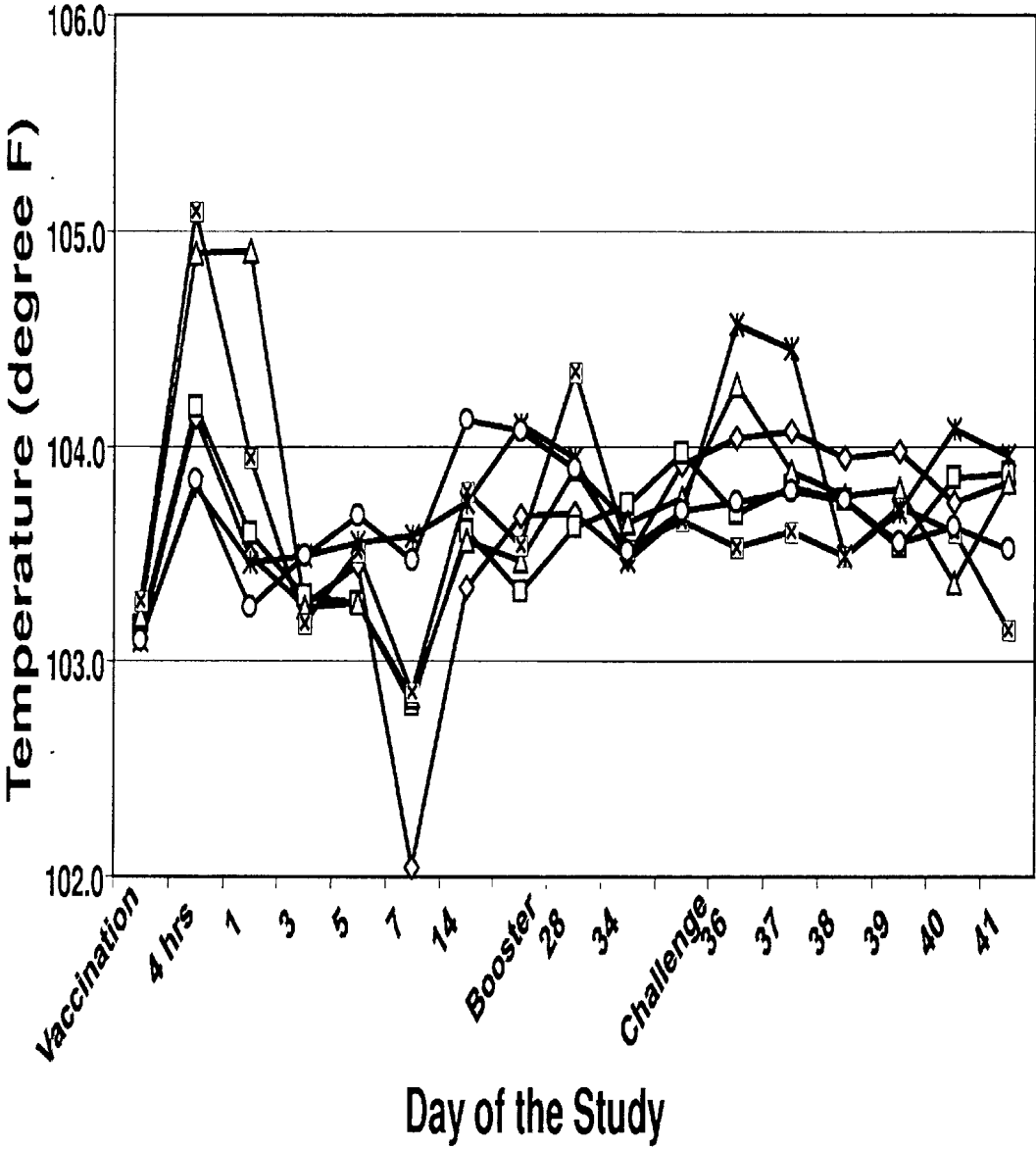
CLAIMS

What is claimed is:

1. An immunogenic composition for protecting a subject against *Actinobacillus suis* infection, comprising
 - 5 a) supernatant collected from one or more *A. suis* cultures grown to between 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀; and
 - b) an adjuvant.
2. The immunogenic composition of claim 1, wherein the supernatant is essentially free from *A. suis* cells.
- 10 3. The immunogenic composition of claim 1, wherein the supernatant is inactivated.
4. The immunogenic composition of claim 3, wherein the supernatant is formalin inactivated.
5. The immunogenic composition of claim 1, wherein the adjuvant is Emulsigen® -D.
6. The immunogenic composition of claim 1, wherein the subject is a porcine.
- 15 7. A method of provoking an immune response against *Actinobacillus* in a subject comprising administering to the subject the immunogenic composition of claim 1.
8. The method of claim 7, wherein the subject is a porcine.
9. A method of reducing the incidence of or severity of a clinical sign associated with *Actinobacillus suis* infection comprising the step of administering the immunogenic
 - 20 composition of claim 1 to a subject, wherein the reduction of the incidence of or the severity of a clinical sign is relative to a subject not receiving the immunogenic composition.
10. The method of claim 9, wherein the clinical sign is selected from the group consisting of meningitis, septicemia, metritis, pneumonia, crysipelas-like lesions, and abortion.
- 25 11. The method of claim 9, wherein the *Actinobacillus suis* infection is an *A. suis* ISU-8594 infection.
12. The method of claim 9, wherein the subject is a porcine.
13. A method of preparing the immunogenic composition of claim 1 comprising
 - 30 a) growing an *Actinobacillus suis* culture to between 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀;
 - b) collecting a supernatant from the culture;

- c) filtering the supernatant to yield a filtrate; and
 - d) mixing the filtrate with an adjuvant.
14. The method of claim 13, further comprising inactivating the supernatant.
15. The method of claim 14, wherein the supernatant is inactivated prior to mixing with
5 adjuvant.
16. The method of claim 13, wherein the adjuvant is Emulsigen[®]-D.
17. A method of diagnosing *Actinobacillus suis* infection in a subject, comprising
- a) providing a filtered supernatant prepared by growing an *A. suis* culture to between
10 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀, collecting supernatant from the culture, and
 filtering the supernatant;
 - b) contacting the filtered supernatant with a sample obtained from the subject; and
 - c) identifying the subject as having an *A. suis* infection if an antibody capable of
 binding a component in the filtered supernatant is detected in the sample.
18. The method of claim 17, wherein the binding is detected using a second antibody capable
15 of binding the antibody in the sample.
19. A kit comprising
- a) a filtered supernatant prepared by growing an *Actinobacillus suis* culture to
20 between 0.650 OD₆₅₀ and 0.850 OD₆₅₀, collecting a supernatant of the culture, and
 filtering the supernatant;
 - b) an adjuvant; and
 - c) a container for packaging the supernatant and adjuvant.
20. The kit of claim 19, further comprising instructions for use of the kit.
21. The kit of claim 19, further comprising a means of administering the filtered supernatant
to a subject.
- 25 22. A kit for preparing the immunogenic composition of claim 1 comprising (i) the
 supernatant and (ii) the adjuvant, wherein (i) and (ii) are packaged separately.
23. The kit of claim 22, further comprising instructions for use of the kit.

FIG. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/055951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/102 A61P31/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BURROWS L L ET AL: "Molecular characterization of an RTX toxin determinant from Actinobacillus suis.", INFECTION AND IMMUNITY JUN 1992 LNKD-PUBMED:1587585, vol. 60, no. 6, June 1992 (1992-06), pages 2166-2173, XP002616878, ISSN: 0019-9567	1,7,9, 17,19,22
Y	e.g. paragraph bridging left-hand column and right-hand column on page 2167; abstract, line 7-8; paragraph bridging page 2169 and 2170; page 2172, left-hand column, paragraph 3; page 2172, left-hand column, last paragraph; the whole document ----- -/--	2-6,8, 10-16, 18,20, 21,23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 January 2011

Date of mailing of the international search report

28/01/2011

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/055951

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEVENISH J ET AL: "Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of Actinobacillus pleuropneumoniae.", INFECTION AND IMMUNITY DEC 1990 LNKD-PUBMED:2254012, vol. 58, no. 12, December 1990 (1990-12), pages 3829-3832, XP002616879, ISSN: 0019-9567 e.g. page paragraph bridging page 3829 and 3830; the whole document	1-23
Y	FEDORKA-CRAY P J ET AL: "Efficacy of a cell extract from Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae serotype 1 against disease in swine.", INFECTION AND IMMUNITY FEB 1990 LNKD-PUBMED:2298483, vol. 58, no. 2, February 1990 (1990-02), pages 358-365, XP002616880, ISSN: 0019-9567 e.g. abstract; page 358, right-hand column, last paragraph - page 359, left-hand column, paragraph 2; page 364, left-hand column, paragraph 2; page 362, right-hand column, last paragraph; the whole document	2-6,8, 10-16, 18,20, 21,23
A	WO 97/13523 A1 (UNIV KANSAS STATE [US]) 17 April 1997 (1997-04-17) the whole document	1-23
A	GOETHE R ET AL: "A novel strategy for protective Actinobacillus pleuropneumoniae subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 19, no. 7-8, 22 November 2000 (2000-11-22), pages 966-975, XP004225419, ISSN: 0264-410X, DOI: DOI:10.1016/S0264-410X(00)00212-7 the whole document	1-23
A	WANG CHUNLAI ET AL: "Positive role for rApXIVN in the immune protection of pigs against infection by Actinobacillus pleuropneumoniae.", VACCINE 25 SEP 2009 LNKD- PUBMED:19654060, vol. 27, no. 42, 25 September 2009 (2009-09-25), pages 5816-5821, XP002616881, ISSN: 1873-2518 the whole document	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/055951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9713523	A1	17-04-1997	AU 7663196 A	30-04-1997

ANTÍGENOS DE *ACTINOBACILLUS SUI*S

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones útiles para la inhibición, el tratamiento, la protección o la prevención de la infección por *Actinobacillus suis*.

Descripción de la Técnica Relacionada

El *Actinobacillus suis* ha surgido recientemente como una nueva amenaza para la industria porcina en los Estados Unidos. Anteriormente asociado a una alta mortalidad en manadas "muy saludables", *A. suis* es reconocido ahora como un importante patógeno de las manadas convencionales. En particular, es perjudicial para los animales más jóvenes. La infección causa actinobacilosis y puede originar la muerte repentina tanto en cerdos neonatos como en destetados. Los síntomas en los cerdos destetados incluyen anorexia, fiebre, cianosis, congestión de las extremidades, angustia respiratoria, pulmonía, neumonía necrotizante, tos persistente, lesiones dérmicas y septicemia fatal. Se sabe que la pulmonía, la artritis, los signos septicémicos, pleuresía, pericarditis y los abscesos miliares ocurren en el acabado final de cerdos. El *Actinobacilosis* también causa metritis y aborto en cerdas.

La amplia patología de *actinobacilosis* se caracteriza por las lesiones encontradas en pulmones, riñón, corazón, hígado, bazo, intestinos y piel; hemorragias y necrosis; y lesiones pulmonares del tipo pleuroneumonía. Histopatológicamente, la enfermedad se caracteriza por la presencia del tromboembolismo bacteriano acompañado de necrosis fibrino-hemorrágica en los vasos de diversos tejidos; bronconeumonía necrotizante y pleuritis. Las causas y los factores que contribuyen a la infección incluyen la precipitación por infección del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), la sección de los dientes, corte de la cola, lavado de pezuñas, y entrada vía respiración, cortes o abrasiones.

El *Actinobacillus suis* es un cocobacilo facultativo oportunista, gram-negativo, no motil, aeróbico y anaerobio que coloniza las vías respiratorias superiores. El genotipado de aislados de *A. suis* recuperados de casos clínicos en manadas de cerdos norteamericanas han revelado una limitada variabilidad genética, con sólo 13 cepas identificadas entre 74 aislados recuperados de 29 manadas diferentes. El índice de diversidad de Simpson (también conocido como el índice de diversidad de especies, véase Simpson, 1949) para los genotipos de *A. suis* es 0,64, lo que significa

que un aislado aleatorio tiene una posibilidad del 64 % de ser incluido en un grupo de genotipo único usando, por ejemplo BOX-PCR (Simpson, 1949; Versalovic *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2007). Comparado con *H. parasuis*, por ejemplo, que tiene un índice de diversidad de 0,93 (Oliveira *et al.*, 2007), *A. suis* es relativamente clónico.

5 La diversidad fenotípica de *A. suis* también está relativamente limitada. Sólo 2 serovares, a saber 01 y 02 (Rullo, Papp-Szabo y Michael, 2006), y tres tipos capsulares, K1-3, han sido descritos hasta ahora. Los estudios de patogenicidad sugieren que los aislados del serogrupo 02 tienden a ser más virulentos que los aislados de 01 (Slavic, DeLay y Hayes, 2000). El serotipado de aislados de *A. suis*
10 usados para la producción de vacunas autógenas también confirma que un porcentaje más alto de aislados de 02 estaban relacionados con la enfermedad clínica comparado con los aislados de 01 (Slavic, Toffner, y Monteiro, 2000). Aunque sean conocidos algunos factores de la virulencia de *A. suis* (p.ej las toxinas de RTX Apx I_{var. suis} y Apx II_{var. suis}), los factores que pueden provocar la infección sistémica todavía están
15 indefinidos. Algunos de estos factores potenciales incluyen lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos capsulares (CPS), proteína A de membrana externa (OmpA), proteasas, y adquisición de hierro.

 Actualmente, no hay ninguna vacuna comercialmente disponible para el control de *A. suis*, y la mayor parte de los veterinarios de campo confían en las
20 vacunas autógenas y los tratamientos antimicrobianos para controlar la enfermedad. Es deseable el desarrollo de una vacuna que proteja potencialmente contra la mayor parte de aislados en el campo; sin embargo, los datos necesarios en cuanto a la asociación entre genotipo, serovares, toxina, perfiles de proteínas y factores que están implicados en la patogénesis de la infección de *A. suis* todavía están indefinidos. En
25 este documento, son proporcionados dichos datos, así como, vacunas y sus métodos de uso contra *A. suis*.

RESUMEN DE LA INVENCION

 La presente invención proporciona nuevas composiciones inmunógenas que
30 son útiles para proteger a un sujeto contra la infección por *Actinobacillus suis*. Estas composiciones son también útiles para la inhibición, el tratamiento o la prevención de la infección por varias cepas o tipos de *Actinobacillus suis*.

 Las composiciones de la invención comprenden un sobrenadante recogido de uno o varios cultivos de *A. suis* cultivados entre OD₆₅₀ 0,650 y OD₆₅₀ 0,850; y un
35 adyuvante. Preferiblemente el sobrenadante está inactivado, más preferiblemente por

37

la formalina. El sobrenadante también está preferiblemente filtrado, tal como por un filtro de 45 micras. La filtración puede hacerse antes o después de la inactivación según se juzgue apropiado para una situación dada. El sobrenadante, más preferiblemente el sobrenadante filtrado, está esencialmente libre de células de *A. suis*, pero puede contener múltiples componentes celulares.

5 El experto en la técnica reconocerá que cualquiera de una variedad de adyuvantes puede ser apropiadamente incluido en una composición de la invención. Un adyuvante ejemplar es el Emulsigen ®-D. La determinación del adyuvante dependerá, en parte, de la naturaleza del sujeto que debe recibir la composición; el
10 método de administración al sujeto; y las condiciones bajo las cuales debe ser administrada la composición. Por ejemplo, el adyuvante y el sobrenadante, o el sobrenadante filtrado, pueden ser mezclados juntos antes de la administración a un sujeto, pueden ser administrados simultáneamente o administrados secuencialmente a un sujeto.

15 Los sujetos adecuados de las composiciones inmunógenas de la invención incluyen a animales y seres humanos. Los animales en los cuales la respuesta inmune es estimulada por el uso de las composiciones o los métodos de la invención incluyen a ganado, tales como cerdos, terneros, pollos, cabras y ovejas, y animales domésticos, tales como ratones, conejos, perros, gatos y caballos. Los animales
20 preferidos incluyen porcinos, múridos, équidos, lagomorfos y bóvidos. Más preferiblemente el animal es un porcino.

La invención también proporciona métodos para provocar una respuesta inmune contra *Actinobacillus* para reducir la frecuencia o la severidad de un síntoma clínico asociado a infección por *Actinobacillus suis* en un sujeto, que comprende
25 administrar al sujeto una composición inmunógena de la invención. Los síntomas clínicos asociados a *A. suis* que pueden ser reducidos en frecuencia o severidad en un sujeto incluyen meningitis, septicemia, metritis, pulmonía, lesiones del tipo erisipela y aborto. Cualquiera de los cuales puede ser disminuido por la administración de una composición de la invención con relación a un sujeto que no reciba la composición
30 inmunógena. Las composiciones preferidas de la invención provocan una respuesta inmunológica protectora que supone al menos una reducción del 10 % de al menos un síntoma clínico de una infección por *A. suis*.

Una infección por *Actinobacillus suis* preferida que puede ser reducida por la administración de una composición de la invención es ISU-8594 de *A. suis*.

La invención también proporciona métodos para hacer o preparar composiciones inmunógenas de la invención que pueden ser útiles en la fabricación de un medicamento. Tales métodos incluyen las etapas de cultivar un cultivo de *Actinobacillus suis* entre OD₆₅₀ 0,650 y OD₆₅₀ 0,850; recoger el sobrenadante del cultivo; filtrar el sobrenadante para producir un filtrado; y mezclar el filtrado con un adyuvante. Tales métodos también pueden incluir inactivar el sobrenadante, preferiblemente antes de mezclar el sobrenadante con un adyuvante. La inactivación puede ocurrir antes o después de filtrar el sobrenadante.

La invención además proporciona métodos para diagnosticar una infección por *Actinobacillus suis* en un sujeto. Tales métodos comprenden: a) proporcionar un sobrenadante filtrado preparado cultivando un cultivo de *A. suis* entre OD₆₅₀ 0,650 y OD₆₅₀ 0,850, recoger el sobrenadante del cultivo, y filtrar el sobrenadante; b) poner en contacto el sobrenadante filtrado con una muestra obtenida del sujeto; y c) identificar el sujeto que tiene una infección de *A. suis* si se detecta en la muestra un anticuerpo capaz de unirse a un componente en el sobrenadante filtrado.

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con una variedad de técnicas adecuadas para averiguar si un anticuerpo es capaz de unirse a un componente. Por ejemplo, la unión puede ser detectada usando un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo en la muestra. La unión de tales segundos anticuerpos puede detectarse por un ensayo colorimétrico u otros medios adecuados.

La invención también proporciona kits que comprenden: a) un sobrenadante filtrado preparado cultivando un cultivo de *Actinobacillus suis* entre OD₆₅₀ 0,650 y OD₆₅₀ 0,850, recoger el sobrenadante del cultivo, y filtrar el sobrenadante; b) un adyuvante; y c) un contenedor para envasar el sobrenadante y el adyuvante. El sobrenadante filtrado y el adyuvante pueden ser envasados juntos o por separado.

El kit puede comprender además instrucciones para el uso del kit. También puede comprender un medio para administrar el sobrenadante filtrado y el adyuvante a un sujeto. También puede ser incluido en el kit un medio para mezclar el sobrenadante y el adyuvante juntos.

Las composiciones de la invención pueden comprender además a un vehículo veterinariamente aceptable, un segundo adyuvante, o su combinación. Tales composiciones pueden usarse como una vacuna y comprender una vacuna atenuada, una vacuna inactivada, o sus combinaciones. Tales vacunas producen una respuesta inmunológica protectora contra al menos una enfermedad asociada a *Actinobacillus*.

Los agentes de inactivación preferidos para uso en los métodos de la invención son seleccionados del grupo que consiste en etilenimina binario (BEI) y formalina. La formalina es el agente de inactivación más preferido. Los expertos en la técnica reconocerán que otros agentes de inactivación y métodos (es decir
5 calentamiento, cambio del pH, etc.) son conocidos en la técnica y que pueden usarse, de modo intercambiable, en la práctica de la invención, siempre que tales agentes o métodos de desactivación no alteren negativamente las propiedades inmunógenas o la seguridad de la composición producida.

Los métodos de la invención también pueden comprender mezclar una
10 composición de la invención con un vehículo veterinariamente aceptable, adyuvante o su combinación. Los expertos en la técnica reconocerán que la opción del vehículo, adyuvante o combinación será determinada por la ruta de administración, preferencia personal y especies de animales, entre otros.

Las rutas preferidas de la administración incluyen intranasal, oral,
15 intradérmica e intramuscular. Se prefiere la administración en agua potable, lo más preferiblemente en una dosis individual. El experto en la técnica reconocerá que las composiciones de la invención también pueden administrarse en dos o más dosis, así como, por otras rutas de administración. Por ejemplo, tales otras rutas incluyen
20 subcutáneamente, intracutáneamente, intravenosamente, intravascularmente, intraarterialmente, intraperitonealmente, intratecalmente, intratraquealmente, intracutáneamente, intracardialmente, intralobalmente, intramedularmente, intrapulmonarmente o intravaginalmente. Según la duración deseada y la eficacia del tratamiento, las composiciones según la invención pueden administrarse una vez o
25 varias veces, también intermitentemente, por ejemplo cada día durante varios días, semanas o meses y en dosis diferentes.

La invención también proporciona kits para vacunar a un sujeto que comprende un juego de instrucciones impresas; un dosificador capaz de administrar una vacuna a un animal y un sobrenadante de un cultivo de *A. suis* que tiene uno o
30 varios componentes que estimulan con eficacia una respuesta inmune en un sujeto. Los kits de la invención pueden comprender además a un vehículo veterinariamente aceptable, adyuvante o su combinación.

Un dosificador en un kit de la invención es capaz de dispensar su contenido como gotitas; y el sobrenadante de *A. suis* incluido en el kit es capaz de reducir la severidad de al menos un síntoma clínico de una infección de *A. suis* cuando se

administra a un sujeto. Preferiblemente, la severidad de un síntoma clínico es reducida en al menos el 10 % comparado con un sujeto no tratado e infectado.

Una "composición inmunógena o inmunológica" se refiere a una composición de materia que comprende al menos un sobrenadante de *A. suis*, o su parte
5 inmunógena, que provoca una respuesta inmunológica de una respuesta celular o inmune mediada por el anticuerpo a la composición en el sujeto. En una realización preferida de la presente invención, una composición inmunógena induce una respuesta inmune y, más preferiblemente, confiere inmunidad protectora contra uno o varios de los síntomas clínicos de una infección de *Actinobacillus*.

10 Una "respuesta inmune" o "respuesta inmunológica" significa, aunque no está limitada al desarrollo de una respuesta celular y/o inmune mediada por el anticuerpo frente a la composición o la vacuna de interés. Por lo general, una respuesta inmune o inmunológica incluye, aunque no está limitada a uno o varios de los efectos siguientes: la producción o activación de anticuerpos, células B, linfocitos T ayudantes, linfocitos T
15 supresores, y/o linfocitos T citotóxicos, dirigidos expresamente contra un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el sujeto vacunado mostrará una respuesta terapéutica o protectora inmunológica (memoria) tal que la resistencia frente a la nueva infección será realizada y/o la severidad clínica de la enfermedad será reducida. Tal protección será demostrada por la reducción del
20 número de síntomas, severidad de los síntomas o por la carencia de uno o varios de los síntomas asociados con la infección del patógeno, el retraso del inicio de los síntomas clínicos, la menor persistencia patógena, una reducción de la carga patógena total y/o una reducción de la excreción patógena.

La "protección contra *A. suis*", "inmunidad protectora", "inmunidad funcional",
25 y expresiones similares, significa una respuesta inmune contra *A. suis* generada por un programa de inmunización que causa menos efectos deletéreos que los que serían esperados por un sujeto no inmunizado que no ha sido expuesto con anterioridad a *A. suis*. Es decir, la severidad de los efectos deletéreos de la infección disminuye en un sujeto inmunizado porque el sistema inmunológico del sujeto es resistente a la
30 bacteria. La infección puede reducirse, ralentizarse o prevenirse posiblemente totalmente, en un sujeto inmunizado, preferiblemente un cerdo. En este documento, cuando se supone que hay una prevención completa de la infección, se establece expresamente. Si no se establece la prevención completa, entonces el término incluye la prevención parcial.

34

En este documento, la "reducción de la frecuencia y/o severidad de los síntomas clínicos" o la "reducción de los síntomas clínicos" significa, aunque no está limitado a reducir el número de sujetos infectados en un grupo, reducir o eliminar el número de sujetos que muestran síntomas clínicos de la infección, o reducir la severidad de algún síntoma clínico que está presente en los sujetos, en comparación con la infección tipo silvestre. Por ejemplo, debería referirse a cualquier reducción de carga patógena, presencia del patógeno, reducción de la transmisión patógena o reducción de cualquier síntoma clínico sintomático de la infección de *A. suis*. Preferiblemente estos síntomas clínicos se reducen en sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos un 10 % en comparación con sujetos que no reciben la composición y que pueden volverse infectados. Más preferiblemente, se reducen los signos clínicos en sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos el 20 %, preferiblemente en al menos el 30 %, más preferiblemente en al menos el 40 %, y aún más preferiblemente en al menos el 50 %.

La expresión "aumento de la protección" significa en este documento, aunque no está limitado a una reducción estadísticamente significativa de uno o varios síntomas clínicos que tienen que ver con la infección de *A. suis* en un grupo vacunado de sujetos frente a un grupo de control no vacunado de sujetos. La expresión "reducción estadísticamente significativa de los síntomas clínicos" significa, aunque no está limitada, que la frecuencia en la incidencia de al menos un síntoma clínico en el grupo vacunado de sujetos es de al menos el 20 %, preferiblemente el 30 %, más preferiblemente el 50 %, y aún más preferiblemente el 70 % menor que en el grupo de control no vacunado después de la exposición a una bacteria de *Actinobacillus* infecciosa.

Los expertos en la técnica entenderán que las composiciones usadas en este documento pueden incorporar conocidas soluciones estériles inyectables fisiológicamente aceptables. Para preparar una solución lista para su uso para la inyección parenteral o infusión, las soluciones isotónicas acuosas, p.ej soluciones de proteínas salinas o plasma, están disponibles en el acto. Además, las composiciones inmunógenas y las composiciones de vacuna de la presente invención pueden incluir a vehículos aceptables para el veterinario, diluyentes, agentes isotónicos, estabilizadores o adyuvantes.

Según se usa en este documento, un "vehículo aceptable para el veterinario" incluye alguno y todos los disolventes, medios de dispersión, capas, adyuvantes,

agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifungosos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción y otros por el estilo. En algunas realizaciones preferidas, y sobre todo aquellas que incluyen las composiciones inmunógenas liofilizadas, los agentes estabilizantes para uso en la
5 presente invención incluyen estabilizadores para la liofilización o el deshidratado por congelación.

En algunas realizaciones, la composición inmunógena de la presente invención contiene un adyuvante. Los "adyuvantes" según se usan en este documento, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas p.ej,
10 Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc, Cambridge, MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc, Birmingham, AL), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede estar basada particularmente en aceite de parafina líquido ligero (tipo farmacopea europea); aceite de isoprenoide tal como escualeno; aceite que resulta de la oligomerización de
15 alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más en particular aceites de planta, oleato de etilo, propilenglicol di-(caprilato/caprato), tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar
20 la emulsión. Los emulsionantes son tensioactivos preferiblemente no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (p.ej oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiestearico, que están opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos de Pluronic, sobre todo
25 L121. Véase Hunter *et al.*, "The Theory and Practical Application of Adjuvants" (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, *Vaccine* **15**:564-570 (1997).

Otros adyuvantes ejemplares son la emulsión SPT descrita en la página 147 del "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editado por M. Powell y M.
30 Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de este mismo libro.

Un caso más de un adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueniilo. Los compuestos de adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido
35 acrílico o metacrílico que son reticulados, sobre todo con éteres de polialqueniilo de

azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (volumen 8 de Phameuropa, N° 2, junio de 1996). Las personas expertas en la técnica también pueden referirse a la patente de EE.UU. N° 2.909.462 que describe tales polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxiado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos sustituidos por radicales alifáticos no saturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, p.ej vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente no saturados. Los radicales no saturados pueden contener otros sustituyentes, tales como el metilo.

Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son particularmente apropiados. Se reticulan con una sacarosa de alilo o con pentaeritritol de alilo. Entre estos, pueden mencionarse Carbopol 974P, 934P y 971P. El más preferido es el uso del Carbopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alquenilo, están los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que será neutralizada, preferiblemente a pH fisiológico, a fin de dar lugar a la solución de adyuvante en la cual la composición de inmunógeno, inmunológica o de vacuna será incorporada por sí mismo.

Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero no están limitados al sistema adyuvante de RIBI (Ribi Inc), copolímero de bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), lípido A monofosforilo, adyuvante de lípido-amina de Avridine, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante u otra), toxina del cólera, IMS 1314 o dipéptido de muramilo, o citoquinas naturales o recombinantes o sus análogos o estimulantes de la liberación de citoquina endógena, entre muchos otros.

Los "diluyentes" pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y otros por el estilo. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina y sales de álcali del ácido etilendiaminotetracético, entre otros.

Se espera que pueda añadirse un adyuvante en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, aún más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis, y lo más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis. O bien, el adyuvante puede estar en una

concentración de aproximadamente 0,01 a 50 %, preferiblemente en una concentración de aproximadamente 2 % a 30 %, más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 5 % a 25 %, todavía más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 7 % a 22 %, y lo más preferiblemente en una
5 concentración de 10 % a 20 % por volumen del producto final.

En este documento, "dosis eficaz" significa, aunque no está limitado a una cantidad de sobrenadante de *A. suis* o sobrenadante filtrado que provoca, o es capaz de provocar, una respuesta inmune que produce una reducción de los síntomas clínicos en un sujeto al cual el sobrenadante es administrado.

10 La "seguridad" se refiere a la ausencia de consecuencias adversas en un sujeto vacunado después de la vacunación, incluyendo, pero no limitado a: reversión potencial de una vacuna basada en la bacteria respecto a los efectos secundarios clínicamente significativos de virulencia, tales como enfermedad persistente, sistémica o inflamación inaceptable en el sitio de la administración de la vacuna.

15 Los términos "vacunación" o "vacunar" o sus variantes, según se usa en este documento significa, aunque no está limitado a un procedimiento que incluye la administración de una composición de la invención que, cuando se administra a un sujeto, provoca, o es capaz de provocar directamente o indirectamente, una respuesta inmune en el sujeto contra *A. suis*.

20 También se describen métodos para el tratamiento o la profilaxis de infecciones causadas por *A. suis*. El método comprende administrar una cantidad eficaz de la composición inmunógena de la presente invención a un sujeto, en el que dicho tratamiento o profilaxis son seleccionados del grupo que consiste en reducir los signos de la infección de *A. suis*, reduciendo la severidad o frecuencia de los síntomas
25 clínicos de una infección de *A. suis*, reduciendo la mortalidad de los sujetos de una infección de *A. suis*, y sus combinaciones.

La "mortalidad", en el contexto de la presente invención, se refiere a la muerte causada por la infección de *A. suis*, e incluye la situación en la que la infección es tan severa que un animal se sacrificaría para prevenir el sufrimiento y proporcionar un final
30 digno a su vida.

"Atenuación" significa que se reduce la virulencia de un patógeno. En la presente invención, la "atenuación" es un sinónimo de "no virulento". En la presente invención, una bacteria atenuada es aquella en la cual la virulencia ha sido reducida de modo que no cause síntomas clínicos de una infección de *A. suis*, pero que es
35 capaz de inducir una respuesta inmune en el sujeto objetivo, aunque también puede

significar que los síntomas clínicos son reducidos en frecuencia o severidad en sujetos infectados por *A. suis* atenuado en comparación con un "grupo de control" de sujetos infectados por *A. suis* no atenuado y que no reciben la bacteria atenuada. En este contexto, el término "reduce/reducido" significa una reducción de al menos el 10 %, preferiblemente el 25 %, aún más preferiblemente el 50 %, todavía más preferiblemente el 60 %, aún más preferiblemente el 70 %, todavía más preferiblemente el 80 %, aún más preferiblemente el 90 % y lo más preferiblemente el 100 % comparando con el grupo de control según se define anteriormente.

Una "cantidad eficaz", para los fines de la presente invención, significa una cantidad de una composición inmunógena capaz de inducir una respuesta inmune que reduce la frecuencia o disminuye la severidad de la infección de *A. suis* en un sujeto. Una cantidad eficaz se refiere a unidades formadores de colonia (CFU) por dosis o log/dosis.

"Protección duradera" se referirá a una "mejor eficacia" que persiste durante al menos 3 semanas, pero más preferiblemente al menos 3 meses, todavía más preferiblemente al menos 6 meses. Es más preferido que una protección duradera persista hasta una edad promedio en la cual los animales porcinos sean comercializados para obtener su carne.

En este documento, a menos que se requiera de otra forma por el contexto, los términos y expresiones singulares incluirán a los plurales y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se establezca de otra manera.

Otros objetos, rasgos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, cuando indican las realizaciones preferidas de la invención, son proporcionados mediante la ilustración sólo, ya que los diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica de esta descripción detallada.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar además ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede ser entendida mejor en cuanto a uno o varios de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

FIGURA 1. Temperaturas promedio diarias entre grupos de tratamiento a partir del día 0 hasta el día 41 del estudio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 5 La invención proporciona métodos y composiciones útiles para la inhibición, el tratamiento, la protección o la prevención de la infección por *Actinobacillus suis*. En este documento, se describe la eficacia de vacunas prototipo de *A. suis* contra una exposición heteróloga de varios serotipos o aislados de *A. suis*. Se demostró que estas vacunas estimulaban útilmente reacciones inmunógenas en animales tratados.
- 10 Algunas vacunas estimularon reacciones suficientes para ser protectoras contra *A. suis*.
- Los prototipos de vacuna de *A. suis* consistieron en diferentes fracciones del cultivo (p.ej células enteras, el sobrenadante o proteínas de la membrana externa (omp)) y una vacuna viva de Ingelvac ® APP-ALC contra *A. pleuroneumoniae* (APP).
- 15 La vacuna de las células enteras se hizo con el material granulado que resultó del centrifugado de un cultivo celular. El sobrenadante del cultivo se hizo con el sobrenadante que resultó del centrifugado, y que puede incluir exotoxinas, endotoxinas, omps secretadas o descamadas, y otros componentes celulares que no fueron eliminados durante el centrifugado (véase el Ejemplo 1). La vacuna viva de
- 20 Ingelvac ® APP-ALC fue incluida porque APP codifica las toxinas Apx I e II que son muy similares respecto a las toxinas de *A. suis*. Se supone que la vacuna de Ingelvac ® APP-ALC puede proporcionar un poco de protección inespecífica contra *A. suis*.
- Este estudio de eficacia consistió en seis grupos de tratamiento de cerdos de 3 semanas destetados $\pm$ 7 días. El grupo de tratamiento 1 (15 cerdos) recibió una
- 25 dosis (1M) intramuscular de 1 x 2mL de una fracción de células enteras inactivadas por formalina de *A. suis* los días 0 y 21 del estudio, respectivamente. El grupo de tratamiento 2 (15 cerdos) recibió una dosis 1M de 1 x 2mL de una fracción de sobrenadante de cultivo de *A. suis* inactivado con formalina los días 0 y 21 del estudio, respectivamente. El grupo de tratamiento 3 (15 cerdos) recibió una dosis 1M de 1 x
- 30 2mL de una fracción celular de proteína de membrana externa (omp) de *A. suis* los días 0 y 21 respectivamente. El grupo de tratamiento 4 (15 cerdos) recibió una dosis 1M de 1 x 2mL de Ingelvac ® APP-ALC los días 0 y 21 respectivamente. El grupo de tratamiento 5 (15 cerdos) denominado "controles de exposición" recibió una dosis 1M de 1 x 2mL de placebo los días 0 y 21 respectivamente. El grupo de tratamiento 6 (10

2

cerdos) fue denominado "controles estrictos" y no recibió ni el tratamiento placebo ni la vacuna.

El día de exposición (día 35) los cerdos en los grupos 1-5 recibieron una dosis de 6 mL/cerdo, aplicados 3 mL a cada fosa nasal, de una inoculación vía intranasal (IN) de la cepa ISU-8594 de *A. suis* que contenía $1 \times 10^{9.0}$ log/dosis. Se controlaron observaciones generales en todas las partes del estudio, los días de 0 a 41, para registrar la salud global de los cerdos, así como la reactividad del sitio de inyección y las temperaturas rectales. El día 41 del estudio, se sacrificaron todos los animales y se marcaron todas las secciones de pulmón para determinar el porcentaje de patología pulmonar. Se recogieron de cada animal muestras del pulmón recientes y fijadas (pulmones sólo) (3 lóbulos con lesiones, si aparecían), hígado, riñón, bazo, amígdala y muestras de turbinatos nasales, tráquea, bronquios, meninges y sangre de corazón y fueron cultivadas para el aislamiento bacteriano e histopatología (sólo pulmones).

Las fracciones de *A. suis* y los grupos de placebo se mezclaron con adyuvante de Emulsigen ®-D, y se apreciaron en estos grupos unas reacciones adversas en el lugar de inyección. Se apreció una reacción suave en un cerdo en el grupo del sobrenadante (grupo 2) en el sitio de inyección durante el primer acontecimiento de vacunación. En general, el Emulsigen ®-D en combinación con los artículos de ensayo no produjo ninguna reacción del sitio de inyección significativa en el sobrenadante y los grupos omp. Sin embargo, el grupo de células enteras tenía realmente a unos animales con abscesos presentes en el momento de la autopsia, lo que podría haber sido debido a la formulación del artículo de ensayo que consistió en una disolución madre de células enteras concentrada. La administración de estos prototipos de vacuna (es decir, células enteras, sobrenadante y omp) pareció ser bien tolerada durante el tiempo de administración. El grupo APP-ALC tenía un poco de hinchazón del sitio de inyección, lo que es consecuente con la bibliografía del producto que presenta hinchazón en el 11 % de los animales vacunados.

La salud global general de los cerdos en cada uno de los grupos de tratamiento fue buena durante el período de pre-exposición. Sólo un cerdo, del grupo de tratamiento 4, fue quitado del estudio durante este período. Este cerdo fue quitado debido a una infección bacteriana que se pensaba que no tenía que ver con la administración de la vacuna APP. Otras observaciones mostraron que un cerdo en el grupo de control de exposición estuvo cojo en su pierna derecha desde el día 7 hasta el día 24 del estudio. Este cerdo sesgó los resultados de observación clínica durante el período de pre-exposición y podía considerarse un valor atípico y se quitó del análisis

de datos de estudio. También, un cerdo mostró una pobre condición corporal en el grupo de células enteras y murió después de unos días. Ninguno de los cerdos en el período de prevacunación mostró signos de dificultades respiratorias.

La evaluación de los parámetros primarios y secundarios fue validada por incrementos significativos ($p < 0,05$) del desarrollo de lesión que ocurrió en el grupo de control de exposición (grupo de tratamiento 5) comparado con el grupo de control estricto (grupo de tratamiento 6). Los resultados de esta evaluación validaron el modelo de exposición de *A. suis* del cultivo puro virulento en cerdos. Se hicieron otras comparaciones frente al control de exposición y no al grupo de control estricto comparando los grupos 1-4.

Durante el período de exposición del día seis, un cerdo murió de muerte aguda debido a la infección de *A. suis* el día post-exposición en el grupo de células enteras. Según estos estudios de exposición anteriores, la ruta intranasal y la potencia eran apropiadas para causar un desarrollo de lesión significativo en los animales de ensayo y muerte repentina fatal, como fue el caso para este cerdo en el grupo de células enteras.

Según los valores de lesiones pulmonares promedios y el tanto por ciento con una lesión, los valores de lesiones pulmonares graves parecieron ser los más severos en el grupo de exposición. Los análisis estadísticos no mostraron ninguna diferencia estadística ($p < 0,05$) en los valores de lesiones pulmonares promedios o el tanto por ciento con una lesión presente comparando los grupos de 1 a 5. Numéricamente, los controles de exposición recibieron en general los valores de lesiones pulmonares graves promedios más altos seguido de los grupos de células enteras y omp, que también recibieron valores relativamente altos. El desarrollo de la lesión fue inferior en los grupos del sobrenadante y APP, que recibieron valores numéricos inferiores comparado con los otros grupos. Todos los grupos 1-5 tenían al menos el 50 % de los cerdos con un valor de lesión grave, y los grupos de exposición y omp tenían como mucho el 80 % de los cerdos un desarrollo de lesión.

Además, el análisis de lesión pulmonar microscópica estaba basado en la severidad de los rasgos característicos de una infección de *A. suis*, es decir bronconeumonía, necrosis y pleuritis. La bronconeumonía y la necrosis eran más severas en los grupos de control de exposición y omp donde los valores microscópicos de las lesiones eran inferiores que en los grupos del sobrenadante y APP. El grupo APP mostró los mejores signos de protección contra una infección de *A. suis* según los datos de lesiones microscópicas con diferencias estadísticas ($p < 0,05$) encontradas

entre el grupo 3 (omp) para necrosis y pleuritis y el grupo 5 (exposición) para pleuritis. La presencia de colonias bacterianas en todos los grupos se extendió de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 46,7 % apareciendo la colonización en tanto por ciento más baja en los grupos de células enteras y APP (20,0 %).

5 Se usaron los parámetros secundarios controlados para apoyar las respuestas de los parámetros de eficacia primarios (es decir, lesiones (IHC) graves y microscópicas) debido a la vacuna y a la exposición para cada grupo de tratamiento. Las observaciones clínicas hechas durante el período de exposición indicaron que los controles de exposición tenían un resultado global más alto cuando se comparaba con
10 los grupos de tratamiento de vacuna 1-4, mostrando que los controles de exposición respondieron a la exposición. El grupo del sobrenadante no parecía estar clínicamente afectado. Sin embargo, todos los grupos tenían realmente a algunos cerdos que de hecho tenían algunos síntomas respiratorios con una condición o comportamiento corporal de constipado.

15 Los grupos tratados mostraron un aumento de las temperaturas rectales promedio, por encima de 104 °F (40°C), cuatro horas después del primer acontecimiento de vacunación. Las temperaturas para los grupos del APP y omp alcanzaron o superaron los 104,9 °F (40,5°C), que era el límite de la pirexia cuatro horas después de la vacunación, y duró aproximadamente veinticuatro horas para el
20 grupo omp. Las temperaturas en los grupos volvieron a los valores de temperaturas normales el día 1 ó 3. Para el acontecimiento de refuerzo, las temperaturas sólo fueron tomadas el día 28 y no a las 4 horas o los días 1, 3 y 5 después de la vacunación como con la primera vacunación. Durante el período de refuerzo, el día 28 el grupo APP fue estadísticamente diferente ($p < 0,05$) según se comparaba con los grupos de
25 las células enteras y el sobrenadante. Durante el período de exposición, los controles de exposición tenían una temperatura rectal global más alta tanto al principio como al final del período. El grupo de células enteras tenía las temperaturas rectales más altas los días 38 y 39. El grupo de control de exposición tenía el tanto por ciento total más alto de animales febriles (10/15) seguido de los grupos de células enteras (8/15), OMP
30 (5/15), sobrenadante (2/15) y APP (1/15), respectivamente.

 El aislamiento bacteriano fue el más alto en las muestras de amígdala y pulmón. La recuperación más alta de *A. suis* ocurrió en el grupo de control de exposición. El grupo de control estricto fue negativo para *A. suis* excepto en las muestras nasales y de amígdala, que tenían 3 de 10 y 1 de 10, respectivamente. Estos
35 resultados fueron registrados como un aspecto positivo y no fueron verificados por

BCA u otros medios. Los motivos posibles de estos resultados podrían haber sido una mala lectura involuntaria de la placa de agar-agar o un acontecimiento de contaminación inespecífico durante el procesamiento de las muestras. Además, tres parámetros tuvieron tasas de recuperación muy bajas de *A. suis* que eran de bazo, meninges y sangre de corazón, y por eso, no fueron incluidos en el análisis. En general, la tasa de septicemia fue baja debido a la baja recuperación de *A. suis* en los órganos viscerales y sangre de corazón. También hubo ensayos de que esta exposición cruzaba la barrera sangre-cerebro en tres de los animales que fueron infectados con severidad. Otras bacterias detectadas fueron estreptococos alfa y beta de *Bordetella*.

Se realizaron ensayos de serología usando un procedimiento de transferencia Western para analizar la reactividad frente al artículo de ensayo que fue usado para vacunar a los grupos de tratamiento. Los ensayos de transferencia Western mostraron una seroconversión detectable respecto a las fracciones de células enteras, sobrenadante y omp en una dilución 1:100. La fracción APP tenía la mejor reactividad y era detectable en una dilución de 1:1000, confirmando que el huésped reconocía alguna parte de las fracciones usadas para la vacunación de cada grupo de tratamiento.

En general, la mejor protección ocurrió en los cerdos vacunados con vacunas prototipo de APP y sobrenadante. Comparativamente, ni las vacunas de células enteras ni las de omp o antígenos derivados de LPS proporcionaron mucha protección a partir de la exposición de *A. suis*. Se proporcionan los detalles del estudio de exposición en los Ejemplos de más abajo.

A menos que sea definido de otra manera, todos los términos y expresiones técnicas y científicas usadas en este documento tienen el mismo sentido que es comúnmente entendido por cualquier experto en la técnica para el cual esta invención pertenece en el momento de la presentación. Si se define expresamente, entonces la definición proporcionada en este documento prevalece sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que se requiera de otra forma por el contexto, los términos en singular incluirán los plurales, y los términos en plural incluirán el singular. En este documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se establezca de otra forma. Todas las patentes y publicaciones referidas en este documento son incorporadas como referencia.

49

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas detectadas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y que así pueden pensarse como que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, a la luz de la presente descripción, deben apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que son descritas y que todavía se obtienen resultados parecidos o similares sin alejarse del espíritu y del alcance de la invención.

EJEMPLO 1: Vacunas Prototipo y Tratamiento de Exposición

A. Preparación de Prototipos de Vacuna

Crecimiento de cultivos de *A. suis* (KSU-1): Un mililitro del lote (103007-1KSU) N°. 201-9,10,11 de *A. suis* se usó para inocular 150 ml del medio BHI (lote N°. 195-121) en un centrifugador de 250 ml. Los medios inoculados se colocaron a 37°C a aproximadamente 72 revoluciones por minuto durante seis horas. Después, se añadieron aproximadamente 2,5 ml del medio inoculado a aproximadamente 2500 ml de medio BHI recién preparado. Esta etapa fue repetida hasta que se prepararon cuatro lotes de 2500 ml. Los cuatro lotes se incubaron a 37°C toda la noche a aproximadamente 72 revoluciones por minuto. Se usaron dos lotes para aislar las fracciones de OMP, células enteras y sobrenadante, se usó un lote para preparar una fracción de células enteras concentradas, y el lote final se usó para la extracción del LPS.

Cosecha de las fracciones celulares: Las densidades ópticas de los lotes se leyeron quince horas después de la inoculación. Las densidades ópticas estaban en el intervalo de 0,775 a 0,815 a 600 nm. Los BAP fueron rayados de cada cultivo para verificar que los cultivos eran puros para *A. suis*.

Para recuperar las fracciones de OMP y sobrenadante, se transfirieron dos lotes de cultivo a tubos de centrifugadora de 500 ml, se colocaron en un rotor JA-10, y se centrifugaron a 10 K durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron decantados, y los peletes fueron transferidos dentro de tubos de centrifugadora de 250 mL estériles Corning. Los peletes se centrifugaron a aproximadamente 5000 revoluciones por minuto en un rotor JA-10 durante 10 minutos, y los sobrenadantes restantes se retiraron. Los peletes se reunieron y se colocaron a -80°C hasta la extracción del

sarcosilo (véase más abajo). Los sobrenadantes decantados fueron reunidos, y filtrados en filtros de 0,45 μ m (Nalgene 0.45 SFCA) en botellas de Pyrex de 2 L estériles. El sobrenadante filtrado fue repartido en alícuotas en 2 x 850 cm RBs, viales de 81 x 5 mL, y botellas de 4 x 250 mL de Nalgene. El sobrenadante filtrado se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para recuperar la fracción de pelete de células enteras concentrada (10x), se recogió un lote de cultivo como antes, pero los peletes se resuspendieron en 300 mL de tampón TSP. La solución fue mezclada bien y se repartió en alícuotas en viales de 50 x 2 mL y botellas de vacuna de 4 x 50 mL. Los peletes de células enteras resuspendidas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para preparar la fracción LPS, el cultivo de *A. suis* se cosechó como se describe antes. Los peletes se resuspendieron en tampón 1x PBS y se centrifugaron de nuevo a 10K revoluciones por minuto durante diez minutos. Los sobrenadantes fueron decantados, y los peletes se resuspendieron en 1 L de tampón 1x PBS. Una lectura de densidad óptica a aproximadamente 600 nm fue 1,003, que está dentro del intervalo esperado de 0,8-1,200 para la extracción de LPS. La fracción de LPS fue repartida en alícuotas en botellas de 3 x 250 mL de Nalgene y fue almacenada a -80°C hasta su uso. El volumen restante de la fracción de LPS se almacenó a 4°C para la extracción de LPS.

Vacuna inactivada por formalina de células enteras de KSU-1: La densidad óptica (OD) del cultivo celular medido a una longitud de onda de 600 nanómetros fue a 0,775 en el momento de la recuperación. En estudios anteriores, esta densidad óptica ha guardado correlación en aproximadamente 8,7 log/mL según la curva de estimación logarítmica para determinar el log/mL según las unidades formadores de colonia (cfu). La fracción de células enteras se concentró 10x y se congeló. La disolución madre congelada fue inactivada por formalina entonces, y se diluyó (54 mL del cultivo en 26 mL de la solución salina tamponada de fosfato 1x (pbs), al 67,5 % de la fracción total. La disolución madre de vacuna inactivada diluida fue almacenada entonces a 4°C.

La disolución madre de vacuna inactivada por formalina de células enteras fue eliminada a partir de 4°C para la formulación. Trabajando en una campana de bioseguridad, se repartieron en alícuotas 80mL del material en una botella estéril de Pyrex de 100 mL que contenía una barra de agitación magnética. La botella fue colocada en una placa de agitación, y con agitación continua, se añadieron 20 mL (20 % v/v) del adyuvante (Emulsigen ®-D) en 1 minuto. El prototipo con el adyuvante se agitó entonces durante unos 10 minutos más. El material se transfirió a una botella de

vacuna de 100 mL donde se tapó y colocó a 4°C. Los números de lote para el prototipo de vacuna inactivado por formalina de células enteras fueron N201-110-WC-073108 (día 7) y N201-122-WC-082108 (día 21).

La esterilidad fue verificada por ningún crecimiento en la placa de agar-agar de sangre de ovejas al 5 % (BAP) después de 28 horas y 30 horas de una incubación aeróbica de 37°C el día 0 y día 21, respectivamente. El material del prototipo de vacuna se mantuvo en hielo antes de la administración a los animales de ensayo y durante todo el procedimiento de administración de la vacuna.

10 Vacuna inactivada por formalina del sobrenadante de KSU-1: El prototipo de sobrenadante fue formulado a partir de la etapa de concentración 10x de la preparación de la fracción de células enteras (véase antes) recogiendo el sobrenadante y filtrándolo a través de un filtro de 0,45 micras. El sobrenadante filtrado resultante se congeló. Este sobrenadante se inactivó entonces con formalina y se
15 almacenó a 4°C hasta su formulación. La etapa de formulación fue como para la vacuna inactivada por formalina de células enteras. Los números de lote para el prototipo de vacuna inactivada por formalina del sobrenadante fueron N201-110-Supe-073108 (día 7) y N201-122-Supe-082108 (día 21).

Se verificó la esterilidad, y el material del prototipo de vacuna fue mantenido antes de la administración a los animales de ensayo y durante todo el procedimiento de administración de vacuna según se describe anteriormente.

Vacuna de la fracción de OMP de KSU-1: La fracción de OMP fue producida a partir de peletes preparados a partir de un cultivo de KSU-1 (aislado BI-103007-1KSU) y se
25 almacenó a -80°C usando el procedimiento de extracción de sarcosilo de OMP siguiente. Los peletes se descongelaron en la superficie de la mesa de trabajo. Los peletes se resuspendieron (22,5 g de peso mojado) con 130 mL de una solución salina equilibrada de HEPES 10 mM y se repartieron en alícuotas en cuatro tubos Falcon cónicos de 50 mL (40 mL/tubo). (Una muestra de pelete resuspendida de 1 mL fue
30 retenida para la cuantificación y análisis de la proteína.) Los peletes resuspendidos se colocaron en un baño de hielo y se sonicaron durante 1 minuto usando una sonda (Large / Microtip) (partes alícuotas de 50 mL) con un ajuste de pulso de sonicación de 1 pulso/segundo. La sonicación fue repetida tres veces. (Una muestra de postsonicación de 1 mL fue retenida.) Los peletes sonicados se centrifugaron a 17.000
35 x g durante 20 minutos en tubos de 50 mL. Después, los sobrenadantes se decantaron

y se reunieron en un contenedor separado. Los peletes se almacenaron a 4°C hacia el final de un ensayo de ácido bicinonínico (BCA) y luego fueron desechados.

Los sobrenadantes reunidos se sometieron a una ultra-centrifugadora, ~0,0128 kilogramos/tubos, en un ajuste de 124.000 x g (30.000 revoluciones por minuto), 1:10 horas, 4°C, con la aceleración máxima, y ningún freno. Los sobrenadantes se decantaron, se reunieron con el sobrenadante más temprano, y se almacenaron a 4°C. Aproximadamente se añadió 1 mL de HEPES 10 mM encima de cada pelete en los tubos de la ultra-centrifugadora, y los peletes fueron incubados toda la noche a 4°C para soltar los peletes de los tubos. Se añadieron otros 2 mL de HEPES 10 mM a cada tubo para resuspender los peletes. Cada solución de pelete resuspendida era q.s. a 6 mL (volumen total) con HEPES 10 mM, y se añadieron 6 mL de sarcosilo al 2 % a cada uno. Las soluciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, los tubos fueron equilibrados en los álabes de la ultra-centrifugadora (~0,0128 kilogramos/tubos) usando sarcosilo al 2 % y se sometieron a una ultra-centrifugadora a 124.000 x g, 1:10 hora, 4°C, con aceleración máxima, y ningún freno. Los sobrenadantes se recogieron en un recipiente, y se añadió 1 mL de HEPES 10 mM a cada pelete. Los peletes de OMP se almacenaron a 4°C durante 1 hora antes de medir la concentración de proteína o de la visualización de las proteínas.

Las muestras por duplicado (dilución 1:10) se corrieron en un gel de SDS PAGE Bis-Tris al 10-12 % de MOPS o un gel de Bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE para visualizar las bandas de proteína. Las concentraciones de proteína totales de la disolución madre de OMP final fueron determinadas usando el BCA y se determinaron antes de la formulación con el adyuvante. Según los valores obtenidos por BCA, la masa total de la proteína contenida en la disolución madre de extracción OMP fue 1,75 µg/mL. Según este valor, la potencia del prototipo de OMP de la vacuna formulada fue 250 µg/dosis. La fracción de OMP resuspendida y extraída fue repartida en alícuotas en muestras de 200 µl, fue marcada y congelada a -70°C.

Cinco viales que contenían 0,5 mL de la fracción de OMP extraída fueron quitados a partir de -70°C. Estos viales se descongelaron a temperatura ambiente. Trabajando en una campana de bioseguridad, fueron repartidos en alícuotas 23,25 mL de la solución salina tamponada de fosfato 1x (pbs) y 2,35 mL del material OMP en una botella de Pyrex de 100 mL estéril que contenía una barra de agitación magnética. La botella fue colocada en una placa de agitación, y con agitación continua, se añadieron 6,4 mL (20 % v/v) del adyuvante (Emulsigen ®-D) en 1 minuto. La vacuna

prototipo de OMP con adyuvante se agitó entonces durante unos 10 minutos adicionales. La vacuna prototipo de OMP se transfirió a una botella de vacuna de 60 mL que se tapó y colocó a 4°C. Los números de lote para el prototipo de vacuna de OMP fueron N201-110-OMP-073108 (día 7) y N201-122-OMP-082108 (día 21).

- 5 La esterilidad fue verificada, y el material prototipo de vacuna fue mantenido antes de la administración a los animales de ensayo y durante todo el procedimiento de administración de vacuna según se describe anteriormente.

- 10 Vacuna APP-ALC Ingelvac ®: Una botella de APP-ALC fue quitada de - 70°C y se descongeló en agua caliente tibia. Una vez descongelada, se retiró una muestra usando una aguja estéril del calibre 16 y se colocó en una botella de vacuna para realizar los ensayos de potencia. La botella de la vacuna fue colocada a 4°C. Las titulaciones de Ingelvac APP-ALC fueron realizadas los días 0 y 21 para determinar las unidades formadores de colonia (CFU) por dosis. Las muestras se diluyeron en serie
15 10 veces y se pusieron en placas de agar-agar Mueller Hinton Chocolate. Se realizaron tres repeticiones y se dejaron incubar a 37°C durante 24 horas antes de determinar las CFU. Las unidades formadores de colonia fueron respectivamente en el Día 0: 9,99 log/dosis y el Día 21: 10,2 log/dosis. Los números de lote para la vacuna Ingelvac ® APP-ALC fueron N201-110-APP-073108 (día 0) y N201-122-APP-082108
20 (día 21).

El material prototipo de vacuna fue mantenido antes de la administración a los animales de ensayo y durante todo el procedimiento de administración de la vacuna según se describe anteriormente.

- 25 Vacuna placebo. Trabajando en una campana de bioseguridad, se tomó una alícuota de 60 mL de solución salina tamponada de fosfato 1x (pbs) y se puso dentro una botella de Pyrex de 100 mL estéril que contenía una barra de agitación magnética. La botella fue colocada en una placa de agitación, y con agitación continua, se añadieron 15 mL (20 % v/v) del adyuvante (Emulsigen ®-D) en 1 minuto. El prototipo del
30 adyuvante se agitó entonces durante unos 10 minutos más. El material se transfirió a la botella de la vacuna de 100 mL que se tapó y colocó a 4°C. El N°. de lote para la vacuna placebo fue N 201-109.

- 35 Fue verificada la esterilidad, y el material prototipo del placebo fue mantenido antes de la administración a los animales de ensayo y durante todo el procedimiento de administración de la vacuna según se describe anteriormente.

B. Preparación del Tratamiento de Exposición

La cepa de exposición usada fue el aislado de *A. suis* ISU-8594 p5. El material de exposición fue producido inoculando un matraz del centrifugador de Belco de 1 litro que contenía 800 mL de medio porcino de infusión de cerebro-corazón (BHI-porcino) con 5 mL de ISU-8594 p4. El centrifugador se colocó en una incubadora a 37°C a ~100 revoluciones por minuto. El cultivo fue cultivado a una densidad óptica (OD₆₀₀) de 5 horas 0,109 -aproximadamente 5 horas y 30 minutos después de la inoculación. El cultivo se transfirió entonces a botellas de vacuna de 6 x 100 mL que contenían 100 mL de volumen total que se cerraron y taponaron. Cinco de las botellas fueron colocadas en un refrigerador que contenía barras de hielo y una botella que sirvió para representar las otras cinco botellas para las titulaciones fue colocada en otro refrigerador que contenía barras de hielo. El título del material de exposición fue determinado por la cuenta de CFU generada a partir de diluciones de 10 veces en series en placas agar-agar de sangre de oveja al 5 %. El título de la exposición obtenido fue $1,69 \times 10^8$ cfu(s)/mL o 9,0 log/6 mL dosis. El N°. de lote para el material de exposición fue N201-138.

El material de exposición se mantuvo en hielo antes de la administración a los animales de ensayo y durante todo el procedimiento de exposición.

20 EJEMPLO 2: Vacunación de Cerdos

Una mezcla de animales porcinos machos y hembras esterilizados de un cruce comercial y de 3 semanas $\pm$ 7 días de edad fue obtenida de las Granjas de Wilson Praire View. Los animales estaban sanos sin signos de enfermedad respiratoria clínica y daban negativo respecto a patógenos respiratorios bacterianos tales como *A. pleuroneumonía*, *H. parasuis*, *S. suis*, *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *E. rhusiopathiae* y *A. suis*. Aunque se hizo la concesión de que se excluirían los animales del estudio siempre y cuando se hicieran patentes problemas de salud sin relación con la vacunación o la exposición, ningún animal fue retirado.

En el momento de la llegada al sitio de ensayo, todos los animales recibieron un tiro de 1 mL de Excenel ® (un antibiótico de actuación corta). Los animales se alojaron en el sitio de ensayo hasta que el estudio fue terminado. Los animales se marcaron en la oreja a la llegada, y se alojaron apropiadamente por especie, edad, tamaño y condición. Los cerdos de la exposición y de control estricto fueron alojados juntos en pocilgas separadas en un edificio separado lejos de los otros grupos de tratamiento. En el momento de la exposición, los controles de exposición fueron

23

trasladados dentro del mismo edificio que los grupos tratados. Todos los grupos de tratamiento fueron alojados en pocilgas separadas en todas las etapas del estudio. Los animales fueron provistos de una ración que no tenía antibióticos y que era apropiada para la especie, edad, tamaño y condición de los animales. Los animales tenían buena salud y estado alimenticio al inicio del estudio. Se realizó un chequeo de salud por un veterinario clínico según la práctica veterinaria generalmente aceptada con cada animal antes de la inclusión en el estudio.

Se usó un generador de números aleatorios informático (Microsoft Office Excel) para asignar a cada animal un número aleatorio único. El número aleatorio fue clasificado entonces en orden ascendente. Las asignaciones se hicieron asignando las unidades experimentales a través de grupos de tratamiento comenzando con el bloque más bajo de números aleatorios y asignándolos a los grupos de tratamiento 1 a 6. Aumentando el número aleatorio, el siguiente bloque de unidades experimentales fue asignado entonces a los grupos de tratamiento, etcétera, hasta que todos los animales se asignaron a un grupo de tratamiento.

Este estudio de eficacia consistió en 6 grupos de tratamiento de cerdos destetados de 3 semanas $\pm$ 7 días. El grupo de tratamiento 1 (15 cerdos) recibió una dosis (1M) intramuscular de 1 x 2mL de células enteras inactivadas por formalina de *A. suis* los días 0 y 21 del estudio, respectivamente. El grupo de tratamiento 2 (15 cerdos) recibió una dosis 1M de 1 x 2 mL del sobrenadante de cultivo de *A. suis* inactivado por formalina los días 0 y 21 del estudio, respectivamente. El grupo de tratamiento 3 (15 cerdos) recibió una dosis 1M de 1 x 2 mL de proteína de membrana externa (omp) de *A. suis* los días 0 y 21 respectivamente. El grupo de tratamiento 4 (15 cerdos) recibió una dosis 1M de 1 x 2mL de Ingelvac® APP-ALC los días 0 y 21 respectivamente. El grupo de tratamiento 5 (15 cerdos) denominado "controles de exposición" recibió una dosis de 1 x 2mL de placebo por la ruta de administración IM los días 0 y 21 respectivamente. El grupo de tratamiento 6 (10 cerdos) fue denominado "controles estrictos" y no recibió el tratamiento de placebo o vacuna. Todos los grupos fueron observados durante 41 días.

El Día 35 del estudio, los Grupos 1-5 recibieron una dosis/cerdo de 6 mL (3 mL aplicados a cada fosa nasal por cerdo) de una inoculación de la cepa ISU-8594 de *A. suis* vía intranasal (IN) que contenía $1 \times 10^{9.0}$ log/dosis. El grupo 6, grupo "control estricto", no recibió ningún tratamiento o exposición.

Las temperaturas rectales fueron recogidas de todos los animales antes del tratamiento durante el Día 0; 4 horas después de la inoculación; y el 1 día (s) después de la inoculación (DPI), 3, 5, 7, 14, 21, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41 DPI.

5 Fue recogida sangre entera venosa (6-10 mL) de cada animal antes del tratamiento el Día 0 y cada semana (Días 7, 14, 21, 28, 34 y 41) para los futuros ensayos serológicos.

Los sitios de inyección se examinaron antes del tratamiento y a las 4, 24, 48 y 72 horas después de la inoculación en todos los cerdos de los Grupos 1-5. Los sitios de inyección se examinaron según la hinchazón, dureza y tamaño. Los datos fueron documentados. Se usó el siguiente sistema de valoración para las observaciones del sitio de inyección: hinchazón (0 = ninguna, 1 = hinchazón presente), aspecto (0 = normal, 1 = dura, 2 = blanda, 3 = abscedado, 4 = supuración), tamaño (0 = normal, para todos los otros, se registraron las dimensiones de longitud por anchura en centímetros (es decir, longitud x anchura x diámetro)).

15 Se realizaron observaciones clínicas diariamente a partir del Día 0 hasta el Día 41 para cualquier signo de dificultad respiratoria incluyendo respiración laboriosa, estornudos, toses, movimientos respiratorios alterados, anorexia, cojera, hinchazón de las articulaciones, deshidratación, capacidad de estar de pie, agitación de patas, moribundo durante 2 o más días consecutivos, o muerte.

20 Los animales que tuvieron síntomas clínicos severos durante el estudio fueron dignamente sacrificados y se les hizo la autopsia para determinar la causa de su muerte. El Día 41 del estudio, todos los animales se sacrificaron y todas las secciones de pulmón se marcaron para determinar el porcentaje de patología pulmonar. Las muestras recientes y fijadas (pulmones sólo) de pulmón (3 lóbulos con lesiones, si estaban presentes), hígado, riñón, bazo, amígdala y muestras de cornetes nasales, tráquea, bronquios, meninges, y sangre de corazón fueron recogidas de cada animal y cultivadas para su aislamiento bacteriano e histopatología (pulmones sólo).

EJEMPLO 3: Evaluación de la Eficacia de Vacunas Prototipo

30 A. Análisis Estadístico

Se realizó el análisis estadístico usando la versión 9.1.3 de SAS para el procesamiento de los datos y el análisis. Las estadísticas sumarias incluyendo media, desviación estándar, error estándar, mediana, variedad, intervalos de confianza del 95 %, coeficiente de variación y distribuciones de frecuencia fueron generadas para todos los datos cuando fue apropiado. Los análisis incluyeron todas las comparaciones en

pares entre todos los grupos de tratamiento de lechones. Todos los ensayos de significancia eran de dos colas con un nivel $p < 0,05$ para determinar las diferencias entre los grupos de tratamiento.

Los Parámetros de Eficacia Primarios fueron valores de lesión microscópicas y valores de lesión graves distribuidos no normalmente que fueron comparados por la Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon y la Prueba Exacta de Fisher. Los Parámetros de Eficacia Secundarios fueron (1) síntomas clínicos que fueron comparados usando la Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon; (2) la pirexia que fue comparada usando la Prueba Exacta de Fisher y ANOVA; (y 3) el aislamiento bacteriano fue comparado usando la Prueba Exacta de Fisher.

B. Animales Moribundos

Dos animales fueron quitados del estudio después de la iniciación del estudio. Se encontró muerto al animal ID N°.31 (grupo de tratamiento 4) el día 11 del estudio. El examen de gravedad mostró que este cerdo tenía una pobre condición y estaba delgado. Sus pulmones tenían una decoloración roja y morada, y su abdomen tenía exudados purulentos con peritonitis fibrosa. El presunto diagnóstico fue HPS o una infección por estreptococos. Los cultivos bacteriológicos fueron realizados en tejido reciente y las muestras usando técnicas estándares aceptadas en la técnica. Las colonias bacterianas recuperadas fueron analizadas, y el análisis encontró que el cerdo estaba infectado por *Arcanobacterium pyrogenes*, *Aeromonas hydrophilia* y *Citrobacter freundii*. La histopatología en muestras pulmonares fijadas no indicó ninguna prueba de pulmonía, necrosis, pleuritis, o de colonias bacterianas presentes.

Fue encontrado muerto el animal ID N°.32 (grupo de tratamiento 1) el día 36, un día después de la exposición. El examen de gravedad mostró que los pulmones de este cerdo tenían fibrinosis severa y fluido en la cavidad del pecho. Sus pulmones tenían áreas de consolidación y hemorrágicas grandes. El presunto diagnóstico era muerte aguda debido a la exposición de *A. suis*. Fueron realizados los cultivos bacteriológicos en tejido reciente y muestras. El *Actinobacillus suis* fue recuperado en todo el tejido y se recogieron las muestras, excepto de bazo y tráquea. La histopatología en las muestras de pulmón fijado mostró pruebas de pulmonía severa, necrosis, pleuritis y colonias bacterianas presentes.

C. Observaciones Generales

Fueron observados los animales diariamente a partir de la administración de vacunación/placebo para exponerlos (días 0 a 35) a acontecimientos adversos atribuidos al tratamiento con artículos de ensayo/control u otras anormalidades de salud derivadas de la falta de tratamiento.

5 Las observaciones de salud general para los cerdos en los grupos de control de exposición y control estricto (grupos 5 y 6) fueron como sigue: Cerdo N°.71 (control de exposición) comenzó a mostrar signos de cojera en su frente derecho el día 7 y persistió hasta el día 24 antes de que los síntomas cesaran. El resto de los cerdos estuvieron normales durante este período de observación.

10 Las observaciones de salud general para los cerdos en los grupos de tratamiento de vacuna (grupos 1-4) fueron como sigue: Cerdo ID N°.51 (célula entera, grupo 1) mostró una condición corporal pobre el día 1 y persistió durante tres días. En el grupo de tratamiento 4 (APP, grupo 4) el Cerdo ID N°. 31 fue quitado del estudio como se dice antes. Los cerdos restantes en los grupos 1 a 4 presentaron una salud
15 normal.

Las reacciones del sitio de inyección para los grupos de tratamiento vacunados IM 1, 2, 3 y 4 fueron como sigue: los Cerdos N°.35 (sobrenadante, grupo 2) y N°.10 (APP, grupo 4) tenían hinchazón de un área de 1 x 1 cm² registrada los días 1, 2 y 3 del estudio. Ninguna evaluación del sitio de inyección se registró para el
20 acontecimiento de vacunación del día 21. Las observaciones clínicas revelaron hinchazón en el cuello en el cerdo N°.10 (APP, grupo 4) los días 4 y 5, el cerdo N°.20 (APP, grupo 4) los días 26 y 29, el cerdo N°.40 (APP, grupo 4) los días 19 a 35, el cerdo N°.41 (APP, grupo 4) los días 26 a 35, y el cerdo N°.46 (APP, grupo 4) los días 14 a 35. Todos los animales restantes mostraron una disposición normal y sana
25 durante este período de observación.

En el momento de la autopsia, los cerdos N°.69 y N°.75 ambos en el grupo de tratamiento 1 (células enteras) fueron registrados con abscesos de cuello en el sitio de inyección. No se apreció ninguna otra observación adversa del sitio de inyección durante la autopsia.

30

D. Parámetros de Eficacia Primarios

1. Lesiones graves

En la autopsia (día 41 del estudio), se retiraron los pulmones de cada cerdo y se examinaron las lesiones graves. Los lóbulos individuales se valoraron según el
35 tanto por ciento de participación, y se asignó un resultado total a cada cerdo individual.

29

La tabla 1 muestra los valores de lesión pulmonar promedio para cada grupo de tratamiento y el número de animales con un resultado positivo por grupo.

Tabla 1. Valores de lesión pulmonar grave promedio por grupo de tratamiento y número de animales con un valor grave positivo dentro de los grupos.

Grupo	Tratamiento	N	Promedio	Tanto por ciento con lesión presente
1	Células Enteras	15	26,73	66,67% (10/15)
2	Sobrenadante	15	12,68	60,00% (9/15)
3	OMP	15	21,69	80,00% (12/15)
4	APP	14	16,25	50,00% (7/14)
5	Exposición	15	28,67 ^a	86,67 ^a (13/15)
6	Estricto	10	0,00 ^a	0,00 ^a (0/10)

^aLas comparaciones de los Grupos 5 y 6 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon y Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

Utilizando la Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon y la Prueba Exacta de Fisher respecto al número de lesiones positivas por grupo, se realizaron análisis estadísticos para comparar las medias entre los grupos de tratamiento 5 y 6 y los grupos 1-4 y 5 respecto a los valores de lesión graves promedio. El grupo de tratamiento 6 (controles estrictos) fue negativo para el desarrollo de lesiones graves (0) y el número de valores positivos en tanto por ciento (0 %). La evaluación de los grupos 1-5 de los valores de lesiones pulmonares promedio y el tanto por ciento con una lesión estaba en el intervalo de 12,68 a 28,67 de unos 100 posibles y del 50,00 % al 86,67 % respectivamente.

El grupo de tratamiento 5 (exposición), recibió el valor de lesión pulmonar grave promedio más alto (28,67) y el tanto por ciento con un valor de lesión pulmonar (86,67 %) comparado con los otros grupos de tratamiento. El grupo de tratamiento 5 fue significativamente diferente (p <0,05) del grupo de tratamiento 6, cuando se comparaba los valores de lesiones pulmonares graves promedio y el tanto por ciento positivo con una lesión. El grupo de tratamiento 2 (sobrenadante) recibió el valor de lesión más bajo (12,68), pero tenía un valor de lesión en tanto por ciento que era el

segundo más bajo (el 60,00 %) comparado con el grupo de tratamiento 4 (APP) que tenía el valor de lesión en tanto por ciento más bajo (50,00 %). Las comparaciones de los grupos 4 y 5 para el tanto por ciento con un valor de lesión pulmonar eran casi estadísticamente diferentes ($p=0,0502$). Además, las comparaciones del grupo de tratamiento para el valor de lesión grave de los grupos 4 y 5 y grupos 2 y 5 no eran estadísticamente diferentes, ($p <0,0840$) y ($p <0,0685$) respectivamente. Numéricamente, el grupo de tratamiento 1 (células enteras) tenía el segundo valor de lesión pulmonar promedio más alto de 26,73 seguido del grupo de tratamiento 3 (omp) con un valor de 21,69. El grupo de tratamiento 3 (omp) tenía el segundo número más alto de lesiones en tanto por ciento presentes con el 80,00 % seguido del grupo de tratamiento 1 (célula entera) con el 66,67 %.

2. Lesiones microscópicas

Las secciones pulmonares fueron recogidas, fijadas y enviadas al Veterinario del Estado de Iowa del Laboratorio Diagnóstico para la evaluación del desarrollo de lesiones microscópicas no específicas (es decir, pulmonía, necrosis y pleuritis) y la presencia de colonias bacterianas. Los valores estaban basados en una escala nominal de 1 a 3 siendo 1 suave, siendo 2 moderado y siendo 3 severo. Los grupos fueron comparados según la severidad de la lesión promedio y la presencia de colonias bacterianas (bichos) presentes dentro de cada tejido, y la frecuencia de positivos para cada grupo se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de lesión microscópica promedio por grupo de tratamiento y número de animales con un valor microscópico positivo dentro de los grupos.

Grp	Tratamiento	N	Lesión bronco-neumonia	Necrosis	Pleuritis	Bronco-neumonia	Necrosis	Pleuritis	Colonias Bacterianas
1	Células Enteras	15	1,07	0,67	1,67	53.33% (8/15)	40,00% (6/15)	60,00% (9/15)	20,00% (3/15)
2	Sobrenadante	15	0,87	0,8	1,13	46,67% (7/15)	40,00% (6/15)	46,67% (7/15)	33.33% (5/15)
3	OMP	15	1,60	1,47 ^c	1,60 ^c	66,67% (10/15)	60,00% (9/15)	66,67% (10/15)	46,67% (7/15)
4	APP	15	0,93	0,47 ^c	0,67 ^{b>c}	46,67% (7/15)	26,67% (4/15)	46,67% (7/15)	20,00% (3/15)
5	Exposición	15	1,27 ^a	0,93 ^a	1,93 ^{a,b}	66,67% ^a (10/15)	46,67% ^a (7/15)	66,67% ^a (10/15)	40,00% (6/15)
6	Estricto Control	10	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00% ^a (0/10)	0,00% ^a (0/10)	0,00% ^a (0/10)	0,00% (0/10)

^aLas comparaciones de los Grupos 5 y 6 son estadísticamente significativas y diferentes ($p < 0,05$, Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon y Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

5 ^bLas comparaciones de los Grupos 4 y 5 son estadísticamente significativas y diferentes ($p < 0,05$, Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon y Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

^cLas comparaciones de los Grupos 3 y 4 son estadísticamente significativas y diferentes ($p < 0,05$, Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon y Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

10

Utilizando la Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon, se realizaron análisis estadísticos para comparar las medias entre grupos de tratamiento respecto a los valores de lesiones pulmonares microscópicos promedio. La Prueba Exacta de Fisher también fue realizada respecto al número de valores positivos para el tanto por ciento de animales positivos por grupo para cada parámetro. Las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) fueron encontradas comparando los grupos de tratamiento 5 (exposición) y 6 (control estricto) para los valores de lesión por bronconeumonía, necrosis y pleuritis, y el tanto por ciento positivo. Los valores fueron cero en todos los parámetros para el grupo de tratamiento 6 (controles estrictos) (Tabla 2).

20 Los valores de lesión por bronconeumonía más altos (1,60) fueron encontrados en el grupo de tratamiento 3 (omp) seguido del grupo de tratamiento 5 (1,27) (exposición). El valor recibido más bajo (0,87) estaba en el grupo 2 (sobrenadante) seguido del grupo 4 (0,93) (APP). Los valores para la bronconeumonía estaban en el intervalo de 0,87 a 1,60. La comparación de los valores de lesión de necrosis para los grupos de tratamiento 1-5 estaban en el intervalo de 0,47 encontrado en el grupo 4 (APP) a 1,47 encontrado en el grupo 3 (omp). Las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) fueron encontradas comparando los grupos de tratamiento 3 y 4 para la necrosis. Otras comparaciones de los grupos de tratamiento 1-5 para el parámetro de pleuritis revelaron valores de lesión que estaban en el intervalo de 0,67 en el grupo 4 (App) a 1,93 en el grupo 5 (exposición). Las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) fueron encontradas comparando los grupos de tratamiento 3 y 4, y 4 y 5 para la pleuritis. La comparación de los grupos de tratamiento 1 y 4 estaba muy cerca de ser estadísticamente diferente ($p = 0,0544$).

35 Las comparaciones numéricas de los positivos en tanto por ciento mostraron que según se comparaba a los grupos de tratamiento 1, 2, 4 y 5, el grupo de

tratamiento 3 (omp) recibió los valores más altos para bronconeumonía, necrosis, pleuritis y colonias bacterianas del 66,67 %, 60,00 %, 66,67 % y 46,67 %, respectivamente. Los valores más altos fueron compartidos con el grupo de tratamiento 5 (exposición) para los parámetros de bronconeumonía y pleuritis.

5 Además, las comparaciones de los positivos en tanto por ciento mostraron que según se comparaba a los grupos de tratamiento 1, 2, 3 y 5, los valores más bajos estaban en el grupo de tratamiento 4 (APP) para bronconeumonía, necrosis, pleuritis y colonias bacterianas del 46,67 %, 26,67 %, 46,67 % y 20,00 %, respectivamente. El grupo de tratamiento 2 (sobrenadante) tenía los mismos valores más bajos en los parámetros

10 de bronconeumonía y pleuritis como el grupo 4 y el grupo 2 y el grupo 1 (célula entera) tenía la misma frecuencia de las colonias bacterianas presentes. No se encontró ninguna diferencia estadística para los positivos en tanto por ciento en los parámetros enumerados en la Tabla 2.

15 **E. Parámetros de Eficacia Secundarios**

Fueron usados parámetros secundarios para apoyar los parámetros de eficacia primarios en este estudio. Fueron realizados análisis estadísticos en los parámetros secundarios siguientes.

20 **1. Observaciones clínicas**

Se hicieron observaciones para los síntomas clínicos a partir del día de vacunación en todas las etapas del estudio (días 0 a 41). Cuatro parámetros principales fueron valorados: condición corporal (flaqueza) en una escala de 1 a 3 siendo 1 normal y 3 para muerto; comportamiento (depresión); locomoción; y

25 respiración, cada uno en una escala de 1 a 4 siendo 1 normal y 4 para muerto. Un valor clínico promedio se usó a partir de todos los 4 parámetros por los cuales un animal normal y sano recibió un valor de 1 mientras que un animal afectado con severidad (muerto) podría tener un valor máximo de 3,75. La Tabla 3 muestra los valores promedios por grupo de tratamiento. Usando la Prueba de Dos Muestras de

30 Wilcoxon, el análisis estadístico fue realizado sólo para comparar los grupos 1 a 5 respecto a los valores de observación clínicos promedio.

51

Tabla 3. Valores clínicos promedio diarios para periodos de pre-exposición y post-exposición dentro de cada grupo de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Días de Pre-exposición (0-35)	Post-exposición						Días de Post-exposición (36-41)
			Día 36	Día 37	Día 38	Día 39	Día 40	Día 41	
1	Células Enteras	1,001 ^{a,b}	1,25	1,04	1,00	1,02	1,04	1,07	1,068 ^a
2	Sobrenadante	1,000 ^{a,b}	1,03	1,03	1,00	1,00 ^a	1,00 ^a	1,03 ^a	1,017 ^a
3	OMP	1,000 ^{a,b}	1,07	1,03	1,05	1,00 ^a	1,05	1,13	1,058 ^a
4	APP	1,011 ["]	1,00	1,02	1,00	1,02	1,04	1,14	1,036 ^a
5	Exposición	1,013 ^a	1,12	1,08	1,12	1,28 ^a	1,14 ^a	1,14 ^b	1,148 ^a
*6	Estricto	1,000	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000

*El grupo de tratamiento 6 no fue incluido en el análisis estadístico.

- 5
- ^aLas comparaciones de los Grupos 1-4 y 5 son estadísticamente significativas y diferentes ($p < 0,05$, Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon, cuando sea apropiado).

^bLas comparaciones de los Grupos 1-3 y 4 son estadísticamente significativas y diferentes ($p < 0,05$, Prueba de Dos Muestras de Wilcoxon, cuando sea apropiado).
- 10
- La comparación de los grupos de tratamiento 1-5 durante el período de pre-exposición reveló que durante este período de tiempo comparado con los grupos tratados 1-4 los controles de exposición no tratados tenían los valores clínicos más altos de 1,013. El grupo de tratamiento 4 (APP) tenía el segundo valor clínico promedio más alto de 1,011 seguido de los grupos 1, 2 y 3 con los valores de 1,001,
- 15
- 1,000 y 1,000 respectivamente. Fueron encontradas diferencias estadísticas ($p < 0,05$) comparando los grupos de tratamiento 1-3 y el grupo 5 de un valor promedio total para el período de pre-exposición. Además fueron encontradas diferencias estadísticas ($p < 0,05$) comparando los grupos 1-3 y el grupo 4. No se encontró ninguna diferencia estadística comparando el grupo 4 con el grupo 5.
- 20
- Durante el período de exposición fue notado que el grupo de tratamiento 5 (exposición) tenía el valor total más alto de 1,148 seguido de los grupos 1, 3, 4 y 2 con los valores de 1,068, 1,058, 1,036 y 1,017 respectivamente. Para los valores clínicos promedio totales, fueron encontradas diferencias estadísticas ($p < 0,05$) comparando los grupos 1-4 con el grupo 5. Durante el período de exposición, el grupo de
- 25
- tratamiento 5 (exposición) tenía los valores más altos los días 37 a 41. El grupo de tratamiento 1 (células enteras) tenía el valor más alto el día 36. Además, los valores del grupo de tratamiento 1 (células enteras) cayeron numéricamente al día siguiente

36 punto de 1,25 a un intervalo de 1,00 a 1,07. El valor total más bajo estaba en el grupo de tratamiento 2 (sobrenadante), y era estadísticamente diferente ($p < 0,05$) comparado con el grupo 5 (exposición) los días 39, 40, y 41. Otra comparación del grupo 4 (APP) mostró que el día 36, un día después de la exposición, había una
5 diferencia estadística ($p < 0,05$) comparado con el grupo 5 (exposición). También, el día 36 los grupos 1 y 3 eran estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) comparado con el grupo 4 (APP).

2. Temperaturas rectales

10 Para controlar los efectos de la vacunación y la exposición, fueron tomadas las temperaturas rectales en momentos diferentes en todas las etapa del estudio (Días 0, 0 + 4 horas, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, y 41). Se consideraron que los puntos eran significativos a temperaturas mayores que ($104,9^{\circ}\text{F} = 40,5^{\circ}\text{C}$). El número de animales con temperaturas que exceden el límite se pone en una lista en la
15 Tabla 4. Usando la Prueba Exacta de Fisher y ANOVA, los análisis estadísticos fueron realizados sólo para comparar los valores de pirexia para los grupos 1 a 5.

Respecto a la FIGURA 1 y a la Tabla 4 para el primer período de tiempo de vacunación del día 0 al 21, había un punto general en la temperatura rectal en todos los grupos de tratamiento con un punto mayor $> 104,9^{\circ}\text{F}$ ($40,5^{\circ}\text{C}$) en el momento
20 después de una vacunación de 4 horas en los grupos de tratamiento 3 (omp) y 4 (APP) y siguió hasta el día 1 para el grupo 3 (omp). En el grupo 1 (células enteras) hubo una disminución en la temperatura el día 7 a 102°F ($38,89^{\circ}\text{C}$), y fueron observadas diferencias estadísticas ($p < 0,05$) comparando el grupo 1 con los grupos 2-5 este día. Además, las temperaturas de los animales tratados en los grupos 1-4
25 fueron numéricamente menores que las de los grupos no tratados 4-5 el día 7. El día 21 del estudio los animales tratados tenían temperaturas numéricamente inferiores que los no tratados y se encontró que eran estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) comparando los grupos 1-4 con el grupo 5.

30

35

Tabla 4. Temperaturas rectales (°F y °C en paréntesis) a partir del día 0 hasta el día 21 (primer período de vacunación).

Grp	Tratamiento	Día 0	Día 0 + 4 h	Día 1	Día 3	Día 5	Día 7	Día 14	Día 21
1	Células Enteras	103,1 (39,5)	104,1 ^b (40,06)	103,5 ^b (39,72)	103,3 (39,61)	103,5 (39,72)	102,0 ^{a,b} (38,89)	103,4 ^{a,b} (39,67)	103,7 ^{a,b} (39,83)
2	Sobrenadante	103,2 (39,56)	104,2 ^c (40,11)	103,6 ^c (39,78)	103,3 (39,61)	103,3 (39,61)	102,8 ^{a,b} (39,33)	103,6 (39,78)	103,3 ^{a,b} (39,61)
3	OMP	103,2 (39,56)	104,9 ^{a,b,c,d} (40,5)	104,9 ^{a,b,c,d} (40,5)	103,3 (39,61)	103,3 (39,61)	102,8 ^{a,b} (39,33)	103,6 (39,78)	103,5 ^a (39,72)
4	APP	103,3 (39,61)	105,1 ^{a,b,d} (40,61)	103,9 ^c (39,94)	103,2 (39,56)	103,5 (39,72)	102,9 ^{a,b} (39,39)	103,8 ^b (39,89)	103,5 ^a (39,72)
5	Exposición	103,1 (39,5)	103,8 ^a (39,89)	103,5 ^a (39,72)	103,5 (39,72)	103,6 (39,78)	103,6 ^a (39,78)	103,7 ^a (39,83)	104,1 ^a (40,06)
6	Estricto	103,1 (39,5)	103,8 (39,89)	103,2 (39,56)	103,5 (39,72)	103,7 (39,83)	103,5 (39,72)	104,1 (40,06)	104,1 (40,06)

*El grupo de tratamiento 6 no fue incluido en el análisis estadístico.

^aLas comparaciones de los Grupos 1-4 y 5 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, Ensayo de ANOVA cuando sea apropiado).

^bLas comparaciones de los Grupos 1 y 2-4 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA cuando sea apropiado).

^cLas comparaciones de los Grupos 2 y 3-4 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA cuando sea apropiado).

^dLas comparaciones de los Grupos 3 y 4 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA cuando sea apropiado).

Respecto a la FIGURA 1 y la Tabla 5, para el período de tiempo de refuerzo del día 22 al día 35 fue observado que el grupo de tratamiento 4 (APP) tenía la temperatura rectal numérica más alta el día 28 del estudio. Las diferencias estadísticas fueron observadas (p <0,05) el día 28 comparando los grupos de tratamiento 1 y 2 con el grupo 4.

Tabla 5. Temperaturas rectales en grados Fahrenheit (°F) del día 22 al día 35 (período de refuerzo).

Grupo	Tratamiento	Día 28	Día 34	Día 35
1	Células	103,7 ^a (39,83)	103,5 (39,72)	103,9 (39,94)
2	Sobrenadante	103,6 ^b (39,78)	103,7 (39,83)	104,0 (40,00)
3	OMP	103,9 (39,94)	103,6 (39,78)	103,8 (39,89)
4	APP	104,3 ^{a,b}	103,5 (39,72)	103,7 (39,83)
5	Exposición	103,9 (39,94)	103,5 (39,72)	103,7 (39,83)
6	Estricto	103,9 (39,94)	103,5 (39,72)	103,7 (39,83)

*El grupo de tratamiento 6 no fue incluido en el análisis estadístico.

^aLas comparaciones de los Grupos 1 y 2-4 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA cuando sea apropiado).

^bLas comparaciones de los Grupos 2 y 3-4 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA cuando sea apropiado).

Respecto a la FIGURA 1 y la Tabla 6, para los días de período de tiempo de exposición 36 al día 41 fue observado que el grupo de tratamiento 5 (exposición) tenía las temperaturas rectales numéricas más altas los días 36, 37, 40 y 41; mientras que, el grupo de tratamiento 1 (célula entera) tenía las temperaturas rectales más altas los días 38 y 39. Además, el grupo de tratamiento 4 (APP) tenía las temperaturas rectales totales más bajas los días 36, 37, 38 y 41. Además el grupo de tratamiento 5 (exposición) tenía la misma temperatura más baja el día 38 que el grupo de tratamiento 4, y los grupos 2 y 3 tenían las temperaturas más bajas los días 39 y 40 respectivamente. Ambos grupos 3 y 5 tuvieron una subida inicial de la temperatura un día después de la exposición que entonces cayó para el grupo 3; sin embargo, la temperatura para el grupo 5 se elevó otra vez el día 40.

20

25



Tabla 6. Temperaturas rectales (°F, en paréntesis °C) del día 36 al día 41 (período de exposición) y número de animales con pirexia (> 104,90°F) en paréntesis durante al menos un día a partir del día de exposición a la autopsia.

Grp	Tratamiento	Día 36	Día 37	Día 38	Día 39	Día 40	Día 41	% Presente
1	Células Enteras	104,0 (39,94)	104,1 (40,06)	103,9 ^b (39,94)	104,0 (39,94)	103,7 (39,83)	103,8 ^b (39,89)	53,33% ^b (8/15)
2	Sobrenadante	103,7 ^a (39,83)	103,8 ^a (39,89)	103,7 (39,83)	103,5 (39,72)	103,9 (39,94)	103,9 ^c (39,94)	13,33% ^{a,b} (2/15)
3	OMP	104,3 (40,17)	103,9 ^a (39,94)	103,8 (39,89)	103,8 (39,89)	103,4 ^a (39,67)	103,8 ^c (39,89)	33,33% (5/15)
4	APP	103,5 ^a (39,72)	103,6 ^a (39,78)	103,5 ^b (39,72)	103,7 (39,83)	103,6 ^a (39,78)	103,1 ^{a,b,c} (39,5)	7,14% ^{a,b} (1/14)
5	Exposición	104,6 ^a (40,33)	104,4 ^a (40,22)	103,5 (39,72)	103,7 (39,83)	104,1 ^a (40,06)	104,0 ^a (39,94)	66,67% ^a (10/15)
6	Estricto	103,7 (39,83)	103,8 (39,89)	103,7 (39,83)	103,6 (39,78)	103,6 (39,78)	103,5 (39,72)	103,7 (39,83)

5 *El grupo de tratamiento 6 y Bazo, Meninges y Sangre de Corazón no era parte del análisis estadístico.

^aLas comparaciones de los Grupos 1-4 y 5 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA y Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

^bLas comparaciones de los Grupos 1 y 2-4 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA y Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

10 ^cLas comparaciones de los Grupos 2-3 y 4 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, ANOVA y Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

 Otra evaluación del período de exposición mostró que el grupo de exposición 5 recibió el tanto por ciento positivo más alto de animales que eran febriles con un valor del 66,67 %, que era estadísticamente diferente (p <0,05) según se comparaba con los grupos 2 y 4. El segundo valor más alto recibido estaba en el grupo de tratamiento 1 con un valor del 53,33 %, que era también estadísticamente diferente (p <0,05) según se comparaba con los grupos 2 y 4. Los grupos 4 (APP) y 2 (sobrenadante) recibieron los valores más bajos del 7,14 % y 13,33 % respectivamente. El grupo de tratamiento 3 (omp) tenía un valor del 33,33 %.

3. Aislamiento bacteriano

En la autopsia, fueron recogidas muestras de la cavidad nasal, tráquea, bronquios, meninges y sangre de corazón para el aislamiento bacteriano. Las placas agar-agar de sangre de ovejas (5 % con TSA) y las placas agar-agar de MacConkey fueron inoculadas con cada muestra, rayadas para el aislamiento e incubadas toda la noche a 37°C. Las placas agar-agar de sangre fueron colocadas en condiciones anaerobias y aeróbicas, y las placas agar-agar de MacConkey fueron colocadas en condiciones aeróbicas sólo. Además, las placas agar-agar de chocolate se usaron sólo para cultivar muestras pulmonares y se incubaron a 37°C en condiciones aeróbicas. Fueron obtenidas muestras de tejido recientes del pulmón (3 lóbulos de secciones que contienen lesiones), hígado, riñón y amígdala. Las muestras de cada tejido se usaron para inocular placas agar-agar para el aislamiento bacteriano. Las placas se incubaron junto con las muestras mencionadas anteriormente, y las placas fueron observadas según la presencia de *A. suis* 24 horas después de la incubación. Se hizo el análisis bioquímico en una muestra aleatoria en cada uno de los grupos de tratamiento para confirmar la presencia de *A. suis*. Los análisis estadísticos sólo fueron realizados para comparar los grupos 1 a 5 en los valores de aislamiento bacterianos usando la Prueba Exacta de Fisher. El bazo, meninges y la sangre de corazón no fueron estadísticamente analizados. Las tablas 7a y 7b proporcionan un resumen de los valores de bacteriología.

Tabla 7a. Número de animales de *A. suis* en tanto por ciento positivos en grupos de tratamiento por aislamiento bacteriano.

Grp	Tratamiento	Pulmón	Hígado	Riñón	Amígdala	Fosa Nasal
1	Células Enteras	40% (6/15)	6,67% (1/15)	6,67% (1/15)	66,67% (10/15)	13,33% (2/15)
2	Sobrenadante	33,33% (5/15)	0,00% (0/15)	13,33% (2/15)	80,00% (12/15)	13,33% (2/15)
3	OMP	33,33% (5/15)	0,00% (0/15)	0,00% (0/15)	60,00% (9/15)	6,67% ^a (1/15)
4	APP	33,33% (5/15)	6,67% (1/15)	6,67% (1/15)	60,00% (9/15)	0,00% ^a (0/15)
5	Exposición	73,33% (11/15)	13,33% (2/15)	20,00% (3/15)	86,67% (13/15)	46,67 ^a (7/15)
*6	Estricto	0,00% (0/10)	0,00% (0/10)	0,00% (0/10)	0,00% (0/10)	20,00% (3/10)

*El grupo de tratamiento 6 y los Parámetros Bazo, Meninges y Sangre de Corazón no era parte del análisis estadístico.

^aLas comparaciones de los Grupos 1-4 y 5 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

5A

Tabla 7b. Número de animales de *A. suis* en tanto por ciento positivos en grupos de tratamiento por aislamiento bacteriano.

Grp	Tratamiento	Tráquea	Bronquios	*Bazo	*Meninges	*Sangre del corazón
1	Células Enteras	6,67% (1/15)	13,33% (2/15)	0,00% (0/15)	6,67% (1/15)	6,67% (1/15)
2	Sobrenadante	6,67% (1/15)	0,00% (0/15)	0,00% (0/15)	0,00% (0/15)	0,00% (0/15)
3	OMP	6,67% (1/15)	13,33% (2/15)	6,67% (1/15)	0,00% (0/15)	0,00% (0/15)

El grupo de tratamiento 6 y los Parámetros Bazo, Meninges y Sangre de Corazón no eran parte del análisis estadístico.

5 ^aLas comparaciones de los Grupos 1-4 y 5 son estadísticamente significativas y diferentes (p <0,05, Prueba Exacta de Fisher cuando sea apropiado).

10 La recuperación de *A. suis* en cada una de las áreas objetivo era la más alta en el grupo de tratamiento 5 (exposición) comparada con los otros grupos (1-4). El porcentaje más alto de recuperación de *A. suis* fue encontrado en la amígdala seguido del pulmón. La recuperación de *A. suis* fue baja en los parámetros bazo, meninges y sangre de corazón con sólo un rendimiento de recuperación máximo del 6,67 % entre los grupos de tratamiento. Los controles estrictos, grupo 6, tuvieron de tres a diez cerdos positivos para *A. suis* en el tejido nasal, y un cerdo positivo para el tejido traqueal. Se encontraron diferencias estadísticas (p <0,05) en el tejido nasal comparando los grupos 3 (omp) y 4 (APP) con el grupo 5 (exposición).

15 Se aislaron otros organismos respiratorios y bacterianos comunes durante el proceso de cultivo. *Bordettella sp*, estaba en números altos en todos los grupos así como las bacterias de estreptococos alfa y beta y *Pasteurella multocida*. Otros organismos aislados en números muy bajos fueron *Arcanobacterium pyrogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus sp*, *Enterococcous sp*, *Proteus*, hongos azules y *Pastunella sp*.

4. Serología

25 La sangre se usó en los días de estudio 0, 7, 14, 21, 28, 34 y 41 del estudio. Se realizaron ensayos de transferencia Western en sueros recogidos de los grupos de tratamiento 1, 2, 3, y 4 los días 0 y 34 del estudio para medir las inmunorreactividad respecto a las fracciones. Cada grupo de tratamiento consistió en tres grupos reunidos, que consistieron en 5 cerdos de dicho grupo de tratamiento. Los ensayos de transferencia Western mostraron una seroconversión detectable para las fracciones de

células enteras, el sobrenadante y omp en una dilución 1:100, pero no en una 1:1000. La fracción APP tuvo la mejor reactividad y fue detectable en 1:1000. Para todos los grupos, no fue encontrada ninguna reactividad en las muestras del día 0 antes del tratamiento.

5 Pueden hacerse todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en este documento y realizarse sin una experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Si bien las composiciones y los métodos de esta invención han sido descritos en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden ser aplicadas variaciones a las composiciones y los métodos
10 y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en este documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que pueden ser sustituidos ciertos agentes que están, tanto química como fisiológicamente relacionados, por los agentes descritos en este documento siempre que sean conseguidos los mismos valores o similares. Se piensa que todos
15 dichos sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones siguientes.

REFERENCIAS

20 Las siguientes referencias, hasta el grado en que proporcionen detalles procesales u otros ejemplares suplementarios para aquellos expuestos en este documento, son expresamente incorporadas en este documento como referencia.

Monteiro, Slavic y Michael, (2000) *J Clin Microbiol* **38** (10): 3759-3762

25

Oliveira *et al*, (2007) *American Association Of Swine Veterinarians*, págs. 371-376

Oliveira S. (2007) "Swine respiratory bacterial pathogens: bacterial overview and vaccine trends". En: J Wiseman, M Varley, S McOrist & B Kemp (Eds), *Paradigms in*
30 *Pig Science* (pp. 196-178). Nottingham, UK: Nottingham University Press.

Rullo, Papp-Szabo y Michael, (2006) *Biochimie et biologie cellulaire* **84**(2): 184-90.

Simpson (1949) "Measurement of diversity". *Nature* **163**:688

35

5

Slavic, *et al.*, (2000a) *Can J Vet Res.* 2000 Abril; **64**(2): 81-87.

Slavic, *et al.*, (2000b) *J Clin Microbiol.* 2000 Octubre; **38**(10): 3759-3762.

5 Versalovic *et al*, 1991, *Nucleic Acids Research*, Vol. **19**, No. 24 6823 -6831.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

- 1, Una composición inmunógena para proteger a un sujeto contra una infección
5 de *Actinobacillus suis*, que comprende:
 - a) el sobrenadante recogido de uno o varios cultivos de *A. suis* cultivado entre OD_{650} 0,650 y OD_{650} 0,850; y
 - b) un adyuvante.
- 10 2. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que el sobrenadante está esencialmente libre de células de *A. suis*.
3. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que el sobrenadante está inactivado.
15
4. La composición inmunógena de la reivindicación 3, en la que el sobrenadante es formalina inactivada.
5. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que el adyuvante es
20 Emulsigen ®-D.
6. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que el sujeto es un porcino.
- 25 7. Un método para provocar una respuesta inmune contra *Actinobacillus* en un sujeto que comprende administrar al sujeto la composición inmunógena de la reivindicación 1.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el sujeto es un porcino.
30
9. Un método para reducir la frecuencia o severidad de un síntoma clínico asociado a una infección por *Actinobacillus. suis* que comprende la etapa de administrar la composición inmunógena de la reivindicación 1 a un sujeto, en el que la

reducción de la frecuencia o la severidad de un síntoma clínico es con relación a un sujeto que no recibe la composición inmunógena.

- 5 10. El método de la reivindicación 9, en el que el síntoma clínico se selecciona del grupo que consiste en meningitis, septicemia, metritis, pulmonía, lesiones del tipo erisipela y aborto.
11. El método de la reivindicación 9, en el que la infección por *Actinobacillus suis* es una infección de ISU-8594 por *A. suis*.
- 10 12. El método de la reivindicación 9, en el que el sujeto es un porcino.
13. Un método para preparar la composición inmunógena de la reivindicación 1, que comprende:
- 15 a) cultivar un cultivo de *Actinobacillus suis* entre OD₆₅₀ 0,650 y OD₆₅₀ 0,850;
- b) recoger un sobrenadante del cultivo;
- c) filtrar el sobrenadante para producir un filtrado; y
- d) mezclar el filtrado con un adyuvante.
- 20 14. El método de la reivindicación 13, que comprende además inactivar el sobrenadante.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el sobrenadante es inactivado antes de mezclar con el adyuvante.
- 25 16. El método de la reivindicación 13, en el que el adyuvante es Emulsigen ®-D.
17. Un método para diagnosticar una infección por *Actinobacillus suis* en un sujeto, que comprende:
- 30 a) proporcionar un sobrenadante filtrado preparado cultivando un cultivo de *A. suis* entre OD₆₅₀ 0,650 y OD₆₅₀ 0,850, recoger el sobrenadante del cultivo y filtrar el sobrenadante;

- b) poner en contacto el sobrenadante filtrado con una muestra obtenida del sujeto; y
- c) identificar el sujeto que tiene una infección de *A. suis* si se detecta en la muestra un anticuerpo capaz de unirse a un componente en el sobrenadante filtrado.

5

18. El método de la reivindicación 17, en el que se detecta la unión usando un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo en la muestra.

19. Un kit que comprende:

10

a) un sobrenadante filtrado preparado cultivando un cultivo de *Actinobacillus suis* entre OD₆₅₀ 0,650 y OD₆₅₀ 0,850, recogiendo un sobrenadante del cultivo y filtrando el sobrenadante;

b) un adyuvante; y

15

c) un contenedor para envasar el sobrenadante y el adyuvante.

20. El kit de la reivindicación 19, que comprende además instrucciones para el uso del kit.

20

21. El kit de la reivindicación 19, que comprende además un medio para administrar el sobrenadante filtrado a un sujeto.

22. Un kit para preparar la composición inmunógena de la reivindicación 1 que comprende (i) el sobrenadante y (ii) el adyuvante, en el que (i) e (ii) son envasados por separado.

25

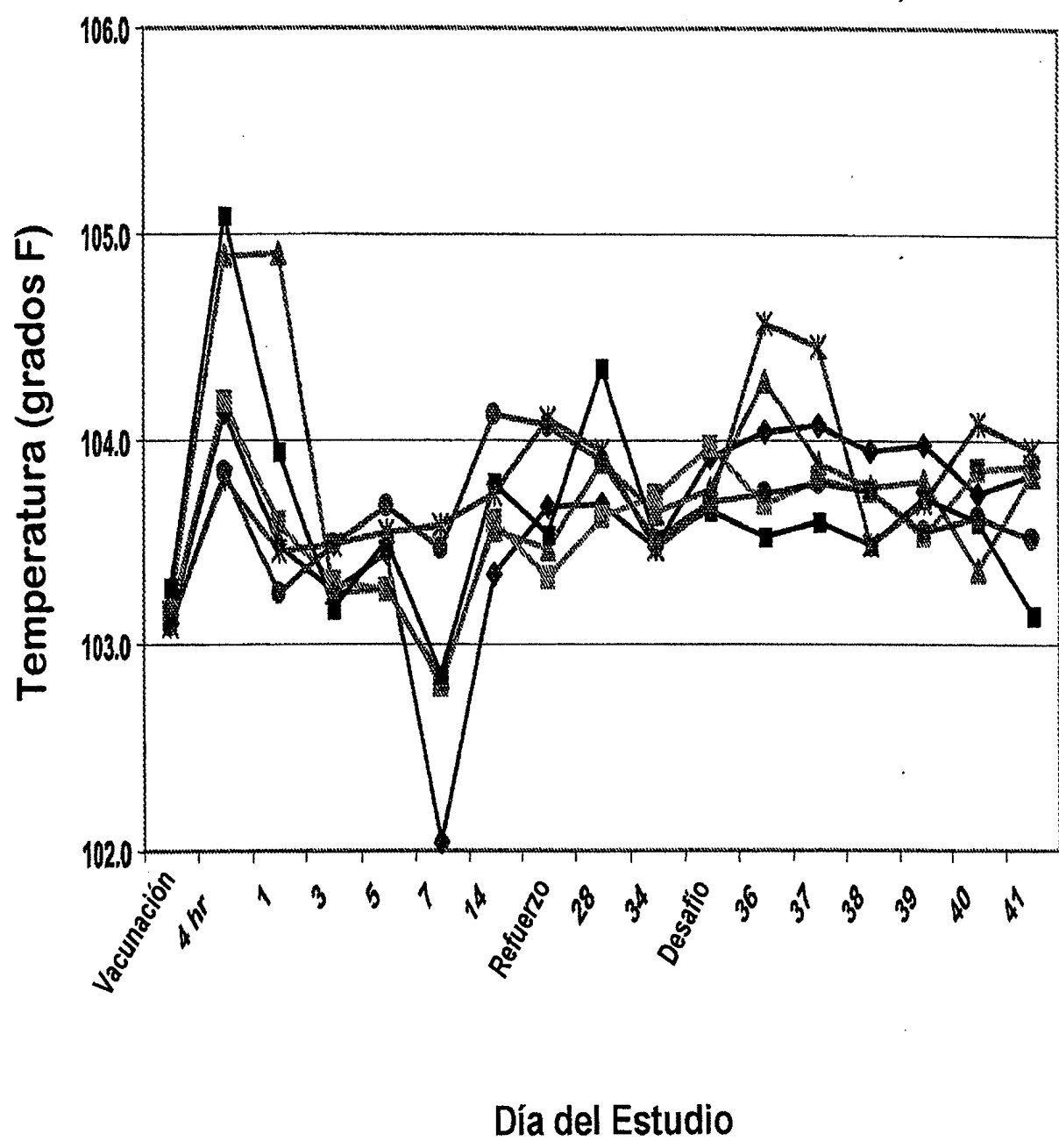
23. El kit de la reivindicación 22, que comprende además las instrucciones para uso del kit.

5

RESUMEN

La invención proporciona composiciones inmunógenas útiles para la inhibición, el tratamiento, la protección o la prevención de la infección por *Actinobacillus suis*. Se demuestran que estas composiciones inmunógenas estimulan 5 útilmente respuestas inmunógenas en los cerdos tratados. Algunas vacunas estimularon reacciones suficientes para ser protectoras contra a *A suis*. Además, la invención proporciona kits que comprenden las composiciones inmunógenas; así como métodos para usar las composiciones y los kits.

FIG. 1



58

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 10 - 0124 - PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2010/055951	International filing date (day/month/year) 09/11/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10/11/2009
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/055951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/102 A61P31/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BURROWS L L ET AL: "Molecular characterization of an RTX toxin determinant from Actinobacillus suis.", INFECTION AND IMMUNITY JUN 1992 LNKD-PUBMED:1587585, vol. 60, no. 6, June 1992 (1992-06), pages 2166-2173, XP002616878, ISSN: 0019-9567	1,7,9, 17,19,22
Y	e.g. paragraph bridging left-hand column and right-hand column on page 2167; abstract, line 7-8; paragraph bridging page 2169 and 2170; page 2172, left-hand column, paragraph 3; page 2172, left-hand column, last paragraph; the whole document ----- -/--	2-6,8, 10-16, 18,20, 21,23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 January 2011

Date of mailing of the international search report

28/01/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/055951

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEVENISH J ET AL: "Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of Actinobacillus pleuropneumoniae.", INFECTION AND IMMUNITY DEC 1990 LNKD-PUBMED:2254012, vol. 58, no. 12, December 1990 (1990-12), pages 3829-3832, XP002616879, ISSN: 0019-9567 e.g. page paragraph bridging page 3829 and 3830; the whole document	1-23
Y	FEDORKA-CRAY P J ET AL: "Efficacy of a cell extract from Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae serotype 1 against disease in swine.", INFECTION AND IMMUNITY FEB 1990 LNKD-PUBMED:2298483, vol. 58, no. 2, February 1990 (1990-02), pages 358-365, XP002616880, ISSN: 0019-9567 e.g. abstract; page 358, right-hand column, last paragraph - page 359, left-hand column, paragraph 2; page 364, left-hand column, paragraph 2; page 362, right-hand column, last paragraph; the whole document	2-6,8, 10-16, 18,20, 21,23
A	WO 97/13523 A1 (UNIV KANSAS STATE [US]) 17 April 1997 (1997-04-17) the whole document	1-23
A	GOETHE R ET AL: "A novel strategy for protective Actinobacillus pleuropneumoniae subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 19, no. 7-8, 22 November 2000 (2000-11-22), pages 966-975, XP004225419, ISSN: 0264-410X, DOI: DOI:10.1016/S0264-410X(00)00212-7 the whole document	1-23
A	WANG CHUNLAI ET AL: "Positive role for rApxIVN in the immune protection of pigs against infection by Actinobacillus pleuropneumoniae.", VACCINE 25 SEP 2009 LNKD- PUBMED:19654060, vol. 27, no. 42, 25 September 2009 (2009-09-25), pages 5816-5821, XP002616881, ISSN: 1873-2518 the whole document	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/055951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9713523	A1	17-04-1997 AU	7663196 A
			30-04-1997



No. 12-076692- -00000-0000

Fecha: 2012-05-10 09:59:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 59

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	